

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Π.Μ.Σ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Ανίχνευση της αλλοίωσης σε φιλέτο κοτόπουλου με την χρήση της
φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)**

Χριστίνα Κ. Παπαχρήστου

Επιβλέπων καθηγητής:

Νυχάς Ε. Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2020

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

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Ανίχνευση της αλλοίωσης σε φιλέτο κοτόπουλου με την χρήση της
φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)**

**Detection of spoilage in chicken thigh by using the method of Fourier
transform infrared spectroscopy (FTIR)**

Χριστίνα Κ. Παπαχρήστου

Εξεταστική επιτροπή:

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Πανάγου Ευστάθιος, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Ανίχνευση της αλλοίωσης σε φιλέτο κοτόπουλου με την χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο τρόπος ζωής σχετικά με τα πρότυπα κατανάλωσης κρέατος έχει αλλάξει και οι καταναλωτές έχουν γίνει πιο απαιτητικοί, ιδίως όσον αφορά την υψηλότερη ποιότητα, τις αυξημένες λειτουργικές και διατροφικές ανάγκες, αλλά και την αυξημένη ευαισθητοποίηση μεταξύ υγείας και τροφίμων. Το κοτόπουλο και τα προϊόντα του ανήκουν αδιαμφισβήτητα στα τρόφιμα με την μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως, καθώς αποτελούν τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας. Η ευαλλοίωτη φύση τους, όμως, καθιστά απαραίτητη την έρευνα και την κατανόηση της εξέλιξης της αλλοίωσης με στόχο τη βελτιστοποίηση των μεθόδων παραγωγής και συντήρησης, αλλά και την ανάπτυξη γρήγορων και αξιόπιστων μεθόδων, προκειμένου να προσδιοριστεί η ασφάλεια και η ποιότητα των προϊόντων, να παραταθεί ο χρόνος ζωής τους και να διατηρηθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά προς όφελος των καταναλωτών. Βασικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση της αλλοίωσης σε φιλέτο από μπούτι κοτόπουλου με την χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) και η περαιτέρω συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων με τα φασματοσκοπικά δεδομένα για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης της αλλοίωσης. Επίσης, από τα μικροβιολογικά δεδομένα προσδιορίστηκαν με την εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων οι κινητικές παράμετροι της μικροβιακής ανάπτυξης της μικροχλωρίδας στο κοτόπουλο και μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Για τον σκοπό αυτό, η διεξαγωγή του πειράματος αλλοίωσης πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές ισοθερμοκρασιακές συνθήκες και αφορούσε την μικροβιολογική ανάλυση για *OMX* (ολική μεσόφιλη χλωρίδα), *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες/μύκητες. Δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα σε δύο δείγματα ανά θερμοκρασιακό προφίλ, διεξάγονταν μικροβιολογικές αναλύσεις, όπου για τις χαμηλές θερμοκρασίες διήρκησαν 17 ημέρες και για τις υψηλές θερμοκρασίες 7 ημέρες και εφαρμόζονταν η μέθοδος της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR).

Με βάση τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και την ανάπτυξη πρωτογενών μοντέλων, φάνηκε ότι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη μικροβιολογική αλλοίωση στα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, στις υπό αερόβιες συνθήκες αποθήκευσης, ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός στο κοτόπουλο ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., των οποίων η φάση

προσαρμογής ήταν αυξημένη στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Συνεπώς, η μελέτη επιβεβαίωσε την άποψη πως οι χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνουν την αλλοίωση, καθώς η μείωση της θερμοκρασίας συντήρησης φάνηκε να μειώνει το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης και να αυξάνει την φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών. Παράλληλα, με την ανάπτυξη δευτερογενών μοντέλων, προσδιορίστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στη ρίζα του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, προκειμένου να προσδιοριστούν η ελάχιστη (T_{min}) και η μέγιστη (T_{max}) θερμοκρασία ανάπτυξης τόσο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, αλλά και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp.. Συνοπτικά, με βάση τα αποτελέσματα κατά τα οποία η τιμή R^2 πλησιάζει τη μονάδα, αλλά και με βάση τις χαμηλές τιμές του RMSE (<1), μπορεί να προσδιοριστεί η ευκολία και η καταλληλότητα της εφαρμογής των μαθηματικών μοντέλων για τον προσδιορισμό της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών.

Στα πλαίσια του πειράματος και μετά το πέρας των μικροβιολογικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων, όπου η αξιολόγηση τους στηρίζονταν στην οσμή και στην εμφάνιση. Από την επεξεργασία των δεδομένων του οργανοληπτικού ελέγχου φάνηκε ότι η αλλοίωση γινόταν αντιληπτή αρκετά γρήγορα στα δείγματα που είχαν συντηρηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες και πιο συγκεκριμένα στα δείγματα στα οποία σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα ο πληθυσμός των κυρίαρχων *Pseudomonas* spp. ξεπερνούσε τους 5 $\log$ cfu/cm², λόγω της έντονης δυσοσμίας, του αποχρωματισμού και της παραγωγής γλοιώδους επιφάνειας στα δείγματα.

Για τη συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων με τα φασματοσκοπικά δεδομένα εφαρμόστηκε η χρήση της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R), προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη μοντέλου εκμάθησης για την ποσοτική εκτίμηση της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp.. Τα μοντέλα PLS-R εμφάνισαν καλή επίδοση, καθώς κατά τη πρόβλεψη η τιμή του RMSE_p ήταν ίση με 0.9017 και 1.0341 για την OMX και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. αντιστοίχως, ενώ οι αντίστοιχες τιμές του r_p ήταν 0.8153 και 0.8232. Από τους συντελεστές παλινδρόμησης φάνηκε ότι τα μήκη κύματος που επηρεάζουν την επίδοση του μοντέλου, οφείλονται σε κυματαριθμούς που αποδίδονται σε C- N δονήσεις τάσης από αμίνες και από αμίδια I και II.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και των κυριότερων παραγόμενων οργανικών οξέων σε φιλέτο από μπουτί κοτόπουλο, καθώς και η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων βάσει του βαθμού αλλοίωσης τους με την ανάλυση των Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και με τη Διακριτική ανάλυση (Discriminant Analysis, DA). Με βάση τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της HPLC, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της

γλυκόζης μειωνόταν διαρκώς, καθώς καταναλώνονταν από τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, ενώ τα κυριότερα παραγόμενα οξέα τα οποία σχετίζονταν με την αλλοίωση των δειγμάτων ήταν το οξικό, το ηλεκτρικό και το προπιονικό οξύ.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: φιλέτο μπούτι κοτόπουλο, αλλοίωση, φασματοσκοπία υπερύθρου, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, γραμμικά μοντέλα εκμάθησης

Detection of spoilage in chicken thigh by using the method of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Microbiology and Food Biotechnology

ABSTRACT

In the last decades, dietary patterns regarding meat consumption patterns have changed and consumers have become more demanding, especially in terms of quality, as well as, functional and nutritional properties, but also there is increased awareness for the link between food and health. Chicken and its products arguably belong to the most frequently consumed food globally, due to their high nutritional value. However, these products are prone to spoilage. Therefore, it is imperative to study and better understand the evolution of spoilage, with implications in the optimization of production and maintenance methods. Additionally, the development of fast and reliable methods is required to determine the safety and quality of products, to extend their life span and to maintain their organoleptic characteristics for the benefit of the consumers. The main purpose of the present study was the detection of spoilage in chicken thigh using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the correlation of microbiological results with spectroscopic data for the development of predictive models of spoilage growth. Furthermore, based on the microbiological data, the use of mathematical models, the growth kinetic parameters of the spoilage microorganisms and the effect of storage temperature on microbial growth rate were assessed.

For this purpose, the spoilage experiment was conducted in various temperatures and included microbiological analysis of Total viable plate count (TVC), *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, Lactic acid bacteria (LAB), Enterobacteriaceae and yeast/ fungi. Sampling was performed in regular time points in two replicates per temperature which lasted 17 days and 7 days for the low and high temperatures respectively followed by microbiological analysis using FTIR.

The microbiological data and the development of primary models showed that the temperature and the environmental conditions significantly affect the degree of microbiological spoilage in the samples. Specifically, in hypo-aerobic storage conditions, the dominant spoilage bacteria in the chicken belonged to the *Pseudomonas* spp. species, which showed increased adaptation phase in very low temperatures. Therefore, these results confirmed the notion that low temperatures delay spoilage, given that the decrease in storage temperature resulted in a decrease of the maximum growth rate and an increase of the adaptation phase of the bacteria. Additionally, with the development of secondary models, the effect of temperature in the square root of maximum growth rate was computed in order to estimate the minimum (T_{min}) and maximum (T_{max}) growth temperatures of the

Total viable plate count (TVC) as well as of the *Pseudomonas* spp. bacteria. In summary, based on the results with the value of R^2 approaching the unit, and the low values of RMSE (<1), it is possible to evaluate the ease of implementation and suitability of the application of mathematical models for the assessment of the effect of temperature in the growth rate of spoilage bacteria.

As part of the study and further to the microbiological analysis, organoleptic assessment of the samples was conducted based on smell and appearance. Analysis of the organoleptic data showed that spoilage was evident relatively faster in the samples stored at high temperatures and particularly those in which the number of the dominant *Pseudomonas* spp. exceeded 5 log cfu/cm² based on strong unpleasant smell, discolouring and the slime formation on the surface of the samples.

For the association of the microbiological results with the spectroscopic data, linear regression was used and particularly the method of Partial Least Squares (PLS-R), in order to develop a learning model for the quantitative estimation of the Total viable plate count (TVC) and the load of *Pseudomonas* spp. bacteria. The PLS-R models performed well, as the RMSE_p values were 0.9017 and 1.0341 for the total viable plate count (TVC) and the *Pseudomonas* spp. bacteria respectively, while the respective r_p values were 0.8153 and 0.8232. The regression coefficients showed that the wavelengths that affect the performance of the model are attributed to frequencies characteristic of C-N stretch from amines and amides I and II.

Lastly, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed for the quantification of glucose and major produced organic acids in thigh chicken filet as well as sample classification based on the degree of spoilage using Principal Component Analysis (PCA) and Discriminant Analysis (DA). Based on the HPLC results, it was found that glucose concentration was continuously reduced, as it was consumed by the spoilage bacteria, while the main produced organic acids associated with sample spoilage were acetic, succinic and propionic acid.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: chicken thigh, spoilage, Fourier transform infrared spectroscopy, high-performance liquid chromatography, linear algorithms

Ευχαριστίες

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον αναπληρωτή καθηγητή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, κ. Ευστάθιο Πανάγου, για το ενδιαφέρον και τις συμβουλές του στη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλουν να δοθούν στον καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας κ. Πέτρο Ταραντίλη για το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη της εργασίας και τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τη Μεταδιδάκτορα Αναστασία Λύτου για τη συνεισφορά και την καθοδήγηση της στην πορεία του πειράματος, αλλά και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και την υποψήφια Διδάκτορα Ευγενία Σπυρέλλη για την καταλυτική της στήριξη, τη συνεισφορά, την υπομονή, την καθοδήγηση της και τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις τις καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων. Δεν γίνεται να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το οικογενειακό και φιλικό μου περιβάλλον για τη βοήθεια, τις συμβουλές και τη στήριξη τους σε κάθε στάδιο της ακαδημαϊκής μου, και όχι μόνο, πορείας και εξέλιξης.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	8
1.Εισαγωγή	12
1.1 Σύσταση κρέατος κοτόπουλου.....	12
1.2. Κατανάλωση κοτόπουλου και ασφάλεια τροφίμων.....	14
1.3. Αλλοίωση.....	16
1.3.1. Αλλοίωση κοτόπουλου	17
1.3.2. Μεταβολές που συνδέονται με την μικροβιακή αλλοίωση.....	18
1.3.2.1 Μεταβολές στην οσμή και στην γεύση	20
1.3.2.2 Μεταβολές στο χρώμα	20
1.3.2.3. Παραγωγή αερίων.....	21
1.3.2.4. Ανάπτυξη γλοιώδους επιφάνειας	21
1.3.3 Φυσικοχημικές μεταβολές κατά την αλλοίωση στο κοτόπουλο	22
1.3.3.1 Μεταβολή του pH.....	22
1.3.3.2 Πρωτεόλυση	22
1.3.3.3 Παραγωγή βιογενών αμινών	23
1.3.3.4 Τάγγιση του λίπους-Οξείδωση και υδρόλυση λιπιδίων	23
1.3.3.5 Μεταβολές του χρώματος των πουλερικών	25
1.3.4. Βακτήρια που συμμετέχουν στην αλλοίωση του κοτόπουλου	26
1.3.4.1 Κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στο κοτόπουλο	28
1.3.4.1.1 Pseudomonas spp.....	28
1.3.4.1.2 Enterobacteriaceae	29
1.3.4.1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια, LAB.....	30
1.3.4.1.4 Brochothrix thermosphacta	31
1.3.5 Επίδραση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την διαδικασία αλλοίωσης του κοτόπουλου	32
1.3.5.1 Ενδογενείς παράγοντες.....	33
1.3.5.1.1 Σύσταση προϊόντος	33
1.3.5.1.2 pH	33
1.3.5.1.3 Ενεργότητα ύδατος, υγρασία και περιεκτικότητα σε αλάτι	34
1.3.5.2. Εξωγενείς παράγοντες	34
1.3.5.2.1 Θερμοκρασία.....	35
1.3.5.2.2 Συνθήκες συσκευασίας και σύσταση αερίων στην ατμόσφαιρα	36
1.4 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας.....	37

1.4.1 Κλασσική μέθοδος απαρίθμησης μικροβιακού φορτίου (μέθοδος τρυβλίων).....	38
1.4.2 Μαθηματικά μοντέλα	39
1.4.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)	40
1.4.5 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	42
2. Σκοπός μελέτης	44
3. Υλικά και μέθοδοι.....	45
3.1 Πειραματική διαδικασία	47
3.1.1 Μικροβιολογική ανάλυση	48
3.1.1.1 Μέτρηση pH	50
3.1.2 Μαθηματικά μοντέλα	50
3.1.2.1 Περιγραφή μοντέλων	50
3.1.3 Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων	52
3.1.4 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) .	53
3.1.4.1 Ανάλυση δεδομένων FTIR	54
3.1.4.1.1 Γραμμική Παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression- PLS-R)	54
3.1.5 Εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	55
3.1.5.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων HPLC.....	58
3.1.5.1.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA).....	58
3.1.5.1.2 Διακριτική Ανάλυση (Discriminant Analysis).....	59
4. Αποτελέσματα	60
4.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων.....	60
4.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH	68
4.3 Αποτελέσματα μαθηματικών μοντέλων	70
4.3.1 Αποτελέσματα πρωτογενούς μοντέλου- Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης	70
4.3.2 Αποτελέσματα δευτερογενούς μοντέλου- Προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης	72
4.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου	75
4.5 Αποτελέσματα από την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)	77
4.6 Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	81
5. Συμπεράσματα	89

6. Βιβλιογραφία.....	91
Παράρτημα Α.....	105

1.Εισαγωγή

1.1 Σύσταση κρέατος κοτόπουλου

Το κρέας των πουλερικών θεωρείται ένα τρόφιμο υψηλής διατροφικής αξίας καθώς περιέχει μεγάλη περιεκτικότητα σε βιταμίνες (κυρίως θειαμίνη, νιασίνη, βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β6 και Β12) και παντοθενικό οξύ), ανόργανα συστατικά (σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός, φώσφορος), πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, ενώ παράλληλα προσθέτει λίγες θερμίδες στη δίαιτα, είναι εύπεπτο και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες (περισσότερο μονοακόρεστο και πολυακόρεστο λίπος και λιγότερο κορεσμένο). Συνεπώς, μπορεί να καλύψει τις διατροφικές ανάγκες όλων των ηλικιακών ομάδων αλλά και ατόμων που χρήζουν ειδική διατροφή λόγω προβλημάτων υγείας (Marangoni et al., 2017).

Μεταξύ των προϊόντων κρέατος πουλερικών, το κοτόπουλο είναι αυτό το οποίο καταναλώνεται περισσότερο με ποσοστό ~ 75% από τα συνολικά κρέατα πουλερικών και στην συνέχεια ακολουθεί η κατανάλωση της γαλοπούλας με ποσοστό ~25% και με πολύ χαμηλό ποσοστό η κατανάλωση πάπιας (Rouger et al., 2017). Το κοτόπουλο αποτελεί μια πηγή πρωτεϊνών περιέχοντας όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και είναι χαμηλό σε λιπαρά (**Πίνακας 1**). Το ακριβές ποσοστό πρωτεϊνών διαφέρει ανάλογα το τεμάχιο, καθώς το στήθος κοτόπουλου εμπεριέχει 18.75 g ενώ το μπούτι 15.75 g ανά μερίδα (**USDA Database, 2019**). Ωστόσο η κατανάλωση του κοτόπουλου μαζί με την επιδερμίδα του διπλασιάζει την περιεκτικότητα σε λιπαρά (**Πίνακας 2**), πράγμα που μπορεί να αντιμετωπιστεί με διάφορους τρόπους μαγειρέματος (ψήσιμο, βράσιμο).

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα νωπού κρέατος κοτόπουλου σε αμινοξέα και λιπαρά οξέα (Ndob et al., 2015).

Αμινοξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100 g κοτόπουλου
Αλανίνη	1.266
Αργινίνη	1.399
Ασπαρτικό οξύ	2.068
Γλουταμικό οξύ	3.474
Κυστεΐνη	0.297
Γλυκίνη	1.140
Ιστιδίνη	0.720
Ισολευκίνη	1.225
Λευκίνη	1.741
Λυσίνη	1.971
Μεθειονίνη	0.642
Φαινυλαλανίνη	0.921
Προλίνη	0.954
Σερίνη	0.798
Θρεονίνη	0.980
Τρυπτοφάνη	0.271
Τυροσίνη	0.783

Βαλίνη	1.151
--------	-------

Λιπαρά οξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100 g κοτόπουλου
Μυριστικό οξύ	0.01
Παλμιτικό οξύ	0.28
Στεατικό οξύ	0.13
Παλμιτολεϊκό οξύ	0.04
Ολεϊκό οξύ	0.34
Λινολεϊκό οξύ (LA)	0.22
α- Λινολεϊκό οξύ (ALA)	0.01
Γαδολεϊκό οξύ	0.01
Αραχιδονικό οξύ (AA)	0.06
Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA)	0.01
Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (DPA)	0.01
Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA)	0.02

Πίνακας 2: Θρεπτική σύσταση σε στήθος και μπούτι κοτόπουλου με δέρμα και χωρίς δέρμα σε μαγειρεμένο και ωμό κρέας.

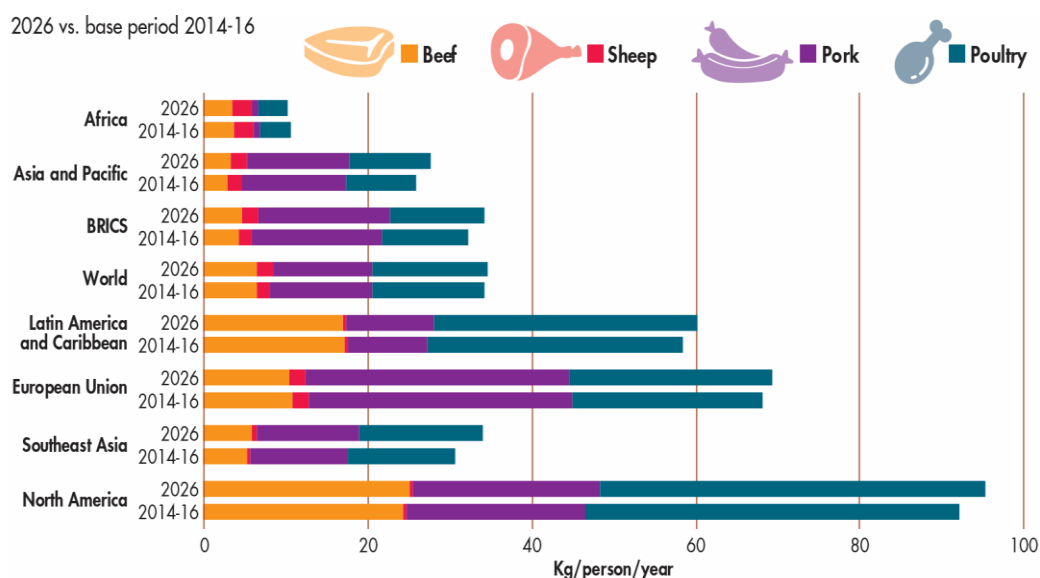
Τιμές για μαγειρεμένο κρέας				
Θρεπτικά συστατικά	Στήθος χωρίς δέρμα	Στήθος με δέρμα	Μπούτι χωρίς δέρμα	Μπούτι με δέρμα
Θερμίδες	165	197	209	229
Πρωτεΐνη (g)	31	30	26	25
Συνολικά λιπίδια(g)	3.6	7.8	10.9	15.5
Κορεσμένο λίπος (g)	1	2.2	3	4.3
Μονοακόρεστο λίπος (g)	1.2	3	4.1	6.1
Πολυακόρεστο λίπος (g)	0.7	1.7	2.5	3.4
Χοληστερόλη(mg)	85	84	95	93
Νάτριο (mg)	74	71	88	84
Σίδηρος (mg)	1	1	1.3	1.3
Τιμές για ωμό κρέας				
Θρεπτικά συστατικά	Στήθος χωρίς δέρμα	Στήθος με δέρμα	Μπούτι χωρίς δέρμα	Μπούτι με δέρμα
Θερμίδες	114	172	119	211
Πρωτεΐνη (g)	21.2	20.8	19.7	17.3
Συνολικά λιπίδια (g)	2.6	9.3	3.9	15.3
Κορεσμένο λίπος (g)	0.6	2.7	1	4.3
Μονοακόρεστο	0.8	3.8	1.2	6.3

λίπος (g)				
Πολυακόρεστο	0.4	2	1	3.3
λίπος (g)				
Χοληστερόλη(mg)	64	64	83	84
Νάτριο (mg)	116	63	86	76
Σίδηρος (mg)	0.4	0.7	1	1

Source of USDA 2020

1.2. Κατανάλωση κοτόπουλου και ασφάλεια τροφίμων

Το κρέας κοτόπουλου φαίνεται ότι είναι ένα από τα είδη κρέατος με τη μεγαλύτερη κατανάλωση για τις τελευταίες δεκαετίες. Το 2017 η συνολική παραγωγή σε κρέας πουλερικών παγκοσμίως άγγιξε τους 120.5 εκατομμύρια τόνους, ενώ το 2018 τα στοιχεία έδειξαν ότι υπήρχε μια αύξηση σε ποσοστό 1.6 % φτάνοντας έτσι την συνολική παραγωγή στους 122.5 εκατομμύρια τόνους (WATT Global Media 2018). Σύμφωνα με τον FAO, το κρέας των πουλερικών θεωρείται το κρέας με την μεγαλύτερη παραγωγή από το 2016 και τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η κατανάλωση το 2016-2018 βρισκόταν περίπου στα 14 kg ανά κάτοικο, ενώ μέχρι το 2026 φαίνεται ότι η κατανάλωση θα φτάσει περίπου στα 14.7 kg ανά κάτοικο (FAO Food Outlook June 2018) (Εικόνα 1). Αντίστοιχα για την Ευρώπη, φαίνεται ότι μέχρι το 2018 η κατανάλωση των πουλερικών είχε αυξηθεί κατά 11.86 εκατομμύρια τόνους, ενώ σταδιακά την επόμενη δεκαετία η κατανάλωση πιθανότατα θα επιβραδυνθεί, με την πρόβλεψη να αυξάνεται πάλι έως το 2028. Κατά το τέλος αυτής της περιόδου, εκτιμάται ότι η κατανάλωση θα ανέλθει στους 12.18 εκατομμύρια τόνους (WATT Global Media 2019).



Source: WATT Global Media 2018

Εικόνα 1: Η συνολική κατανάλωση κρέατος παγκοσμίως ανά κάτοικο το χρονικό διάστημα 2014-2016 σε σύγκριση με το 2026.

Εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης και κατανάλωσης τροφίμων, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) εξέδωσαν κατευθυντήριες γραμμές για παραγωγούς, διανομείς και εργαζόμενους σε χώρους εστίασης, με στόχο την προστασία των καταναλωτών από τροφιμογενείς επιδημίες (Nychas et al., 2016). Μέσω των κανόνων υγιεινής Hazard Assessment of Critical Control Points (HACCP) στα τρόφιμα (EC 852/2004) και στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ειδικότερα (EC 853/2004), οι συμμετέχοντες στον τομέα των τροφίμων απαιτείται να συμμορφώνονται με συγκεκριμένες απαιτήσεις, προκειμένου να εξαιρεθούν πιθανοί φυσικοί, βιολογικοί και χημικοί κίνδυνοι κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής των τροφίμων (EC 852/2004).

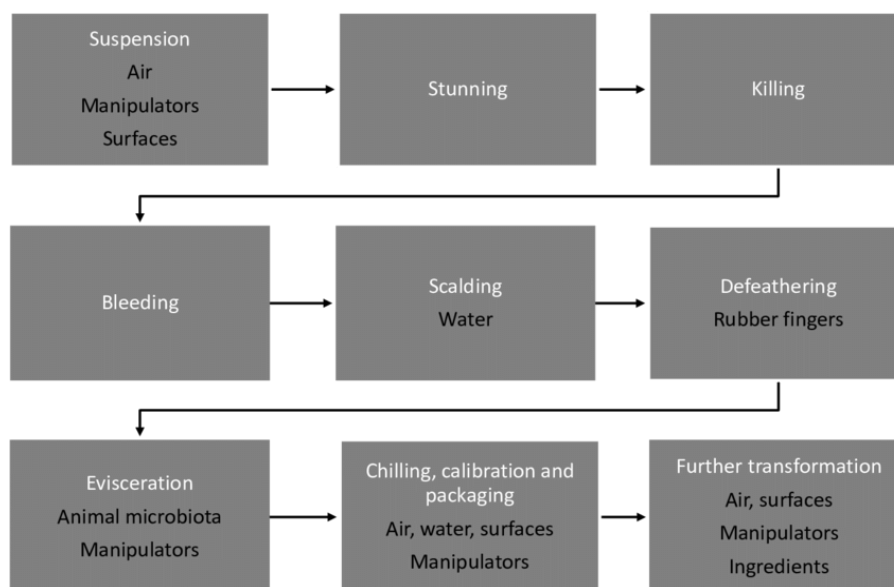
Η εφαρμογή του συστήματος HACCP στην παραγωγή πουλερικών θέτει ως βασικό στόχο των έλεγχων των παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, αποτελεί και ένα βασικό κομμάτι στην μείωση επιμόλυνσης των σφαγίων με αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Mead 2004). Στην πραγματικότητα, κατά την διάρκεια αλλά και μετά την σφαγή η μικροβιακή χλωρίδα του ζώου, το περιβάλλον σφαγής και ο εξοπλισμός μπορεί να επιμολύνουν τα σφάγια, τα τεμάχια και τα επεξεργασμένα κρέατα. Μερικές από αυτές τις βακτηριακές κοινότητες μπορεί να αναπτυχθούν ή να επιβιώσουν κατά την διάρκεια επεξεργασίας των τροφίμων και την περαιτέρω αποθήκευση τους (Rouger et al., 2017). Πολλά από αυτά τα βακτήρια είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες οικονομικές απώλειες (Nychas et al., 2008, 2016). Στην **Εικόνα 2** φαίνονται τα στάδια σφαγής των πουλερικών και οι παράγοντες που μπορεί να τα επιμολύνουν σε κάθε στάδιο. Οι πλύσεις με νερό κατά την διάρκεια της επεξεργασίας φαίνεται ότι ελαττώνουν τα βακτηριακά φορτία, αλλά παράλληλα ενισχύουν την διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ των σφαγίων (Göksoy et al., 2004, Russell, 2008). Πολλές από τις διαδικασίες μπορεί να μειώσουν την επιμόλυνση, αλλά μπορεί να υπάρχει επακόλουθη βακτηριακή ανάπτυξη η οποία πιθανόν να εμφανιστεί κατά την διάρκεια αποθήκευσης. Έρευνες έχουν δείξει ότι πολλά βακτήρια μπορεί να εμφανιστούν και 10 ημέρες μετά την αποθήκευση των σφαγίων σε θερμοκρασίες ψύξης (Hinton et al., 2004).

Θέμα βασικής ασφάλειας έγκειται και το κομμάτι της αλλοίωσης του κοτόπουλου κατά τη διάρκεια συντήρησης του. Η ποιότητα του κοτόπουλου μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου με αποτέλεσμα την υποβάθμιση του. Οι μεταβολές που υφίσταται το κοτόπουλο κατά την επεξεργασία και αποθήκευση του είναι βιοχημικές, χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές και συνδυαστικά επηρεάζουν την ποιότητα και ασφάλεια του προϊόντος (Nychas et al., 2008).

Μετά τη σφαγή, το κρέας κοτόπουλου θα πρέπει να ψυχθεί ώστε να μειωθεί και να διατηρηθεί η θερμοκρασία του κάτω από 4°C προκειμένου να εξασφαλιστεί η

υψηλή ποιότητα και η ασφάλεια του προϊόντος. Η ψύξη των σφαγίων λαμβάνει χώρα με στόχο την παραγωγή ασφαλούς προϊόντος, καθώς έτσι μειώνεται σχετικά ο ρυθμός ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Tuncer et al., 2008).

Γενικά, ο αποτελεσματικός έλεγχος των μικροοργανισμών (αλλοιογόνων και παθογόνων) επιτυγχάνεται μέσω της αποτελεσματικής προσέγγισης όλων των σταδίων που λαμβάνουν χώρα από την φάρμα μέχρι και την στιγμή που το προϊόν βρίσκεται στο πιάτο του καταναλωτή.



Εικόνα 2: Στάδια επεξεργασίας πουλερικών και παράγοντες που μπορεί να τα επιμολύνουν (Rouger et al., 2017).

1.3. Αλλοίωση

Το κρέας γενικά θεωρείται ένα από τα πιο ευαλλοίωτα προϊόντα λόγω της χημικής του σύστασης, η οποία ευνοεί την μικροβιακή ανάπτυξη σε μη αποδεκτά επίπεδα με αποτέλεσμα την αλλοίωση του προϊόντος. Η αλλοίωση προσδιορίζεται ως η αλλαγή στην ποιότητα του τροφίμου η οποία θα επιφέρει δυσάρεστες οσμές, αλλαγές στο χρώμα του προϊόντος καθώς και αλλαγές στην υφή οι οποίες καθιστούν το τρόφιμο μη αποδεκτό προς κατανάλωση (Blackburn, 2006, Lianou et al., 2016). Ωστόσο, οι αλλαγές αυτές θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα φυσικών και χημικών μεταβολών και αντιδράσεων (Gram et al., 2002, Ray and Bhunia 2013, Petrucci et al., 2017).

Παρά την ανάπτυξη της τεχνολογίας η αλλοίωση των τροφίμων παραμένει ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα (Petrucci et al., 2017). Έχει εκτιμηθεί ότι το 25% της συνολικής παραγωγής των τροφίμων απορρίπτεται λόγω της αλλοίωσης που προκαλείται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να υπάρχουν

μεγάλες οικονομικές απώλειες για τον παραγωγό, τον πωλητή και τον καταναλωτή (Cenci-Coga et al., 2014, Snyder & Worodo, 2018).

1.3.1. Αλλοίωση κοτόπουλου

Αρχικός δείκτης ένδειξης αλλοίωσης στο κρέας των πουλερικών είναι οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος που συνοδεύονται με την παραγωγή δυσάρεστων οσμών και γεύσεων, αλλαγών στο χρώμα του κρέατος, παραγωγή αερίων και εμφάνιση γλοιώδους υφής στην επιφάνεια του προϊόντος (Iulietto et al., 2015, Paramithiotis et al., 2009). Στις περισσότερες έρευνες το κριτήριο που προσδιορίζει την αλλοίωση είναι όταν το ολικό μικροβιακό φορτίο φτάσει την τιμή $7 \log \text{cfu/g}$ (Höll et al., 2016, Zhang et al., 2012). Κατά βάση η αλλοίωση των προϊόντων των πουλερικών είναι απόρροια υψηλών μικροβιακών φορτίων, τα οποία αποτελούν και την βασική αιτία για δυσάρεστη γεύση, οσμή, χρώμα και υφή (Rouger et al., 2017).

Ο τύπος της αλλοίωσης ποικίλει ανάλογα τον μικροοργανισμό που επικρατεί στο τρόφιμο, τα χαρακτηριστικά του τροφίμου (σύσταση σε σάκχαρα, λιπίδια, pH) και το περιβάλλον συντήρησης του (θερμοκρασία, σύσταση συσκευασίας) (Papadopoulou et al., 2011). Οι Ayres *et al.* (1950) κατέγραψαν ότι σε προϊόντα τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύξης ανιχνεύτηκε μυρωδιά παρόμοια με αυτήν του εστέρα και μάλιστα εμφανίστηκαν μικροβιακές αποικίες στο δέρμα, με αποτέλεσμα να υπάρχει η ανάπτυξη επιχρίσματος. Σε αυτό το στάδιο ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός είχε ξεπεράσει την τιμή των $8 \log \text{cfu/g}$. Οι Thornley *et al.* (1960) ανέφεραν την παραγωγή μυρωδιάς σε σφάγια κοτόπουλου αντίστοιχης με την μυρωδιά του σάπιου και της αμμωνίας. Σε αυτό το σημείο ο συνολικός μικροβιακός πληθυσμός ξεπερνούσε τους $7 \log \text{cfu/g}$.

Συνοπτικά κάποια από τα σημαντικότερα είδη αλλοίωσης στο κρέας των πουλερικών είναι τα εξής (Barbut, 2014):

- Δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών, καθώς τα βακτήρια όπως τα *Pseudomonas* spp. και τα οξυγαλακτικά βακτήρια προσδίδουν στο τρόφιμο οσμή σήψης.
- Σχηματισμός βλέννας από οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* και *Brochothrix thermosphacta*.
- Δημιουργία πράσινου χρώματος, η οποία προκαλείται από την παραγωγή H_2O_2 και H_2S στα φρέσκα και επεξεργασμένα προϊόντα από τα βακτήρια *Weissella viridescens*, *Leuconostoc*, *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis*. Αυτό οφείλεται στην οξείδωση των δακτυλίων της πορφυρίνης, η οποία οδηγεί στην αλλαγή του χρώματος από κόκκινο σε πράσινο με επακόλουθο τον σχηματισμό ενός πράσινου τμήματος είτε στην επιφάνεια του τροφίμου είτε σε όλο το τρόφιμο.
- Δημιουργία κίτρινων κηλίδων σε προϊόντα αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύξης τα οποία είναι επιμολυσμένα με το βακτήριο *Enterococcus casseliflavus*.

- Η οξίνιση σε αποθηκευμένα και επεξεργασμένα κρέατα οφείλεται στην ανάπτυξη βακτηρίων όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια, *Brochothrix thermosphacta* ή *Enterococci*, τα οποία προκαλούν ζύμωση διαφόρων σακχάρων. Η οξίνιση οφείλεται στην παρουσία ακετοΐνης, διακετυλίου και οξικού οξέως. Ο *Brochothrix thermosphacta*, κατά την συντήρηση του υπό αερόβιες συνθήκες, μεταβολίζει την γλυκόζη και την γαλακτόζη προς παραγωγή οργανικών οξέων, όπως οξικού, μυρμηκικού, ισοβουτυρικού οξέος, καθώς και αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα.
- Σε πολύ προηγμένα στάδια αλλοίωσης των πουλερικών, οι επιφάνειες συχνά φθορίζουν όταν φωτίζονται με υπεριώδη ακτινοβολία λόγω της παρουσίας μεγάλου πληθυσμού των *Pseudomonas fluorescens*.

1.3.2. Μεταβολές που συνδέονται με την μικροβιακή αλλοίωση

Καθώς η ανάπτυξη των μικροβίων ακολουθεί διαφορετικά μονοπάτια εξαρτώμενη πάντα από ποικίλους παράγοντες που θα εμφανιστούν, οι ανιχνεύσιμες επιδράσεις είναι πολλαπλές: ορατή ανάπτυξη μικροοργανισμών (γλίτσα, αποικίες), αλλαγές στην υφή (αποικοδόμηση πολυμερών) ή δυσάρεστες οσμές και γεύσεις (Borch et al., 1996, Gram et al., 2002, Nychas et al., 2008).

Τα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης στο κρέας εξαρτώνται από την διαθεσιμότητα ποικίλων υποστρωμάτων όπως: γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, αζωτούχες ενώσεις και ελεύθερα αμινοξέα που υπάρχουν στο κρέας ως κύριοι πρόδρομοι των μικροβιακών μεταβολιτών που ευθύνονται για την αλλοίωση (Nychas et al., 2008). Ανάλογα με τα μικροβιακά είδη και την συγγένεια τους με το οξυγόνο, αυτές οι ενώσεις θα παράγουν διαφορετικά καταβολικά παραπροϊόντα (**Πίνακας 3**).

Οι κυριότερες ποιοτικές ενδείξεις για την απόρριψη του κρέατος από τον καταναλωτή είναι ο έντονος αποχρωματισμός του, η δυσάρεστη οσμή και η ανάπτυξη επιφανειακής γλίτσας (Nychas et al., 2008). Στον **Πίνακα 4** που ακολουθεί γίνεται αντιληπτό ότι η αλλοίωση του κρέατος έχει δύο βασικούς άξονες, τη σήψη, η οποία οφείλεται στα Gram- βακτήρια και κυρίως αυτά του γένους *Pseudomonas* spp. και την οξίνιση η οποία προκαλείται από τα Gram+ βακτήρια (Κουρκούλη, 2020).

Πίνακας 3: Οργανοληπτικές μεταβολές που σχετίζονται με την δράση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (Pin et al., 2002, Nychas et al., 2008, Yang et al., 2014).

Οργανοληπτική μεταβολή	Βακτηριακό γένος/είδος
H ₂ S παραγωγή	<i>Vibrio</i> , Enterobacteriaceae

Οσμή σουλφιδίων	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Hafnia spp.</i>
H ₂ O ₂ , πράσινο χρώμα	<i>Weissella spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i>
H ₂ S , πράσινο χρώμα	<i>Shewanella spp.</i>
Σχηματισμός γλοιώδους επιφάνειας	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Weissella spp.</i> , <i>Brochothrix spp.</i>
Μαύρισμα στα κόκκαλα	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>

Πίνακας 4: Συστατικά που χρησιμοποιούνται από τα κυριότερα αλλοιογόνα βακτήρια στο κρέας υπο αερόβιες συνθήκες, παραγόμενοι μεταβολίτες και οργανοληπτική μεταβολή που προκαλούν (τροπ. Νυχάς, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις).

Βακτηριακό είδος	Υπόστρωμα	Παραγόμενοι μεταβολίτες	Οργανοληπτική μεταβολή
<i>Pseudomonas spp.</i>	Γλυκόζη, γλυκόζη-6-P, D- και L- γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, γλυκονικό οξύ, γλυκονικό- 6-P, αμινοξέα, κρεατίνη, κρεατινίνη, κιτρικό οξύ	Αμμωνία, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθυλ- και μεθυλ-εστέρες, πουτρεσκίνη, καδαβερίνη Εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης	Οσμή σήψης (putrid, sulphid) Δυσάρεστη γεύση Επιφανειακή γλίτσα Ανάπτυξη πράσινου χρώματος (λόγω ανάπτυξης της <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Γλυκόζη, αμινοξέα, ριβόζη, γλυκερόλη	Γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη, 3-μεθυλο- βουτανόλη, 3-μεθυλο- βουτανάλη, βουτανεδιόλη	Οσμή χαλασμένου τυριού
Enterobacteriaceae	Γλυκόζη, γλυκόζη-6-P, D- και L-	Αμμωνία, εστέρες, υδρόθειο, αμίνες	Οσμή σήψης

γαλακτικό οξύ			
Αμινοξέα			
Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB)	Γλυκόζη (και άλλες εξόζες τα ετεροζυμωτικά)	L- και D-γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη, υδρόθειο, H ₂ O ₂ , λιπαρά οξέα	Βουτυρώδης, υπόγλυκη, όξινη οσμή

1.3.2.1 Μεταβολές στην οσμή και στην γεύση

Το πτητικό σύστημα των μικροβιακών καταβολιτών περιλαμβάνει: ενώσεις θείου, κετόνες, αλδεΐδες, οργανικά οξέα, πτητικά λιπαρά οξέα, αιθυλικούς εστέρες, αλκοόλες, αμμωνία και άλλους μεταβολίτες. Εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πτητικών και μη-πτητικών ενώσεων, αυτά τα μόρια επηρεάζουν την οργανοληπτική ποιότητα ενός φρέσκου και ενός μαγειρεμένου κρέατος.

Κατά την αποθήκευση του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες δεν είναι σπάνιο να εμφανιστούν δυσάρεστες οσμές όμοιες με κάτι σάπιο, με τυρί ή με θειικό οξύ (Borch et al., 1996). Οι δυσάρεστες μυρωδιές είναι αντιληπτές από τους καταναλωτές όταν ο βακτηριακός πληθυσμός βρίσκεται μεταξύ 7-7.5 log cfu/g. *Pseudomonas* spp. και *Brochothrix thermosphacta* κατά κύριο λόγο συμβάλλουν στην δυσάρεστη οσμή εξαιτίας του μεταβολισμού τους (Nychas et al., 2008). Όταν η βακτηριακή ανάπτυξη φτάσει στους 8 log cfu/g, οι υδατάνθρακες εξαντλούνται και τα είδη της οικογένειας Pseudomonaceae σε συνδυασμό με τα ψυχρότροφα Gram αρνητικά βακτήρια αρχίζουν να χρησιμοποιούν τα αμινοξέα ως πηγή ενέργειας (Iulietto et al., 2015). Δυσάρεστες οσμές συνδέονται με τα ελεύθερα αμινοξέα και ενώσεις αζώτου (NH₃, ινδόλη, τρυπτοφάνη). Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης, ο *B. thermosphacta* παράγει άσχημες μυρωδιές όπως της ακετοΐνης και του οξικού οξέος (Koutsoumanis et al., 2006). Θεικές οσμές προέρχονται από το υδρόθειο που σχηματίζεται από Enterobacteriaceae και από το διμέθυλο-σουλφίδιο από *Pseudomonas* spp. Μυρωδιές σαν τυρί που προέρχονται από σχηματισμούς της ακετοΐνης και της 3-μέθυλο-βουτανόλης παράγονται από Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta* και *Lactobacillus* spp. (Casaburi et al., 2015).

1.3.2.2 Μεταβολές στο χρώμα

Η παρουσία βακτηρίων στην επιφάνεια του κρέατος είναι υπολογίσιμη όταν ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μεταξύ 7-8 log cfu/g. Το υδρόθειο που παράγεται από *L. sakei*, *H. alvei*, *S. putrefaciens*, μετατρέπει την μυϊκή χρωστική σε πράσινη σουλφομυογλοβίνη και αυτή η εμφάνιση είναι αποτέλεσμα της κατανάλωσης της

γλυκόζης. Η σουλφομουγλοβίνη δε σχηματίζεται σε αναερόβιες συνθήκες (Borch et al., 1996). Σύμφωνα με τους Dušková et al., 2013, οι μικροοργανισμοί όπως *Weissella viridescens*, μπορούν να μετατρέψουν το χρώμα του κρέατος σε πράσινο, εξαιτίας του σχηματισμού υπεροξειδίου του υδρογόνου, κατά την έκθεση του τροφίμου στο O₂.

1.3.2.3. Παραγωγή αερίων

Στο συσκευασμένο υπό κενό κρέας παρατηρείται συχνά αλλοίωση, η οποία χαρακτηρίζεται από παραγωγή αερίων (H₂, CO₂), δυσάρεστων οσμών, την παρουσία εξιδρωμάτων, εκτεταμένη πρωτεόλυση και αλλαγές στο pH και στο χρώμα, οδηγώντας έτσι σε σημαντικές οικονομικές απώλειες για τις βιομηχανίες παραγωγής κρέατος (Adam et al., 2010). Αυτή του είδους η αλλοίωση μπορεί να εμφανιστεί σε κρέατα τα οποία είναι συσκευασμένα υπό κενό και αποθηκευμένα σε θερμοκρασίες ψύξης και να προκληθεί από ψυχρόφιλα και ψυχρότροφα βακτήρια. Σύμφωνα με τους Rafael et al. (2012) πέρα από τα βασικά ψυχρότροφα είδη *Clostridium* που θεωρούνται οι κύριοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης σε αυτές τις συνθήκες, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και τα Enterobacteriaceae θεωρείται ότι μπορούν να αναπτυχθούν και να προκαλέσουν αλλοίωση στα προϊόντα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή πτητικών και οργανικών ενώσεων (Hernandez-Macedo et al., 2012). Επιπλέον, η συγκέντρωση CO₂ κατά την διάρκεια αποθήκευσης αυτών των προϊόντων, αποδίδεται στα μεταβολικά υποπροϊόντα των ετεροζυμωτικών *Lactobacilli* και *Leuconostocs*. Αυτό επίσης συνήθως χαρακτηρίζει και τις άσχημες μυρωδιές στα προϊόντα αυτά.

1.3.2.4. Ανάπτυξη γλοιώδους επιφάνειας

Τρόφιμα τα οποία είναι συσκευασμένα υπό κενό, μαγειρεμένα ή ο μικροβιακός τους πληθυσμός έχει ξεπεράσει τους 8 log cfu/g παρατηρείται η εμφάνιση βλέννας στην επιφάνεια τους. Κύρια βακτήρια που συντελούν στον σχηματισμό γλοιώδους επιφάνειας είναι τα *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp., *Weissella* spp., και *Brochothrix* spp. Bjorkroth και Korkeala (1997a,b) υποστήριξαν ότι η παραγωγή επιχρίσματος προσφέρει στα βακτήρια ένα βασικό πλεονέκτημα, καθώς συνιστά για αυτά ένα προστατευτικό στρώμα έτσι ώστε να διατηρούν την υγρασία τους.

Lactobacillus spp. και *Leuconostoc* spp. αποτελούν σχεδόν την μεγαλύτερη ομάδα μικροοργανισμών που προκαλούν αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επιπροσθέτως, *L.curvatus* και *L.sakei* συνιστούν τα πιο συχνά στελέχη, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό του επιχρίσματος στην επιφάνεια των τροφίμων (Ray and Bhumia, 2013).

1.3.3 Φυσικοχημικές μεταβολές κατά την αλλοίωση στο κοτόπουλο

Η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο οικοσύστημα του κρέατος προκαλεί φυσικοχημικές μεταβολές κατά την αλλοίωση του, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα υδατοδιαλυτά συστατικά του κρέατος όπως είναι το γαλακτικό οξύ, τα αμινοξέα, τα νουκλεοτίδια και οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Αυτά τα συστατικά λειτουργούν ως υποστρώματα από τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης, οδηγώντας στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων που υποβαθμίζουν την οργανοληπτική ποιότητα των προϊόντων κρέατος.

1.3.3.1 Μεταβολή του pH

Έπειτα από την σφαγή ξεκινά μια αλληλουχία πολύπλοκων φυσικοχημικών μεταβολών στο μυϊκό ιστό του κοτόπουλου. Γενικά η τιμή του pH του κρέατος κοτόπουλου πριν την σφαγή κυμαίνεται περίπου στο 7.0. Μέσω όμως της διάσπασης του γλυκογόνου, συσσωρεύεται γαλακτικό οξύ στο μυϊκό ιστό και η τιμή του pH μειώνεται στο 6.2- 6.6 (Enfors, 2008). Το φαινόμενο αυτό της νεκρικής ακαμψίας επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στη γεύση, το χρώμα και στην τρυφερότητα του κρέατος που θα προκύψει. Πρέπει να σημειωθεί ότι η χρονική διάρκεια της νεκρικής ακαμψίας στο κρέας κοτόπουλου είναι μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη κρέατος (1-4 h) (Dransfield and Sosnicki, 1999, Enfors, 2008). Βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την τιμή του pH μετά την σφαγή αποτελούν η ποσότητα του γλυκογόνου στους μύες, η θερμοκρασία περιβάλλοντος, ο βαθμός αφαίμαξης και η περιεκτικότητα του κρέατος σε λιπώδη και συνδετικό ιστό.

Γρήγορη και απότομη πτώση του pH παρεμποδίζει την ενζυματική δράση των καλπαϊνών με αποτέλεσμα να παρακωλύεται η αύξηση της τρυφερότητας του κρέατος των σφάγιων. Επιπρόσθετα, η μυοσίνη καθίσταται ευαίσθητη στη μετουσίωση, με συνέπεια τη μειωμένη ικανότητα συγκράτησης ύδατος και τη μειωμένη ένταση χρώματος στο κρέας (Dransfield and Sosnicki, 1999). Επίσης, μετά τη γλυκόλυση (στάδιο ωρίμανσης), η συμμετοχή των ενδογενών ενζύμων (καλπαΐνες και καθεψίνες) στην αλλοίωση του κρέατος είναι αμελητέα συγκριτικά με εκείνη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Nychas et al., 2008), τόσο ώστε ορισμένες φορές να είναι απαραίτητη η προσθήκη «τρυφεροποιητών» όπως NaCl σε συγκέντρωση 2 % (Βουδούρης και Κοντομηνάς, 2002).

1.3.3.2 Πρωτεόλυση

Η πρωτεόλυση είναι κυρίως μια διαδικασία που καταλύεται από μικροοργανισμούς που παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες), όπως είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Παρόλα αυτά, η παραγωγή πρωτεασών μπορεί να γίνει μόνο από ορισμένους μικροοργανισμούς και μόνο υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου.

Σε προχωρημένα στάδια αλλοίωσης, γίνεται αποδόμηση των πρωτεϊνών από πρωτεάσες και πεπτιδάσες και παράγονται πεπτίδια και α-αμινοξέα, ως μια πρόσθετη πηγή ενέργειας. Επιπλέον, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* με την παρουσία O₂ έχουν την ικανότητα καταβολισμού της κρεατίνης και κρεατινίνης, οι οποίες σε συνδυασμό με τα αμινοξέα, αποτελούν το υπόστρωμα για την ανάπτυξη δύσοσμων μεταβολιτών, όπως αμμωνία, θειούχες ενώσεις, αιθυλεστέρες, κετόνες και βιογενείς αμίνες.

1.3.3.3 Παραγωγή βιογενών αμινών

Όσον αφορά για τις βιογενείς αμίνες, πρόκειται για οργανικές βασικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που προκύπτουν μετά από αποκαρβοξυλίωση των ελεύθερων αμινοξέων των τροφίμων λόγω ενζυματικής επίδρασης βακτηρίων της μικροχλωρίδας αυτών. Το είδος και η ποιότητα των βιογενών αμινών εξαρτώνται από τα βακτηριακά είδη, τον πληθυσμό τους και τη θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου (Silvia and Gloria, 2002). Οι κυριότερες βιογενείς αμίνες που ανευρίσκονται σε προϊόντα πουλερικών είναι η πουτρεσκίνη, η καδαβερίνη, η τυραμίνη και η ισταμίνη και προσδίδουν πολύ δυσάρεστη οσμή (Silvia and Gloria, 2002). Η ισταμίνη παράγεται από ορισμένα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae (*Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Edwardsiella* spp.) και από ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. divergens*, *L. carnis*, *L. curvatus* και *L. hilgardii*) (Shalaby et al., 1996), ενώ η τυραμίνη παράγεται από βακτήρια του γένους *Streptococcus*, του είδους *Enterococcus faecalis*, κολοβακτηριοειδή και οξυγαλακτικά βακτήρια (κυρίως *L. divergens* και *L. carnis*). Από την άλλη, η καδαβερίνη παράγεται από βακτηριακά στελέχη της οικογενείας των Enterobacteriaceae και η πουτρεσκίνη είναι η κύρια βιογενής αμίνη που παράγεται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

1.3.3.4 Τάγγιση του λίπους-Οξείδωση και υδρόλυση λιπιδίων

Η τάγγιση του λίπους έχει ως προϊόντα ενώσεις που προκαλούν δυσάρεστη οσμή, γεύση, υφή, καταστροφή της συνεκτικότητας του μυϊκού ιστού και την υποβάθμιση της εμφάνισης και της διατροφικής αξίας του κρέατος (Fellenberg and Spreisky, 2006). Η τάγγιση του λίπους προκύπτει μέσω ενός συνόλου πολλών διαφορετικών αντιδράσεων (Enfors, 2008):

➤ Υδρόλυση λιπιδίων:

- Αυτοϋδρόλυση
- Λιπόλυση
 - Ενζυματική (με προϊόν ελεύθερα λιπαρά οξέα)
 - Μικροβιολογική (με προϊόν ελεύθερα λιπαρά οξέα)

➤ Οξειδωτική τάγγιση:

- Αυτοοξειδωση
- Καταλυόμενη από λιποξειδάσες (με προϊόντα αλδεΐδες, κετόνες και κυρίως μεθυλ-κετόνες)
- β-οξειδωση (με προϊόντα αλδεΐδες, κετόνες και κυρίως μεθυλ-κετόνες)

Η υδρόλυση των λιπιδίων παρόλο που είναι μία βραδεία διαδικασία, μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολύ γρήγορους ρυθμούς λόγω της παρουσίας λιπολυτικών ενζύμων (π.χ. παγκρεατική λιπάση) ή λιπολυτικών ενζύμων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (*Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens*, *Micrococcus spp.*, *Serratia marcesans*, *Arthrobacter spp.*) (Pawar et al., 2011).

Η οξειδωτική τάγγιση των λιπαρών οξέων προϋποθέτει την παρουσία ατμοσφαιρικού O_2 . Η αυτοοξειδωση καταλύεται από μεταλλικά ιόντα που δρουν ως προοξειδωτικά και από το φως. Συγκεκριμένα, το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με ιχνοστοιχεία μεταλλικών ιόντων Fe^{+2} και Cu^{+2} προς την δημιουργία ελευθέρων ριζών. Κατά την διαδικασία της αυτοοξειδωσης, ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίων (ROO^*) αντιδρούν γρήγορα με άλλα ελεύθερα λιπαρά οξέα (RH) παράγοντας ασταθείς ενώσεις, τα υδροϋπεροξειδία ($R-OOH$) που αποτελούν τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης. Η παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων μπορεί να μεταβάλλει το χρώμα του κρέατος του κοτόπουλου προκαλώντας πρασίνισμα, καφέ ή γκρίζες αποχρώσεις (Pawar et al., 2011). Έπειτα, γίνεται διάσπαση των $R-OOH$ σε αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες ή φουράνια (δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης) δίνοντας άσχημη γεύση στο κρέας και δυσάρεστη οσμή (Cortinas et al., 2005). Κατά το τελευταίο στάδιο σχηματίζονται πολυμερή επηρεάζοντας το χρώμα, την υφή και την γεύση του προϊόντος καθώς και την ασφάλειά του, αφού σχηματίζονται τοξικά προϊόντα (Βουδούρης και Κοντομηνάς, 2002).

Κατά την διατροφή των πουλερικών, συχνά γίνεται εμπλουτισμός των σιτηρεσίων με έλαια (π.χ. ιχθυέλαια) που είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου μπορεί να γίνει με την προσθήκη αντιοξειδωτικών στην δίαιτα των πουλερικών (Fellenberg and Speisky, 2006).

Η αιμοσφαιρίνη κατέχει καθοριστικό ρόλο στην εκκίνηση της αυτοοξειδωσης των λιπιδίων στο κρέας πουλερικών, καθώς ο αιμικός σίδηρος έχει καταλυτική επίδραση στην οξειδωτική αποδόμηση των PUFA. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο κρέας κοτόπουλου είναι σημαντική (0.24 mg/g στο στήθος και 0.67 mg/g στο μπούτι), οπότε κατά τη σφαγή ξεκινούν βιοχημικές αντιδράσεις που καταλύουν τη συμμετοχή της αιμοσφαιρίνης στην οξειδωτική τάγγιση (Fellenberg and Speisky, 2006). Τα φωσφολιπίδια είναι γενικά πιο επιρρεπή σε φαινόμενα αυτοοξειδωσης σε σχέση με άλλες κατηγορίες λιπιδίων, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς τους σε ω-6 λινελαϊκό οξύ.

Η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων και στη δεδομένη περίπτωση του αραχιδονικού οξέος (υπεύθυνο για την χαρακτηριστική γεύση των πουλερικών) είναι ουσιαστικά η μεταβολική πορεία της αποδόμησης του που οδηγεί στην παραγωγή ενός acetyl-CoA και ενός νέου λιπαρού οξέος. Στο τελευταίο στάδιο της β-οξειδωσης του αραχιδονικού οξέος, γίνεται παραγωγή υπεροξεικοσιτετρανοϊκού (μεθυλ-κετόνη) που προσδίδει χαρακτηριστική οσμή και γεύση τάγγισης, οδηγώντας έτσι σε υποβάθμιση της οργανοληπτικής ποιότητας του κρέατος (Pawar et al., 2011).

Οι λιποξυγενάσες αποτελούν ένζυμα στο μυϊκό ιστό του κρέατος, τα οποία όμως μπορούν να παραχθούν και από ορισμένους μύκητες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα οξειδώνουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λινελαϊκό, λινολενικό και αραχιδονικό οξύ σε υδροϋπεροξειδία, τα οποία με την σειρά τους διασπώνται σε αλδεΐδες και κετόνες με δυσάρεστη οσμή και γεύση.

1.3.3.5 Μεταβολές του χρώματος των πουλερικών

Το φυσιολογικό χρώμα του μυϊκού ιστού των κοτόπουλων μετά την σφαγή, ποικίλει από λευκό- ροζ έως σκούρο κόκκινο, ενώ το αντίστοιχο του δέρματος είναι λευκό-κρεμ ή κίτρινο. Το χρώμα του κοτόπουλου γενικά μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η φυλή, η περιεκτικότητα σε μυογλοβίνη, η διατροφή, η λιποπεριεκτικότητα, και ο τρόπος σφαγής-επεξεργασίας (Enfors, 2008). Το χρώμα του κρέατος ευθύνεται στη χρωστική μυοσφαιρίνη (Mb), η οποία είναι σύνθετη πρωτεΐνη του μυός, παρόμοια ως προς τη λειτουργικότητα με την αιμοσφαιρίνη, με τη διαφορά ότι η Mb αποτελεί το $\frac{1}{4}$ στερεοχημικά της αιμοσφαιρίνης. Η Mb έχει πορφυρό ερυθρό- ιώδες χρώμα και σε αυτή οφείλεται το επιθυμητό χρώμα του κρέατος μετά την σφαγή του ζώου. Οι μεταβολές στο χρώμα που παρατηρούνται κατά την διάρκεια της συντήρησης του κρέατος οφείλονται:

- στην πρόσληψη μοριακού οξυγόνου από την Mb (οξυγόνωση) με αποτέλεσμα την μετατροπή της σε οξυμυοσφαιρίνη (MbO₂), η οποία έχει φωτεινό κόκκινο χρώμα.
- στην περαιτέρω οξείδωση της MbO₂ σε μεταμυοσφαιρίνη (αύξηση του σθένους του αιμικού σιδήρου από Fe⁺² σε Fe⁺³), η οποία έχει καστανέρυθρο χρώμα.

Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κρέατος είναι υψηλή (φρέσκο κρέας) τότε η Mb οξυγονώνεται προς την MbO₂ που έχει ελκυστικό χρώμα, αλλά η συνεχής κατανάλωση του οξυγόνου από την μικροβιακή χλωρίδα οδηγεί σε μείωση της σχετικής πίεσης και σε διεύσδυση του οξυγόνου στο εσωτερικό του μυϊκού ιστού, ευνοώντας το σχηματισμό της καφέ μεταμυοσφαιρίνης.

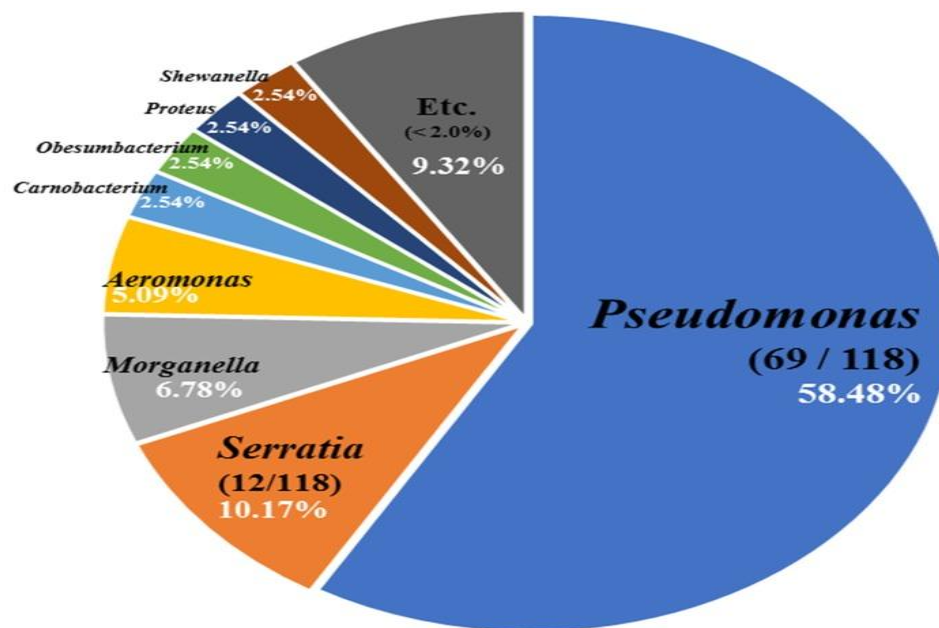
Η μυογλοβίνη φαίνεται να διαφέρει στα διάφορα μέρη του κοτόπουλου, καθώς το πόδι και το μπούτι, τα οποία εμπεριέχουν ένα υψηλό ποσοστό από κόκκινες μυϊκές ίνες σε σύγκριση με το στήθος που εμπεριέχει λευκές μυϊκές ίνες, έχουν μεγαλύτερα ποσοστά σε μυογλοβίνη (Wideman et al., 2016). Επίσης, κατά την σφαγή μεγάλων ηλικιακών ζώων, φαίνεται ότι το χρώμα επηρεάζεται από την

ηλικία των ζώων και σκουραίνει λόγω της αυξημένης ποσότητας σε μυογλοβίνη (Froning et al., 1968).

1.3.4. Βακτήρια που συμμετέχουν στην αλλοίωση του κοτόπουλου

Η επιβίωση και η ανάπτυξη συγκεκριμένων αλλοιογόνων μικροοργανισμών μπορεί να επηρεαστεί από την ποικιλομορφία των οικοφυσιολογικών παραγόντων στο φυσικό και χημικό περιβάλλον. Αυτοί οι παράγοντες, περιλαμβανομένων της σύστασης του κρέατος, τη θερμοκρασία, το pH, τις συνθήκες συσκευασίας και της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας αποτελούν το βασικό κομμάτι για την διατήρηση της ποιότητας του κρέατος (Koutsoumanis et al., 2006, Lambert et al., 1991).

Τα βακτήρια εκείνα που ανευρίσκονται κυρίως στο κρέας κοτόπουλου είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που αντιπροσωπεύονται κυρίως από τα είδη *P. fragi*, *P. lundensis* και *P. fluorescens* (Arnaut-Rollier et al., 1999a,b). Άλλο βακτήριο που μερικές φορές παρουσιάζεται στο κοτόπουλο είναι το είδος *Shewanella putrefaciens*. Αναφορικά με βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae, τα κύρια γένη είναι *Hafnia* (*Hafnia alvei*, *H. paralvei*), *Serratia* (*Serratia fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. proteamaculans* και *S. quinivorans*), *Rahnella*, *Yersinia* και *Buttiauxella* (Säde et al., 2013). Είδη των γενών *Enterococcus* και *Lactobacillus*, όπως *Enterococcus viikkiensis*, *E. saigonensis* και *Lactobacillus oligofermentans*, έχουν επίσης εντοπιστεί σε προϊόντα κρέατος κοτόπουλου (Koort et al., 2005, Rahkila et al., 2011, Harada et al., 2016). Το βακτηριακό είδος *Brochothrix thermosphacta* έχει επίσης καταγραφεί σε κρέας κοτόπουλου. Επιπλέον, η δυνητική αλλοίωση από *Aeromonas salmonicida* και *S. liquefaciens* έχει επίσης εκτιμηθεί (Wang et al., 2017). Περαιτέρω έρευνα βασισμένη σε αναλύσεις με αισθητήρες και μοριακές αναλύσεις ή στον χαρακτηρισμό της μεταβολικής δραστηριότητας διαφόρων ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) (*Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* και *Lactobacillus oligofermentans*) επιβεβαίωσαν το ρόλο τους στην αλλοίωση (Andreevskaya et al., 2015, Jämskeläinen et al., 2013, Jämskeläinen et al., 2015). Από πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους Hee Soo Lee et al. (2017), σχετικά με την αλλοίωση στο κοτόπουλο, φάνηκε ότι από 118 στελέχη από ψυχρότροφα βακτήρια που απομονώθηκαν, το 58.48 % αντιστοιχούσε στο είδος *Pseudomonas* spp., το 10.17 % στο *Serratia* spp. και το 6.78 % στο *Morganella* spp. (Εικόνα 3). Στο σύνολο και στα πλαίσια του πειράματος αυτού ταυτοποιήθηκαν 16 διαφορετικά είδη από *Pseudomonas* (Πίνακας 5).



Εικόνα 3: Σύνθεση των κυριότερων βακτηρίων που απομονώθηκαν από αλλοιωμένο κρέας κοτόπουλου (Hee Soo Lee et al., 2017).

Πίνακας 5: Είδη του γένους *Pseudomonas* που απομονώθηκαν από αλλοιωμένο κρέας κοτόπουλου (Hee Soo Lee et al., 2017).

Είδη του γένους <i>Pseudomonas</i>	Αριθμός στελεχών
<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i>	17
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	13
<i>Pseudomonas fragi</i>	11
<i>Pseudomonas lundensis</i>	8
<i>Pseudomonas gessardii</i>	4
<i>Pseudomonas congelans</i>	2
<i>Pseudomonas synxantha</i>	2
<i>Pseudomonas tremae</i>	2
<i>Pseudomonas trivialis</i>	2
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	2
<i>Pseudomonas caeni</i>	1
<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	1
<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	1
<i>Pseudomonas koreensis</i>	1
<i>Pseudomonas poae</i>	1
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	1
Σύνολο	69

Συνοψίζοντας, η αλλοιογόνος μικροχλωρίδα νωπού κοτόπουλου, το οποίο διατηρείται σε συνθήκες ψύξης κάτω από αερόβιες ή συνθήκες τροποποιημένης

ατμόσφαιρας, αποτελείται κυρίως από τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae και εκείνα του γένους *Pseudomonas*, τα οποία μάλιστα φαίνεται να κυριαρχούν σε μεγαλύτερο βαθμό (Rouger et al., 2017). Η παρούσα πτυχιακή μελέτη επικεντρώθηκε σε αυτές τις κύριες ομάδες βακτηρίων και λιγότερο σε ζύμες και μύκητες.

1.3.4.1 Κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στο κοτόπουλο

1.3.4.1.1 *Pseudomonas* spp.

Η ψευδομονάδα ανήκει στους ψυχρότροφους, αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς και έχει μορφολογία ραβδίων. Αποτελεί ένα ιδιαίτερο διαδεδομένο γένος βακτηρίων και είναι αερόβιο ή προαιρετικά αερόβιο μη σπορογόνο μικρόβιο. Τα πιο συνήθη είδη, που συναντώνται σε ζωικό ιστό και συνδέονται άμεσα με την αλλοίωση του είναι τα *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas syringae* και *Pseudomonas aeruginosa* (Adams and Moss, 2008). Έπειτα από φαινοτυπικό και μοριακό χαρακτηρισμό των ψυχρότροφων βακτηρίων που απομονώθηκαν από φρέσκο και αλλοιωμένο κρέας κατέληξαν σε τρία κυρίαρχα είδη ψευδομονάδων, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas ludensis*. Λόγω της ικανότητας του γένους *Pseudomonas* spp. να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης, έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες προκειμένου να επιμηκυνθεί ο χρόνος ζωής του κρέατος, κατά την αποθήκευση του υπό ψύξη σε αερόβιες (Li et al., 2006, Papadopoulou et al., 2011, Bruckner et al., 2012). Σε αερόβιες συνθήκες, η *Pseudomonas* spp. φαίνεται να αποτελεί την κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροχλωρίδα, με τελικό πληθυσμό μεγαλύτερο των 8 log cfu/g σε διάφορα είδη κρέατος. Τα περισσότερα είδη των ψευδομονάδων διαθέτουν μηχανισμούς για να χρησιμοποιούν διάφορες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων ποικίλων υδατανθράκων, για την ανάπτυξή τους. Στα πουλερικά, το λίπος είναι διαμοιρασμένο κάτω από το δέρμα και την κοιλιακή κοιλότητα, με την αλλοίωση να εντοπίζεται γενικότερα στο δέρμα, σε δέρμα συνδεδεμένο με λίπος και στα εξωτερικά μέρη των μυών. Στα προχωρημένα στάδια αλλοίωσης των πουλερικών, οι επιφάνειες συνήθως φθορίζουν όταν προσπέσει υπεριώδης ακτινοβολία λόγω της παρουσίας μεγάλων αριθμών του στελέχους *Pseudomonas fluorescens* (Jay, 2005).

Βασική ένδειξη της αερόβιας αλλοίωσης ενός ζωικού ιστού από το γένος *Pseudomonas* είναι η δυσάρεστη μυρωδιά σήψης (putrid, sulphid), η δυσάρεστη γεύση και η εμφάνιση ενός πολυσακχαρίτη με γλοιώδη υφή στην εξωτερική επιφάνεια του ιστού (Ellis and Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007). Η υφή αυτή αποδίδεται στις μεταβολικές δραστηριότητες των *Pseudomonas* spp., όταν ο πληθυσμός τους ξεπεράσει τους 7- 8 log cfu/g (Nychas et al., 2008). Ταυτόχρονα, η

δυσάρεστη οσμή στον αλλοιωμένο ιστό οφείλεται στην παραγωγή αιθυλεστέρων, αμμωνίας, θειούχων και δισουλφιδικών ενώσεων (Borch et al., 1996) από τις ψευδομονάδες, λόγω της έλλειψης ενώσεων μικρού μοριακού βάρους όπως η γλυκόζη και του περιορισμού σε αμινοξέα (Nychas et al., 2007, 2008).

Ένα επιλεκτικό υπόστρωμα που είναι διαθέσιμο για την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* και έχει περιγραφεί και δοκιμαστεί σε δείγματα κοτόπουλου από τους Mead και Adams (1997) είναι το CFC Agar (*Pseudomonas* Agar Base), το οποίο στα συστατικά του περιέχει cephaloridine, fucidin και cetrimide. Στο θρεπτικό αυτό υπόστρωμα επιτρέπεται η ανάπτυξη τόσο έγχρωμων όσο και άχρωμων αποικιών *Pseudomonas* διαμέτρου 2-5 mm, χωρίς να αναπτύσσονται άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια (με μικρή πιθανότητα ανάπτυξης *Shewanella putrefaciens*) (Mead, 1985).

1.3.4.1.2 Enterobacteriaceae

Τα εντεροβακτήρια αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια αρνητικών κατά Gram και μη-σπορογόνων βακτηρίων που είναι αρνητικά στην δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στη δοκιμή της καταλάσης. Τα μέλη των Enterobacteriaceae είναι βάκιλλοι (σε σχήμα ράβδου) και έχουν τυπικά μήκος 1-5 μm. Ορισμένα γένη φέρουν πολλά μαστίγια που χρησιμοποιούνται για την μετακίνηση τους, ενώ άλλα δεν έχουν μηχανισμούς κίνησης. Τα περισσότερα μέλη Enterobacteriaceae έχουν περιτριχικά κροσσάρια τύπου I που εμπλέκονται στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στους ξενιστές τους (Prauser, 1985). Τα Enterobacteriaceae ζυμώνουν μια ποικιλία υδατανθράκων, αλλά η ικανότητα που έχουν να παράγουν οξύ και αέρια από την ζύμωση της D- γλυκόζης αποτελεί ένα χαρακτηριστικό που παραμένει μια σημαντική διαγνωστική ιδιότητα και χρησιμοποιείται συχνά ως βάση για την ανίχνευση και καταμέτρηση τους (Baylis, 2011).

Η οικογένεια των Enterobacteriaceae περιλαμβάνει ένα σημαντικό αριθμό από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* (περιλαμβανομένου και το είδος *E.coli* O157:H7), *Shigella* spp. και *Cronobacter* spp. Επιπλέον, ορισμένα είδη της οικογένειας των Enterobacteriaceae φαίνεται ότι συνδέονται και με την αλλοίωση διαφόρων τροφίμων όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, κρέατα, πουλερικά, αβγά, γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρια και διάφορα άλλα είδη θαλασσινών. Τα Enterobacteriaceae μπορεί να εμφανιστούν ως φυσική μικροχλωρίδα σε διάφορα είδη φαγητών ή να είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης κατά την επεξεργασία και αποθήκευση των τροφίμων. Διάφορα είδη όπως *Proteus*, *Escherichia* και *Salmonella* μπορούν να εισέλθουν στο φαγητό διαμέσου των κοπράνων και αυτά τα είδη συνδέονται κυρίως με συγκεκριμένα φαγητά όπως το κρέας και τα πουλερικά. Η ανάπτυξη και η μεταβολική δραστηριότητα των Enterobacteriaceae στα φαγητά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δυσάρεστων οσμών, γεύσεων, αλλαγές στο χρώμα και άλλες οργανοληπτικές αλλοιώσεις. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να προκύψουν από την

ενζυματική διάσπαση των πρωτεϊνών ή λιπιδίων, από την παραγωγή πτητικών ουσιών και την παραγωγή αερίων. Η ανάπτυξη των Enterobacteriaceae στο κρέας και στα πουλερικά ευνοείται κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία των 5 °C και πάνω. Τα Enterobacteriaceae στα φρέσκα κρέατα μπορούν να χρησιμοποιήσουν την γλυκόζη και τους υδατάνθρακες και όταν αυτά εξαντληθούν μπορούν στη συνέχεια να κάνουν χρήση ελεύθερων αμινοξέων και σχετικά απλών αζωτούχων ενώσεων. Όταν συμβαίνει αυτό, εμφανίζονται δυσάρεστες μυρωδιές και η αλλοίωση είναι εμφανής. Οι δυσάρεστες μυρωδιές στο κρέας γενικά συνδέονται με τη διάσπαση των αμινοξέων προς απόδοση σε H₂S (υδρόθειο), το οποίο είναι ένα προϊόν αμινοξέων που περιέχει θείο και αμμωνία (NH₃).

Η οικογένεια Enterobacteriaceae περιλαμβάνει ψυχρότροφα, μεσόφιλα και θερμοανθεκτικά είδη βακτηρίων. Στην πλειοψηφία περιέχει κυρίως μεσόφιλα βακτήρια, τα οποία αναπτύσσονται σε ένα θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 15 και 40 °C. Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των 37 °C είναι τυπική για τα Enterobacteriaceae. Τα Enterobacteriaceae είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα κατά την κατάψυξη, η οποία μάλιστα προκαλεί υποθανατώδη βλάβη μαζί με μια περαιτέρω σταδιακή απενεργοποίηση τους κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης. Ωστόσο, ορισμένα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν και να παραμείνουν βιώσιμα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Γι' αυτό το λόγο η κατάψυξη δεν αποτελεί ένα αξιόπιστο μέτρο ελέγχου κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των τροφίμων.

Για την ταυτοποίηση και καταμέτρηση των Enterobacteriaceae, χρησιμοποιείται κυρίως το θρεπτικό υπόστρωμα ενσωμάτωσης Violet Red Bile Glucose agar (VRBGA), το οποίο επωάζεται σε θερμοκρασία 30- 37 °C για 24 ώρες και οι αποικίες που εμφανίζονται έχουν τυπικά ένα κόκκινο προς μωβ χρώμα με φωτοστέφανο τριγύρω τους.

1.3.4.1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια, LAB

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι θετικά κατά Gram, μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβια και αυστηρά ζυμωτικά. Θεωρούνται ετερογενής ομάδα μικροοργανισμών που απαρτίζεται από δύο βασικές υπο-ομάδες βακτηρίων, τα ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά. Οι ομάδες αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη μεταβολική οδό που ακολουθούν, καθώς η πρώτη μετατρέπει μέσω του γλυκολυτικού σχήματος Embden-Meyerhof, τη γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ (90%) και η δεύτερη την γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα μέσω του κύκλου των φωσφοροπεντοζών (Nychas et al., 2007, Παπαδοπούλου, 2013).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται ανθεκτικά προς το οξυγόνο και συχνά ανιχνεύονται σε κρέατα τα οποία είναι αποθηκευμένα κάτω από αερόβιες συνθήκες, χωρίς όμως να αποτελούν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο παράγοντα σε αυτές τις συνθήκες (EFSA Journal, 2016). Ωστόσο, τα συγκεκριμένα βακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε κρέατα τα οποία

αποθηκεύονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες (τροποποιημένες ατμόσφαιρες ή συσκευασίες υπό κενό) και αποτελούν το βασικό πρόβλημα για την αλλοίωση του κρέατος κάτω από αυτές τις συνθήκες (Andreevskaya et al., 2015). Οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες φαίνεται ότι δημιουργούν μια θετική επιλεκτική πίεση για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), τα οποία είναι ανθεκτικά στις υψηλές συγκεντρώσεις του CO₂ (Borch et al., 1996, Gram et al., 2002). Επιπλέον, σε αυτές τις συνθήκες, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) προκαλούν στο τρόφιμο οργανοληπτικές αλλοιώσεις στην υφή, στο χρώμα και συντελούν στο σχηματισμό γλοιώδους υφής, αερίων, βιογενών αμινών και πτητικών οργανικών ενώσεων. Τα βακτήρια εκείνα τα οποία συνδέονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό με αυτές τις οργανοληπτικές αλλαγές είναι κυρίως τα *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus sakei* και *Lactobacillus curvatus* (Iulietto, 2015). Γενικά, αυτού του είδους η αλλοίωση εμφανίζεται τυπικά όταν ο μικροβιακός πληθυσμός ανέλθει στους 8 log cfu/g και χαρακτηρίζεται κυρίως από ξίνισμα του προϊόντος παρά σήψης του προϊόντος. Αυτή η έντονη βουτυρώδης/όξινη οσμή οφείλεται στη παραγωγή ακετοΐνης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και στην αυξημένη συγκέντρωση του οξικού οξέος κατά τη στατική φάση ανάπτυξης τους (Borch et al., 1996, Ellis & Goodacre, 2001). Παράλληλα, παρατηρείται και η παραγωγή διαφόρων άλλων μεταβολικών προϊόντων, όπως είναι το γαλακτικό οξύ, το μυρμηκικό, το διακετύλιο, η αιθανόλη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Nychas et al., 2008). Τα πιο συχνά γένη που απαντώνται σε κρέας το οποίο είναι συσκευασμένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή σε κενό, είναι τα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* και *Weissella* (Doulgeraki et al., 2010, Paramithiotis et al., 2009). Το πιο συχνό είδος που συναντάται σε τρόφιμα υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες, περιλαμβανομένων το βοδινό κρέας, τα πουλερικά, το χοιρινό και τα ψάρια είναι το *Lactococcus piscium*. Το συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμού, φαίνεται ότι αποτελεί την κυρίαρχη μικροχλωρίδα στα τρόφιμα που προαναφέρθηκαν κατά το τέλος της διάρκειας της ζωής τους.

1.3.4.1.4 *Brochothrix thermosphacta*

Τα κύτταρα του γένους *Brochothrix* είναι ραβδία χωρίς διακλαδώσεις και απαντούν μεμονωμένα υπό μορφή αλυσίδων μικρού μήκους ή μακρών νηματίων αναδιπλωμένων σε μάζες. Είναι μη-σπορογόνα, θετικά κατά Gram, ανίκανα για κίνηση και μη αιμολυτικά. Επίσης, είναι αερόβια ή προαιρετικώς αναερόβια, μεσόφιλα και ικανά να αναπτυχθούν σε όλο το εύρος της θερμοκρασίας από 0-30 °C, ενώ έχουν άριστο όριο ανάπτυξης τους 20-25 °C. Ως προς το τεστ καταλάσης είναι θετικά και τα κυτοχρώματα ζυμώνουν τη γλυκόζη σχηματίζοντας L(+) γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, ακετόνη και άλλα προϊόντα.

Από το γένος αυτό έχει αναγνωριστεί ένα είδος, το *Brochothrix thermosphacta*, το οποίο έχει όλα τα χαρακτηριστικά του γένους και σχηματίζει οξέα με χρήση πηγών άνθρακα μέσω των δύο βασικών μεταβολικών μονοπατιών (Borch et al.,

1996, Nychas et al., 2007), όπως η γλυκόζη και η γαλακτόζη, με εξαίρεση τη σορβόζη.

Το *Brochothrix thermosphacta* μπορεί να είναι ανθεκτικό στο οξυγόνο και να ανιχνεύεται σε προϊόντα κρέατος που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασίες ψύξης, αλλά γενικά φαίνεται ότι αποτελεί έναν από τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς σε προϊόντα τα οποία είναι αποθηκευμένα υπό αναερόβιες συνθήκες (πχ σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες ή σε συσκευασίες υπό κενό (EFSA Journal, 2016). Παρόλα αυτά, κατά την συντήρηση των προϊόντων υπό κενό, δεν θεωρείται ως ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός λόγω της απότομης ανάπτυξης του γένους των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Επιπλέον, σε παρουσία υψηλού ποσοστού O₂ και CO₂, ο *Brochothrix thermosphacta* εμφανίζεται ως ο κύριος υπεύθυνος της αλλοίωσης σε διάφορα κρέατα, όπως τα κόκκινα κρέατα και τα πουλερικά (Drosinos and Board, 1994, Lambropoulou et al., 1996, Estelles-Lopez et al., 2016, Höll et al., 2016).

Χαρακτηριστική οσμή αλλοιωμένου μυϊκού ιστού, από τον *Brochothrix thermosphacta*, είναι η υπόξινη ή η οσμή χαλασμένου τυροκομικού προϊόντος, η οποία οφείλεται στην ακετοΐνη, στο διακετύλιο και στο οξικό οξύ. Κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες, ο μικροοργανισμός μεταβολίζει τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη προς παραγωγή οργανικών οξέων, όπως οξικού, μυρμηκικού, ισοβουτυρικού καθώς και ως προς τη παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Από την άλλη, κατά τη συντήρηση υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες και πιο συγκεκριμένα υπό την υψηλή παρουσία O₂, παράγεται από τη γλυκόζη L- γαλακτικό και οξικό οξύ (Nychas et al., 2007, Dave and Ghaly, 2011). Η παρουσία και τα επίπεδα του O₂ και του CO₂, χαμηλά ή υψηλά, διαδραματίζουν έναν καθοριστικό ρόλο, διότι η παρουσία υψηλού O₂ και υψηλού CO₂ σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ευνοούν όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω την ανάπτυξη του *Brochothrix thermosphacta*, ενώ η παρουσία χαμηλού O₂ και υψηλού CO₂, ευνοούν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) (Kakouri and Nychas, 1994, Nychas et al., 2007). Κατά αυτό τον τρόπο διακρίνεται ποιος είναι ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

1.3.5 Επίδραση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την διαδικασία αλλοίωσης του κοτόπουλου

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται στα τρόφιμα συνδέεται άμεσα με πολλούς παράγοντες, όπου μερικοί από αυτούς είναι ενδογενείς και άλλοι εξωγενείς, αλλά όλοι τους επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συντελούν στην αλλοίωση των προϊόντων (Cenci-Coga, 2012). Οι κυριότεροι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την διάρκεια ζωής των προϊόντων κρέατος και ευνοούν την ανάπτυξη ορισμένων βακτηριακών στελεχών είναι: οι συνθήκες

συσκευασίας, η θερμοκρασία αποθήκευσης, η σύνθεση των προϊόντων (παρουσία λιπιδίων, περιεκτικότητα σε NaCl, a_w , pH) και άλλοι παράγοντες, όπως τα βιοπροστατευτικά (Nychas et al., 2008, Remenant et al., 2015).

1.3.5.1 Ενδογενείς παράγοντες

1.3.5.1.1 Σύσταση προϊόντος

Το κρέας αντιπροσωπεύει ένα φυσικό οικοσύστημα, στο οποίο πλεονεκτικές και μη πλεονεκτικές καταστάσεις καθορίζουν την επιβίωση και ανάπτυξη συγκεκριμένων στελεχών. Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται ενέργεια για τον μεταβολισμό τους, συγκεκριμένα υποστρώματα στα οποία μπορούν να συντεθούν και συστατικά αναγκαία για την σύσταση των κυττάρων τους. Όλα αυτά τα απαραίτητα στοιχεία συλλέγονται από το περιβάλλον του τροφίμου και η παρουσία τους επιτρέπει την επιβίωση των μικροοργανισμών κατά την διάρκεια της φάσης ανάπτυξης τους (Cenci-Coga, 2012). Γενικότερα, το κρέας είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, λιπίδια και βιταμίνες και πιο συγκεκριμένα το κρέας των πουλερικών έχει υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και παρέχει πηγές άνθρακα και ενέργειας που ευνοούν την ανάπτυξη των μικροβίων.

1.3.5.1.2 pH

Το pH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την αλλοίωση καθώς το κάθε είδος μικροοργανισμού αναπτύσσεται σε συγκεκριμένα όρια. Κατά την διάρκεια σφαγής το pH λαμβάνει την τιμή 5.4- 5.8, ενώ τιμές $pH > 6$ υποδηλώνουν ότι το ζώο έχει υποφέρει από καταστάσεις στρες πριν και κατά την διάρκεια της σφαγής (σκούρο και σκληρό κρέας). Μέσα από έρευνες φαίνεται ότι υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ του pH και της αλλοίωσης του προϊόντος (Alonso-Calleja et al., 2004). Έχει αποδειχθεί ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται καλύτερα σε τιμές pH γύρω στο 7.0 (6.6- 7.5). Μάλιστα, τα βακτήρια τείνουν να είναι πιο ευαίσθητα σε μεταβολές pH σε σχέση με τις ζύμες και τους μύκητες.

Η παρουσία λιπώδους ιστού και η υψηλή τιμή pH στο κρέας έχει ως αποτέλεσμα την πιο γρήγορη αλλοίωση, εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξης των βακτηρίων και της κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών (Ray and Bhunia, 2013). Έρευνες έχουν δείξει ότι η υψηλή τιμή pH στα σκούρα κρέατα μπορεί να οδηγήσει στην πιο γρήγορη ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών και να μειώσει την διάρκεια ζωής του προϊόντος (Allen et al., 1997, 1998).

Ο Fletcher (1999) ανέφερε ότι η τιμή του pH στο κρέας επηρεάζει και το χρώμα του κρέατος, καθώς υψηλές τιμές έχουν ως αποτέλεσμα πιο σκούρο χρώμα στο κρέας. Πιο συγκεκριμένα, οι Wattanachant et al. (2004) βρήκαν ότι το μπούτι του κοτόπουλου έχει $pH = 6.62$, ενώ το στήθος λαμβάνει τιμή $pH = 5.93$. Σύμφωνα με έρευνες ο μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) να παράγει ενώσεις όπως γαλακτικό οξύ, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του pH, ενώ όπου δεν υπάρχει

η ανάπτυξη αποικιών από οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) η τιμή του pH αυξάνεται (Pogasic et al., 2015). Επιπλέον, στην πλειονότητα οι ψευδομονάδες παράγουν έναν τύπο πρωτεΐνωσης, τις μεταλλοπρωτεΐνες, όταν το pH κυμαίνεται στο 6.5- 8 (Fairbairn and Law, 1986). Αυτή η πρωτεΐνωση υδρολύει τις πρωτεΐνες του κρέατος κοτόπουλου και προκαλεί την αλλοίωση (Fairbairn and Law, 1986, Nowak et al., 2012). Εν ολίγοις, τα περισσότερα κρέατα όπως και το κοτόπουλο, έχουν τιμές όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω που κυμαίνονται από 5.6 και πάνω, κάτι το οποίο το καθιστά ευαίσθητο σε αλλοιώσεις που προκαλούνται από βακτήρια, ζύμες και μύκητες (Jay, 2005).

1.3.5.1.3 Ενεργότητα ύδατος, υγρασία και περιεκτικότητα σε αλάτι

Το NaCl αποτελεί ένα από τα βασικά συντηρητικά που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία των τροφίμων, καθώς έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες και μειώνει την ενεργότητα ύδατος του νερού. Επίσης, η προσθήκη άλατος στα προϊόντα κρέατος βελτιώνει την ικανότητα συγκράτησης νερού και την γεύση των προϊόντων (Mariutti and Bragagnolo, 2017). Πιο συγκεκριμένα μέσω της προσθήκης αυτής, η a_w πέφτει από 0.99 σε 0.97, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη των *Pseudomonas* και *Enterobacteriaceae*, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και οι μύκητες αναπαράγονται. Ωστόσο, η καμπύλη ανάπτυξης και η φάση προσαρμογής των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) μπορεί να επηρεαστούν από την μείωση της a_w .

Στα φρέσκα κρέατα η τιμή της a_w κυμαίνεται προσεγγιστικά στο 0.99 (ICMSF, 1998), το οποίο μειώνεται κατά την διάρκεια της ψύξης στα στάδια σφαγής και λαμβάνει τιμή γύρω στο 0.96- 0.97 (Reid et al., 2015). Το κρέας των πουλερικών λαμβάνει υψηλή τιμή a_w (0.98- 0.99), πράγμα που επιτρέπει την επιβίωση και την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους βακτηρίων, τα οποία είναι ικανά να αναπτυχθούν στο κρέας και στην επιφάνεια των σφαγίων (Casaburi et al., 2015).

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν ευνοούνται σε περιβάλλοντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Από την άλλη, σύμφωνα με Plavsic et al. (2015), οι μύκητες προτιμούν για την ανάπτυξη τους περιβάλλοντα με μειωμένη υγρασία, με χαμηλή a_w και υψηλή θερμοκρασία.

1.3.5.2. Εξωγενείς παράγοντες

Οι παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον στο οποίο το τρόφιμο συντηρείται αναφέρονται ως εξωγενείς παράγοντες και περιλαμβάνουν (Hamad, 2012):

- τη θερμοκρασία αποθήκευσης και τον χρόνο αποθήκευσης του τροφίμου στην ανάλογη θερμοκρασία.
- συνθήκες συσκευασίας και σύσταση αερίων στην ατμόσφαιρα που περιβάλλει το τρόφιμο.

Δεδομένου ότι στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στην ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών

στο μπούτι κοτόπουλου, παρακάτω θα παρατεθούν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη συγκεκριμένη περιβαλλοντική παράμετρο.

1.3.5.2.1 Θερμοκρασία

Ο σημαντικός ρόλος της θερμοκρασίας στην βακτηριακή ανάπτυξη μπορεί να αξιολογηθεί κυρίως από δύο βασικά κρίσιμα σημεία, τα οποία περιλαμβάνουν τις θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν κατά την σφαγή, επεξεργασία και διανομή αλλά και την κατανάλωση του προϊόντος (Rouger et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα αφορούν:

- την διαχείριση της θερμοκρασίας του σφαγίου (θερμοκρασίες οι οποίες δεν ξεπερνούν τους 4-10 °C το πολύ)
- την διαχείριση της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια αποθήκευσης των προϊόντων, όπου σε αυτή την φάση εκτιμάται και η ρήξη της ψυκτικής αλυσίδας από την στιγμή της πώλησης του προϊόντος μέχρι την στιγμή της κατανάλωσης του (όπου η θερμοκρασία φαίνεται να λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες από 4 °C).

Οι θερμοκρασίες αποθήκευσης επηρεάζουν την διάρκεια της φάσης προσαρμογής των μικροοργανισμών (λ, lag- phase), την εκθετική φάση ανάπτυξης τους και τον τελικό αριθμό των κυττάρων τους στο προϊόν (Doulgeraki et al., 2012). Παρόλο που πολλές χώρες έχουν καθιερώσει συγκεκριμένους κανόνες με τα επιτρεπτά όρια αποθήκευσης των προϊόντων κρέατος σε θερμοκρασίες ψύξης, πολλές φορές παρατηρούνται και συνθήκες θερμοκρασίας μεγαλύτερες από τους 10°C (Koutsoumanis et al., 2006).

Ψυχρότροφα βακτήρια τα οποία ανήκουν στα Gram-θετικά όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και Gram-αρνητικά όπως *Pseudomonas* μπορούν να αναπτυχθούν στο κρέας σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (Gill and Newton, 1978, Holzapfel, 1998). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η ανάπτυξη των ψυχρότροφων βακτηρίων ενισχύεται στους 4 και 7 °C, ενώ στους 0 °C η ανάπτυξη της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας είναι σχετικά πιο αργή (Tuncer et al., 2008). Γενικότερα, τα είδη *Pseudomonas* είναι αυτά που συμμετέχουν κατά μεγαλύτερο ποσοστό στην αλλοίωση των προϊόντων κρέατος σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ercolini et al., 2007, 2010a, b), ενώ κατά βάση οι χαμηλές θερμοκρασίες δεν ευνοούν τόσο την ανάπτυξη των Enterobacteriaceae, τα οποία παράγουν θεικές ενώσεις και υποβαθμίζουν οργανοληπτικά την ποιότητα του κρέατος. Από την άλλη, σε περίπτωση κακομεταχείρισης της θερμοκρασίας έχει καταγραφεί η ανάπτυξη των Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. και *Acinetobacter* spp. σε θερμοκρασίες των 30 °C. Επιπλέον, η αποθήκευση στους 4 °C θεωρείται καταστροφική για μικροοργανισμούς όπως *B.thermosphacta* και *S.putrefaciens* μετά από 7,10 ή 14 ημέρες, ενώ τα *A.hydrophila* και *A.sobria* αποτελούν βακτήρια τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Hinton et al., 2004). Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι η φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών σε συνθήκες ψύξης κρέατος από -1 έως 5 °C, παρατείνεται σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με αυτή που

καταγράφεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, καθώς και ότι οι συνθήκες αυτές ευνοούν όπως έχει προαναφερθεί κυρίως τους ψυχρότροφους και ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς (Gill and Newton, 1978).

Ωστόσο, είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τους Smolander *et al.* (2014), η διάρκεια ζωής των προϊόντων δεν μπορεί να επιμηκυνθεί και τόσο πολύ κατά την αποθήκευση στους 0 °C, καθώς σε αυτές τις θερμοκρασίες ευνοείται και η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών όπως είναι η *Listeria monocytogenes*. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό το πόσο σημαντική είναι η ακριβής διαχείριση του χρόνου και της θερμοκρασίας, έτσι ώστε να μπορεί να ελεγχθεί η ανάπτυξη όχι μόνο των αλλοιογόνων μικροοργανισμών αλλά και των παθογόνων (Iulietto *et al.*, 2015).

Πέρα των συμβατικών μικροβιολογικών ερευνών, γίνεται και εφαρμογή της ποσοτικής μικροβιολογίας με στόχο την ερμηνεία της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αλλοίωση του κρέατος, κατά την συντήρηση και την διανομή του (McMeekin, 2007). Πραγματοποιούνται έρευνες σχετικά με το αντίκτυπο της θερμοκρασίας, ισοθερμοκρασιακά ή και σε δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ, στην ανάπτυξη των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε πολλά είδη κρέατος, με βάση διάφορα πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα (Zwietering *et al.*, 1992, Ross and Dalgaard, 2003, Koutsoumanis and Taoukis, 2005).

Καταλήγοντας, είναι εμφανής η ανάγκη τήρησης χαμηλών θερμοκρασιών κατά μήκος όλης της εφοδιαστικής αλυσίδας ξεκινώντας κατά την πρώτη ψύξη του κρέατος στο σφαγείο πριν την αφαίρεση του δέρματος, κατά τον καθαρισμό και τον τεμαχισμό του, την αποθήκευση, τη διανομή, τη συντήρηση του στα σημεία πώλησης και καταλήγοντας στο τέλος στην συντήρηση στο ψυγείο του καταναλωτή (Nychas *et al.*, 2008). Η συντήρηση στα ψυγεία και ο τρόπος μεταχείρισης του προϊόντος από τον καταναλωτή αποτελεί ένα ουσιώδες αλλά αδύναμο σημείο. Το σημείο αυτό είναι αδύναμο καθώς δεν μπορεί με σιγουριά να προσδιοριστεί το πώς ο καταναλωτής θα διαχειριστεί και θα αποθηκεύσει το προϊόν, τι συνήθειες έχει και το πότε θα καταναλώσει το προϊόν από την στιγμή που θα το προμηθευτεί.

1.3.5.2.2 Συνθήκες συσκευασίας και σύσταση αερίων στην ατμόσφαιρα

Η επιβίωση και η ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών επηρεάζεται κατά ένα μεγάλο βαθμό από την σύσταση αερίων της ατμόσφαιρας που περιβάλλουν το κρέας. Είναι γνωστό ότι η αποθήκευση των προϊόντων σε αερόβιες συνθήκες επιταχύνει την αλλοίωση του κρέατος λόγω της κυριαρχίας και της δραστηριότητας των αερόβιων ή προαιρετικά αναερόβιων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και κυρίως από *Pseudomonas* spp. (Koutsoumanis *et al.*, 2008, Nychas *et al.*, 1998, Doulgeraki *et al.*, 2012), ενώ κατά την αποθήκευση των προϊόντων σε συσκευασίες υπό κενό και σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες ευνοείται η κυριαρχία των προαιρετικά αναερόβιων πληθυσμών που περιλαμβάνουν κυρίως τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και *Brochothrix thermosphacta* (Enfors *et al.*, 1979,

Lambropoulou, 1996, Grill and Newton, 1978, Nychas and Skandamis, 2005). Είδη από την ομάδα *Ps.fluorescens* καθώς και τα είδη *Ps.fragi*, *Ps.lundensis* *Ps.putida* είναι αυτά που απομονώνονται κυρίως από την αερόβια αποθήκευση του κρέατος και την συντήρηση του σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ercolini et al., 2007,2010a,b).

Τα τελευταία χρόνια, για την αποφυγή της αλλοίωσης του κρέατος και την επέκταση του χρόνου ζωής του, γίνεται χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας κατά τη συσκευασία των προϊόντων (Koutsoumanis et al., 2008), μέσω της προσθήκης επιθυμητού μείγματος αερίων σε εγκεκριμένους περιέκτες με καθορισμένη διαπερατότητα σε αέρια (McMillin, 2008). Συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα θεωρείται ο εγκλεισμός του τροφίμου σε πλαστικά συσκευασίας (μεμβράνες), στο εσωτερικό των οποίων η αέρια σύσταση έχει τροποποιηθεί, με σκοπό τη μείωση της αναπνοής, την ελάττωση της μικροβιακής αύξησης και την επιβράδυνση της ενζυμικής αλλοίωσης, με βασικό στόχο την αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Young et al. 1988). Ο κατάλληλος συνδυασμός των αερίων στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε ευαλλοιώτα προϊόντα και τη διατήρηση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Οι συχνότερα εφαρμοζόμενες μέθοδοι τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι οι συσκευασίες υπό κενό (vacuum packaging) και οι συσκευασίες όπου εμπλουτίζονται με ειδικά αέρια όπως διοξείδιο του άνθρακα, μονοξείδιο του άνθρακα, άζωτο, οξυγόνο και αργό. Βασικός στόχος του εμπλουτισμού με αυτά τα αέρια είναι να επιβραδυνθεί η ανάπτυξη είτε αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών είτε αναερόβιων παθογόνων προκειμένου να διατηρηθεί η ποιότητα του προϊόντος και να μην υποβαθμιστούν παράγοντες όπως είναι η γεύση και η οσμή.

1.4 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας

Λόγω της ταχείας αλλοίωσης του κρέατος κοτόπουλου και της άσκοπης σπατάλης του, αναδύεται η ανάγκη εύρεσης γρήγορων, μη επεμβατικών και οικονομικών σύγχρονων μεθόδων προσδιορισμού της μικροβιολογικής του ποιότητας.

Μέχρι στιγμής, το σύστημα διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων βασίζεται κυρίως στην επιθεώρηση και τον έλεγχο μέσω δειγματοληψιών των πρώτων υλών και των τελικών προϊόντων με χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις (συμβατικές ή μοριακές) (Nychas et al., 2016). Αυτές οι αναλύσεις παρουσιάζουν ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα, αφού είναι χρονοβόρες και κοστοβόρες διαδικασίες που απαιτούν εξειδικευμένο και έμπειρο προσωπικό και δεν είναι δυνατή η χρήση τους πάνω στην γραμμή παραγωγής, καθώς καταστρέφουν το προϊόν στο οποίο γίνεται η ανάλυση (Papadopoulou et al., 2011). Γενικότερα, ένα σύγχρονο σύστημα διασφάλισης της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων δε θα πρέπει να

βασίζεται μόνο σε αναλύσεις του τελικού προϊόντος. Αντ' αυτού, θα πρέπει να στηρίζεται στην πρόληψη, μέσω της παρακολούθησης, της καταγραφής και του ελέγχου των κρίσιμων παραμέτρων από την παραγωγή έως την κατανάλωση του τροφίμου. Στις βιομηχανίες τροφίμων, ο έλεγχος των προϊόντων περιορίζεται στην αξιοποίηση με επεμβατικών μεθόδων φασματοσκοπίας, όπως είναι η φασματοσκοπία δονήσεων (NIR- φθορισμού, Raman, FTIR) (Ellis et al., 2004, Ammor et al., 2009, Papadopoulou et al., 2011, Argyri et al., 2014), η υπερφασματική και η πολυφασματική απεικόνιση (Tsakanikas et al., 2016, Feng et al., 2018), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Argyri et al., 2011) και βιομμητικοί αισθητήρες οσμής και γεύσης (Ropodi et al., 2016). Επιπλέον, στις βιομηχανίες τροφίμων εφαρμόζονται και διάφορα μαθηματικά μοντέλα, τα οποία λόγω του αυτοματισμού τους χαρακτηρίζονται ως πιο γρήγορα και φθηνά συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους, ενώ δεν απαιτούν αυστηρά εξειδικευμένο προσωπικό για τη χρήση τους.

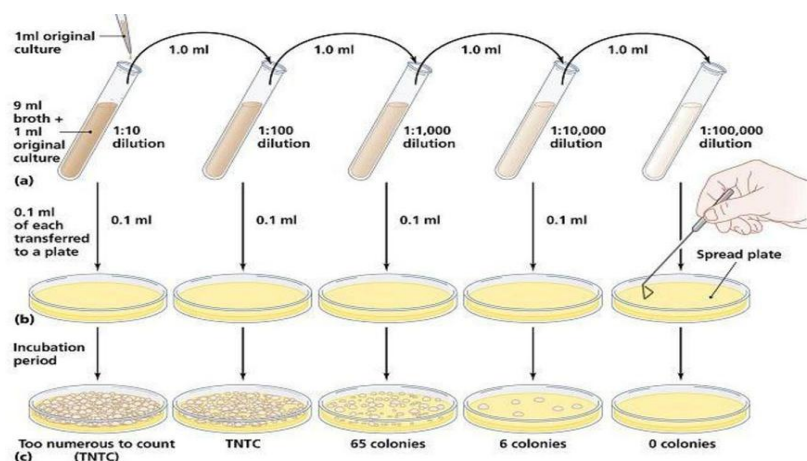
Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν, ως συμβατική μέθοδο η κλασσική μέθοδος απαρίθμησης μικροβιακού φορτίου και ως πιο σύγχρονες και γρήγορες η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν μαθηματικά μοντέλα, όπως τα πρωτογενή, προκειμένου να συσχετιστεί η μικροβιακή αύξηση με το χρόνο και τα δευτερογενή, προκειμένου να συσχετιστεί η μικροβιακή αύξηση με εξωτερικούς παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία.

1.4.1 Κλασσική μέθοδος απαρίθμησης μικροβιακού φορτίου (μέθοδος τρυβλίων)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική για την μέτρηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Ποσότητες από δείγματα τροφίμων αναδεύονται ή ομογενοποιούνται, αραιώνονται διαδοχικά με κατάλληλο αραιωτικό διάλυμα, μετασπείρονται μέσα ή πάνω σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια επωάζονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και για ορισμένο χρονικό διάστημα. Για να δοθούν περισσότερες ακριβείς πληροφορίες για τα βακτήρια, χρησιμοποιούνται επιλεκτικά θρεπτικά υλικά στα οποία πολλές φορές γίνεται και η προσθήκη αντιβιοτικών και χημικών προκειμένου να ανασταλθεί η ανάπτυξη βακτηρίων και να επιτραπεί η ανάπτυξη αυτών που μας ενδιαφέρουν (Lonergan et al., 2019). Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος όλες οι ορατές αποικίες καταμετρούνται. Κατά βάση μετρώνται τα τρυβλία εκείνα τα οποία περιέχουν 30-300 αποικίες.

Η απαρίθμηση των αποικιών στηρίζεται στην θεωρία ότι ένα βακτηριακό κύτταρο ή μια ομάδα βακτηρίων δημιουργούν μια αποικία. Επειδή, κάθε καλλιέργεια μικροοργανισμών ή τρόφιμο μπορεί να περιέχει από χίλια έως

εκατοντάδες εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα ανά όγκο, ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται μια διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, να σχηματίζουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων και περιγράφεται αναλυτικά στην **Εικόνα 4**. Επειδή κατά κανόνα το αρχικό μικροβιακό φορτίο στα υπό εξέταση δείγματα αναμένεται υψηλό, πραγματοποιείται μια σειρά από διαδοχικές αραιώσεις (η μια μετά την άλλη) και δεκαδικές, έτσι ώστε να διαφέρουν κατά μια τάξη του δέκα. Γενικά χρησιμοποιούνται όσες αραιώσεις χρειάζονται, ανάλογα πάντα τη φύση του τροφίμου, τη μικροβιολογία του και τις φυσικοχημικές του ιδιότητες και υπολογίζονται οι μετρήσιμες πάντα αποικίες.



Εικόνα 4: Βήματα των διαδοχικών αραιώσεων.

Ο εμβολιασμός ενός βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται με δύο ποσοτικές τεχνικές:

- τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, η οποία αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό και εφαρμόζεται κυρίως σε αερόβιους μικροοργανισμούς.
- τεχνική της ενσωμάτωσης, η οποία περιλαμβάνει την τοποθέτηση γνωστού όγκου βακτηριακού εναιωρήματος σε τρυβλίο και την απόχυση θρεπτικού υλικού που περιέχει άγαρ και είναι σε θερμοκρασία 42- 45 °C. Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς.

1.4.2 Μαθηματικά μοντέλα

Τα μαθηματικά μοντέλα στον τομέα της ποσοτικής μικροβιολογίας, αναπτύχθηκαν με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση των εξωτερικών παραγόντων,

όπως το pH, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση του διαθέσιμου οξυγόνου και την ενεργότητα του ύδατος, στη συμπεριφορά και την ανάπτυξη των κυρίαρχων μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο (te Giffel and Zwietering, 1999). Τα μοντέλα αυτά δύναται να προβλέψουν και τη διάρκεια ζωής του, βάσει της κινητικής αύξησης της αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας (Mataragas et al., 2007, Domingues and Schaffner, 2007, Bruckner et al., 2013). Οι εφαρμογές των μαθηματικών μοντέλων στη βιομηχανία τροφίμων ποικίλουν, καθώς (Gospavic et al., 2008, Guillier, 2016):

- Χρησιμεύουν στην Ανάλυση Επικινδυνότητας των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP) κατά τη διάρκεια παραγωγής ενός προϊόντος, καθώς επίσης και στην Εκτίμηση της Επικινδυνότητας (Risk Assessment) του, τη στιγμή της έκθεσης του καταναλωτή σε αυτό.
- Μπορούν να εκτιμήσουν το χρόνο ζωής ενός προϊόντος μέσω της πρόβλεψης της μικροβιακής του αλλοίωσης.
- Αποτελούν χρήσιμο εργαλείο κατά την Έρευνα και Ανάπτυξη Νέων Προϊόντων (Research and Development, RnD).

Σύμφωνα με τον Whiting (1995), τα μαθηματικά μοντέλα ταξινομούνται σε πρωτογενή (συσχέτιση μικροβιακής αύξησης με το χρόνο), δευτερογενή (συσχέτιση μικροβιακής αύξησης με εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία) και τριτογενή (συνδυασμός των παραπάνω). Άλλοι τρόποι κατηγοριοποίησης τους είναι σε κινητικά μοντέλα και μοντέλα πιθανότητας, ή τέλος σε εμπειρικά και μηχανιστικά μοντέλα (Baranyi and Roberts, 1994).

1.4.3 Φασματοσκόπια υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Οι συνεχείς απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού όσον αφορά την παραγωγή ποιοτικών και ασφαλών προϊόντων, αυξάνει συνεχώς την ανάγκη για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών στην παραγωγή, συσκευασία και διανομή των προϊόντων (Nychas et al., 2008, Verbeke et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια, διερευνώνται επεμβατικές μέθοδοι που βασίζονται σε φαινόμενα μηχανικής, οπτικής, ακτινών Χ, φασματοσκοπίας και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ώστε να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επεμβαίνουν στην ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων κρέατος (Ammor et al., 2009, Damez and Clerjon, 2008, Prieto et al., 2009).

Υπό το πρίσμα αυτό, η φασματοσκόπια υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier αποτελεί μια σύγχρονη πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης σε διάφορα προϊόντα τροφίμων (Edelman et al., 2001, He et al., 2007). Τα φάσματα υπολογίζονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, είτε ολόκληρα, είτε ορισμένες ταινίες απορρόφησης τους με άλλα γνωστά. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και σε

συνδυασμό με άλλες τεχνικές η ταυτοποίηση αγνώστων οργανικών ουσιών, αλλά και η πιστοποίηση της καθαρότητας τους. Γι' αυτό το λόγο και άλλωστε η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συχνά στην ανάλυση τροφίμων. Η τεχνική που ακολουθείται για την προετοιμασία του δείγματος είναι ανάλογη της φύσης του.

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FTIR) αποτελείται κυρίως από τα εξής τμήματα:

- πηγή ακτινοβολίας: η λυχνία νικελίου-χρωμίου (Nicrome) είναι η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους. Είναι μικρής ισχύος και αερόψυκτη. Η θερμοκρασία που αναπτύσσει είναι 1200- 1250 °C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή μέσο-υπέρυθρου.
- πηγή λέιζερ: η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ γίνεται με τη διέγερση ατόμων ηλίου και νέου.
- συμβολόμετρο Michelson ή ιντερφερόμετρο: τα περισσότερα ιντερφερόμετρα αποτελούνται από ένα διαχωριστή δέσμης, ο οποίος λαμβάνει την εισερχόμενη υπέρυθρη δέσμη και τη διαχωρίζει σε δύο οπτικές δέσμες. Η μια δέσμη αντανακλάται σε ένα επίπεδο καθρέπτη σταθερά τοποθετημένο και η άλλη αντανακλάται σε ένα διαρκώς κινούμενο επίπεδο καθρέπτη με μετακίνηση μερικών nm σταθερής ταχύτητας. Στην συνέχεια, οι δύο δέσμες συνδυάζονται, συμβάλλουν και συναντώνται πάλι στο διαχωριστή δέσμης. Οπότε το σήμα που εξέρχεται είναι το αποτέλεσμα των δύο αυτών παλμών σε αλληλεπίδραση μεταξύ τους.
- δείγμα: η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας μέσω κατόπτρου εισέρχεται στο χώρο του υπό εξέταση δείγματος. Ένα μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται, ενώ το υπόλοιπο εξέρχεται, εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο και κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή. Έτσι, δημιουργείται το μοριακό αποτύπωμα του δείγματος ή αλλιώς το φάσμα υπέρυθρου, που για κάθε μοριακή δομή είναι μοναδικό.
- ανιχνευτής: ο σκοπός του ανιχνευτή είναι να « αισθανθεί» την υπέρυθρη ακτινοβολία, που έχει διέλθει μέσα από το δείγμα
- υπολογιστής: το σήμα της μέτρησης μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό σήμα και στέλνεται στον υπολογιστή για να λάβει χώρα ο μετασχηματισμός Fourier.

Η μέθοδος αυτή είναι ταχεία, μη επεμβατική, απαιτεί ελάχιστη προεπεξεργασία δειγμάτων, χωρίς τη χρήση αντιδραστηρίων, ενώ σε συνδυασμό με την τεχνολογία ATR (Attenuated Total Reflectance) επιτρέπει στους χρήστες να συλλέγουν πλήρη φάσματα μόλις σε μερικά λεπτά δίνοντας την εκτίμηση διαφόρων ιδιοτήτων του κρέατος (Ammor et al., 2009, Ellis et al., 2002). Επιπροσθέτως, ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι λόγω των διαδοχικών ανακλάσεων και απορροφήσεων, τις οποίες υφίσταται η απορροφητικά ανακλώμενη υπέρυθρη ακτινοβολία στο εσωτερικό του δείγματος, οι πληροφορίες που συλλέγονται και αποτυπώνονται ως φάσμα FTIR προέρχονται από σημαντικό τμήμα του δείγματος,

τόσο από την επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων όσο και από το εσωτερικό των κυττάρων. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που λαμβάνονται από τον FTIR θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως μεταβολικά δακτυλικά αποτυπώματα και να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις βιοχημικές μεταβολές που εμφανίζονται κατά την αποθήκευση του κρέατος σε μια προσπάθεια παρακολούθησης της αλλοίωσης (Papadopoulou et al., 2011).

Αρνητικοί παράγοντες στην ποιότητα των FTIR φασμάτων βασίζονται στην υγρασία του δείγματος και στην υγρασία του χώρου τοποθέτησης του δείγματος. Επειδή στο χώρο των οργάνων υπάρχει ατμοσφαιρικός αέρας, το φάσμα που καταγράφεται λαμβάνει υπόψη του και αέρια συστατικά που απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί, CO₂). Για το λόγο αυτό πριν από τη λήψη του φάσματος του δείγματος, καταγράφεται φάσμα αναφοράς τοποθετώντας τον υποδοχέα του δείγματος χωρίς δείγμα.

1.4.5 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η σχέση μεταξύ της μικροβιακής ανάπτυξης και των χημικών αλλαγών που εμφανίζονται κατά την διάρκεια αποθήκευσης του κρέατος αναγνωρίζεται ως ένα δυνητικό μέσο για την αποκάλυψη δεικτών, οι οποίοι είναι χρήσιμοι για την ποσοτικοποίηση της ποιότητας του κρέατος ή της φρεσκάδας του (Dainty, 1996, Nychas et al., 2008). Μέσω ποσοτικών και ποιοτικών αναλύσεων των μεταβολικών ενώσεων, που είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας, μπορεί να υπάρξει μια ολιστική προσέγγιση κατά την οποία η ποιότητα του κρέατος μπορεί να προβλεφθεί ανεξάρτητα από τις συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, συνθήκες συσκευασίας) και τον τύπο του κρέατος (χαμηλό/ υψηλό pH, υψηλή/ χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης) (Goodacre et al., 2004, Nychas et al., 2008).

Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στον έλεγχο και προσδιορισμό γνωστών μεταβολιτών, όπως τα οργανικά οξέα που σχετίζονται με την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο κρέας και την επακόλουθη αλλοίωση του, αλλά και συστατικών που καταναλώνονται κατά την μικροβιακή ανάπτυξη, όπως είναι η γλυκόζη, σε προϊόντα τα οποία είναι αποθηκευμένα σε διάφορες συνθήκες, θεωρείται ως μια απλή αλλά και πολλά υποσχόμενη μέθοδος (Mataragas et al., 2007, Tsigarida et al., 2003).

Η υγρή χρωματογραφία καλείται υψηλής απόδοσης όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης γίνεται με την χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντιστάσεως, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως είναι η καλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια, η δυνατότητα πλήρους αυτοματοποίησης, διαχωρισμό σε σύντομο χρονικό διάστημα και παρέχει μεγαλύτερες δυνατότητες παρασκευαστικής εργασίας. Ως βασικά της

μειονεκτήματα χαρακτηρίζονται το μεγάλος κόστος των συσκευών, αντιδραστηρίων και το γεγονός ότι προϋποθέτει επεξεργασία των δειγμάτων πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα (Ταραντίλης και Παππάς, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, 2015).

2. Σκοπός μελέτης

Ο βασικός στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης ήταν η ανίχνευση της αλλοίωσης σε φιλέτο από μπούτι κοτόπουλου με την χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) και η περαιτέρω συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων με τα φασματοσκοπικά δεδομένα για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης της αλλοίωσης. Η διεξαγωγή του πειράματος αλλοίωσης πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C) και αφορούσε την μικροβιολογική ανάλυση για OMX (ολική μεσόφιλη χλωρίδα), *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες/ μύκητες, καθώς και την εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) στα δείγματα κοτόπουλου. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την ανάπτυξη μοντέλων εκτίμησης της αλλοίωσης, πρόκειται να διαδραματίσουν ένα σημαντικό ρόλο για τη βιομηχανική πρακτική καθώς έως τώρα δεν υπάρχει κάποιο αντίστοιχο μοντέλο για την ανίχνευση της αλλοίωσης στο μπούτι κοτόπουλου. Παράλληλα με τα μοντέλα μηχανικής εκμάθησης, η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει και στην ανάπτυξη και ερμηνεία πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων για την περιγραφή της κινητικής αύξησης της μικροχλωρίδας του κοτόπουλου με τον προσδιορισμό μαθηματικών παραμέτρων.

Επιπροσθέτως, μετά την ολοκλήρωση της διεξαγωγής του παραπάνω πειράματος, στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκε και η ανάλυση με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Βασικός στόχος του πειράματος ήταν ο προσδιορισμός της μεταβολής της συγκέντρωσης τόσο των συστατικών του τροφίμου που καταναλώνονται για την μικροβιακή αύξηση, όπως είναι η γλυκόζη, όσο και των παραγόμενων μεταβολιτών, όπως τα οργανικά οξέα, έτσι ώστε αυτά να συσχετιστούν στην πορεία με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα που ελήφθησαν από το αρχικό πείραμα. Ένας επιπρόσθετος παράγοντας εφαρμογής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ήταν η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε κλάσεις ποιότητας με Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) και Διακριτική Ανάλυση (DA).

3. Υλικά και μέθοδοι

Συσκευασμένα υπό αερόβιες συνθήκες δείγματα από νωπό φιλέτο μπούτι κοτόπουλου, χωρίς κόκαλα και δέρμα, προμηθεύτηκαν από την εταιρία KOTINO A.E.B.E. και τοποθετήθηκαν σε θαλάμους συντήρησης (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) με θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C (**Εικόνα 5**). Η παρακολούθηση της θερμοκρασίας πραγματοποιούνταν με τη χρήση ηλεκτρονικών καταγραφικών (COX TRACER®, Cox Technologies Inc., Belmont, NC, USA) που είχαν τοποθετηθεί στο εσωτερικό των θαλάμων συντήρησης (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 5: Θάλαμοι συντήρησης (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan).



Εικόνα 6: Ηλεκτρονικά καταγραφικά (COX TRACER®, Cox Technologies Inc., Belmont, NC, USA).

Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα αλλοίωσης ($n=4$), αρχικά για τις χαμηλές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15 °C), με διάρκεια 17 ημερών και εν συνεχεία για τις υψηλές θερμοκρασίες (20, 25, 30, 35 °C) με διάρκεια 7 ημερών. Το πρόγραμμα των 55 δειγματοληψιών για τις χαμηλές θερμοκρασίες και των 38 δειγματοληψιών για τις υψηλές θερμοκρασίες παρατίθεται στον **Πίνακα 6**. Για κάθε πείραμα αλλοίωσης πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Συνεπώς, στον **Πίνακα 4** κάθε σημείο (x) αναφέρεται σε δειγματοληψία δύο δειγμάτων όπου $n=110$ για τις

χαμηλές θερμοκρασίες και n= 76 για τις υψηλές, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των κλασσικών μικροβιακών μεθόδων, τη μέθοδο φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR), καθώς και του οργανοληπτικού ελέγχου. Μετά το πέρας των μικροβιολογικών αναλύσεων για κάθε δείγμα, πραγματοποιούνταν η μέτρηση του pH μέσω του μετρητικού οργάνου Russell RL150 (Russell Inc, Boston, U.S.A). Στο χρόνο μηδέν, πραγματοποιήθηκε μικροβιακή ανάλυση, ανάλυση με FTIR και μέτρηση pH σε δύο τυχαία δείγματα. Επιπλέον, δείγματα αποθηκεύονταν σε θερμοκρασίες ψύξης (-20 °C), ούτως ώστε μελλοντικά να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός της γλυκόζης και των οργανικών οξέων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Πίνακας 6: Πρόγραμμα δειγματοληψιών για χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες.

Χρόνος (ώρα)	Θερμοκρασία συντήρησης			
	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C
0	Επιλογή τυχαίου δείγματος			
6			x	x
10				x
24	x	x	x	x
30			x	x
48	x	x	x	x
72		x	x	x
96	x	x	x	x
120	x	x	x	x
144	x	x	x	x
168	x	x	x	x
192	x	x	x	x
216	x	x	x	
240	x	x	x	
264	x	x		
288	x	x		
336	x	x		
384	x	x		
432	x	x		
456	x	x		

Χρόνος (ώρα)	Θερμοκρασία συντήρησης			
	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
0	<i>Επιλογή τυχαίου δείγματος</i>			
2			x	x
4	x	x		x
6			x	x
8	x	x	x	x
10		x	x	x
12	x		x	x
24	x	x	x	x
28		x	x	x
32	x	x	x	
36		x	x	
48	x	x		
56	x	x		
72	x			
96	x			
120	x			
144	x			

3.1 Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παρασκευή υλικών και υποστρωμάτων. Πρώτον, για την ομογενοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ισοτονικό διάλυμα Ringer (LAB108, LAB M., U.K.), όπου ένα μέρος από αυτό το διάλυμα χρειάστηκε επιπλέον για να μοιραστεί στους δοκιμαστικούς σωλήνες (9 ml) προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι διαδοχικές αραιώσεις. Δεύτερον, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τους ενδογενείς πληθυσμούς μικροοργανισμών στο κοτόπουλο (Mead, 1985, Ghollasi-Mood et al., 2017, Mead, 2004, Rindle et al., 2008), επιλέχθηκαν για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών τα παρακάτω θρεπτικά υλικά, τα οποία κατασκευάστηκαν και αποστειρώθηκαν με βάση τις οδηγίες χρήσης που έχουν δοθεί από τον κατασκευαστή:

- Plate Count Agar (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), ένα γενικό θρεπτικό υπόστρωμα επίστρωσης για την

καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών. Μετά τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 25 °C για 3 ημέρες.

- Pseudomonas Agar Base (LAB108, LAB M., U.K.) ένα επιλεκτικό υπόστρωμα επίστρωσης για την απαρίθμηση των *Pseudomonas* spp. με την προσθήκη του επιλεκτικού αντιβιοτικού Cetrimide-Fusidin-Cephaloridine (Modified C.F.C X108, LAB M, UK). Η αποικίες των ψευδομονάδων που σχηματίζονται έχουν ωχρό κίτρινο χρώμα, είναι στρογγυλές και λείες. Μετά τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 25 °C για 2 ημέρες.
- Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base, STAA (Ref. 4020792, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy) με την προσθήκη αντιβιοτικού STAA Supplement (Ref. 4240052, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), ένα επιλεκτικό υπόστρωμα επίστρωσης για την καταμέτρηση των βακτηρίων *Brochothrix thermosphacta*, που σχηματίζουν αποικίες σε σχήμα αυγού με έντονο κίτρινο χρώμα. Μετά τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 25 °C για 2 ημέρες.
- Επιλεκτικό υπόστρωμα ενσωμάτωσης de Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS (Ref.401728S2, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, που εμφανίζονται σε σχήμα φακής. Μετά τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 30 °C για 3- 5 ημέρες.
- Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), ένα επιλεκτικό υπόστρωμα ενσωμάτωσης για την καταμέτρηση των βακτηρίων του γένους Enterobacteriaceae. Μετά τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 37 °C για 24 ώρες.
- Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (LAB036) με την προσθήκη του αντιβιοτικού Chloramphenicol (X209)(LAB M, UK), ένα επιλεκτικό υπόστρωμα επίστρωσης για την καταμέτρηση των ζυμών και μυκήτων. Μετά τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 25 °C για 3 ημέρες.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι για την καταμέτρηση της μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση του κρέατος, αλλά και η σύγχρονη φασματοσκοπική μέθοδος FTIR. Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος εφαρμόστηκε επιπλέον η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

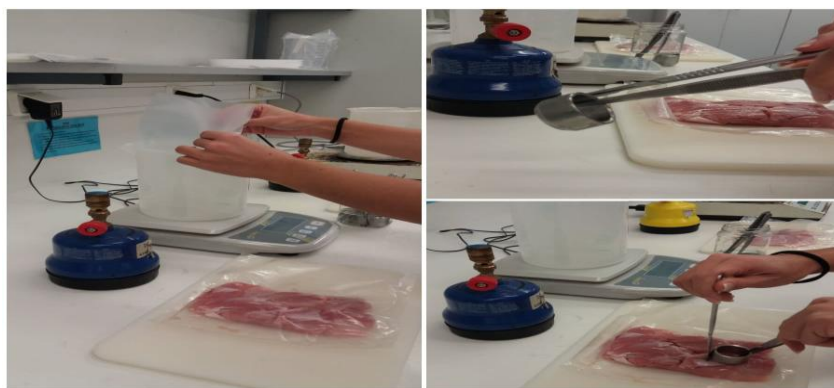
3.1.1 Μικροβιολογική ανάλυση

Για την μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων, μετά την παραλαβή των δειγμάτων από το θάλαμο συντήρησης, παραλαμβάνονταν ασηπτικώς από την πάνω και κάτω επιφάνεια του δείγματος με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, νυστεριού και μεταλλικού ανοξείδωτου χάλυβα δακτυλίου, 4 κομμάτια διαμέτρου 2.5 cm και πάχους μικρότερου από 2 mm (συνολική διάμετρος 20 cm²) και τοποθετούνταν σε σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, France)

(Εικόνα 7). Ακολουθούσε αραιώση του δείγματος με 100 ml Ringer (LAB100Z, LAB M., U.K.) και η ομογενοποίηση του με τη χρήση της συσκευής Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για δύο λεπτά. Από το διάλυμα που σχηματιζόταν, με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας, 1ml από το διάλυμα μεταφερόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε περίπου 9 ml Ringer και έτσι ξεκινούσε η διαδικασία των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων όπως επισημάνθηκε στην εισαγωγή.

Αφού σχηματίστηκαν οι επιθυμητές αραιώσεις στους δοκιμαστικούς σωλήνες, το επόμενο βήμα ήταν ο εμβολιασμός των θρεπτικών υποστρωμάτων. Στα υποστρώματα επιφανειακής επίστρωσης (PCA, CFC, STAA, RBC) με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας, μεταφέρονταν όγκος εμβολίου 0.1 ml από τους δοκιμαστικούς σωλήνες ξεκινώντας από την πιο αραιή και καταλήγοντας στην πιο πυκνή αραιώση και στην συνέχεια με τη βοήθεια αποστειρωμένου διανομέα απλωνόταν ομοιόμορφα το δείγμα μέσα στο τρυβλίο με το ανάλογο θρεπτικό υλικό. Στα θρεπτικά υποστρώματα ενσωμάτωσης (VRBG, MRS), εμβόλιο όγκου 1 ml μεταφερόταν σε κενό τρυβλίο Petri και στην συνέχεια προσθέτονταν διαδοχικά δύο επιστρώσεις από το ανάλογο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό με διαφορά δέκα λεπτών, προκειμένου να έχει στεγνώσει η κάθε επίστρωση. Αυτά τα θρεπτικά υλικά διατηρούντουσαν σε υγρή μορφή με τη βοήθεια του υδατόλουτρου. Στη συνέχεια όλα τα εμβολιασμένα τρυβλία επάζονταν στους κλιβάνους στις κατάλληλες συνθήκες και για το ανάλογο χρονικό διάστημα που αρμόζει για το κάθε θρεπτικό υλικό. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας γινόταν η παρατήρηση και η καταμέτρηση των μικροοργανισμών και η κατασκευή των διαγραμματών ανάπτυξης τους, χρησιμοποιώντας τους μέσους όρους των $\log \text{ cfu/ cm}^2$ και τις τυπικές αποκλίσεις (για τα δύο δείγματα), των δύο επαναλήψεων συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες, αλλά και η κατασκευή των μαθηματικών μοντέλων.

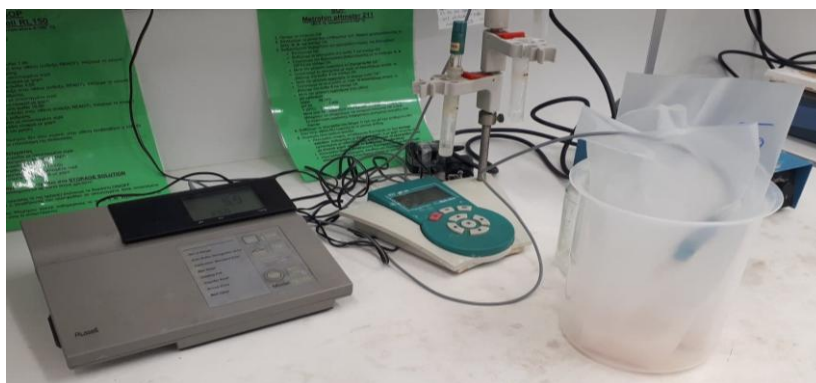
Στη παρούσα φάση να διευκρινιστεί ότι για τις χαμηλές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15 °C), πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση για OMX (ολική μεσόφιλη χλωρίδα), *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες/μύκητες, ενώ για τις υψηλές θερμοκρασίες (20, 25, 30, 35 °C) πραγματοποιήθηκε ανάλυση μόνο για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), *Pseudomonas* spp. και Enterobacteriaceae, καθώς αυτές οι θερμοκρασίες αποτελούν τις βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης των παραπάνω μικροοργανισμών και καθώς η ανάπτυξη των υπολοίπων μικροοργανισμών σε αυτές τις θερμοκρασιακές συνθήκες δεν επηρεάζει καταλυτικά την αλλοίωση του τροφίμου.



Εικόνα 7: Παραλαβή δείγματος από κρέας κοτόπουλου.

3.1.1.1 Μέτρηση pH

Στο τέλος των μικροβιολογικών αναλύσεων πραγματοποιούνταν η μέτρηση του pH στο αραιωμένο με Ringer δείγμα μέσω της χρήσης του μετρητικού οργάνου Russell RL150 (Russell Inc, Boston, U.S.A) (**Εικόνα 8**), με ακρίβεια ± 0.2 . Κάθε φορά στην αρχή της μέτρησης αλλά και μετά από 12 δείγματα γινόταν η βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα διαλύματα με pH 4, 7 και 10 και ακολούθως μετρούταν το pH του αραιωμένου ομογενοποιημένου δείγματος.



Εικόνα 8: Μέτρηση pH με όργανο Russell RL150 (Russell Inc, Boston, U.S.A).

3.1.2 Μαθηματικά μοντέλα

3.1.2.1 Περιγραφή μοντέλων

Με βάση τα μικροβιολογικά αποτελέσματα των πειραμάτων αλλοίωσης στο φιλέτο από μπούτι κοτόπουλου σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης, προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι αύξησης για την OMX και τις επιμέρους μικροβιακές ομάδες των *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, Enterobacteriaceae και οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) σύμφωνα με το πρωτογενές

μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) (**Εξίσωση 1**). Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος DMFit σε περιβάλλον excel (Institute of Food Research, Reading, UK), το οποίο είναι διαθέσιμο στο www.combase.cc, έγινε ο προσδιορισμός της φάσης προσαρμογής λ (lag phase), του μέγιστου ρυθμού αύξησης $\mu_{\max}$, του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού y_0 , του τελικού μικροβιακού πληθυσμού y_{end} και του συντελεστή συσχέτισης R^2 .

Εξίσωση 1: Η εξίσωση του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994).

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

όπου, $(t) = 0$ χρόνος σε h

$y(t)$ = ο πληθυσμός τη χρονική στιγμή t

y_0 = ο αρχικός πληθυσμός

$\mu_{\max}$ = ο μέγιστος ρυθμός αύξησης

$y_{\max}$ = ο μέγιστος πληθυσμός του μικροοργανισμού

m = ο συντελεστής Richards, όπου δείχνει τη μετάβαση από την εκθετική στη στατική φάση της καμπύλης ανάπτυξης

$A(t)$ = παράμετρος καθυστέρησης που δίνεται από τη σχέση:

$$A(t) = t + \ln(e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} - e^{-vt - h_0} / \mu_{\max})$$

όπου, v = παράμετρος που χαρακτηρίζει το ρυθμό αύξησης του κρίσιμου υποστρώματος και γενικά θεωρείται ίση με $\mu_{\max}$

h_0 = παράμετρος που χαρακτηρίζει το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον.

Στα πλαίσια του πειράματος για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης της OMX και του βακτηρίου *Pseudomonas*, χρησιμοποιήθηκε το δευτερογενές μοντέλο του Ratkowsky (1982) (**Εξίσωση 2**), όπου με βάση τα αποτελέσματα του $\mu_{\max}$ για την OMX και την ψευδομονάδα υπολογίστηκε η ρίζα του $\mu_{\max}$ (χωριστά για κάθε επανάληψη και δείγμα), ώστε να προσδιοριστούν οι παράμετροι b καθώς και η ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης $T_{\min}$. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων έγινε με τη βοήθεια του STATGRAPHICS.

Εξίσωση 2: Η εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky (1982).

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

όπου, $\mu_{\max}$ = ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

b = παράμετρος, συντελεστής συσχέτισης-παλινδρόμησης

$T_{\min}$ = η ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία για την ανάπτυξη μικροοργανισμού (°C)

T = η θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο εκάστοτε $\mu_{\max}$ (°C)

Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και το δευτερογενές μοντέλο της τροποποιημένης εξίσωσης του μοντέλου Ratkowsky (Expanded Ratkowsky model)

(Εξίσωση 3), προκειμένου να περιγραφεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην περιοχή όπου παρατηρείται η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (T_{max}).

Εξίσωση 3: Η εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου της τροποποιημένης εξίσωσης του Ratkowsky(1982).

$$\forall \mu_{max} = b * (temp - T_{min}) * (1 - \exp(c * (temp - T_{max})))$$

Γενικά, το συγκεκριμένο μοντέλο έχει αποδειχθεί βιβλιογραφικά ότι δύναται να δώσει καλά αποτελέσματα όταν εφαρμόζεται για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και για την κυρίαρχη αλλοιωγόνο μικροβιακή ομάδα στο κοτόπουλο, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* (Dominguez and Schaffner, 2007, Lytou, Panagou and Nychas, 2016).

3.1.3 Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων

Ο οργανοληπτικός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του πειράματος είχε ως βασικό γνώμονα την εμφάνιση (χρώμα) και την οσμή των δειγμάτων. Γίνεται αντιληπτό, ότι η αξιολόγηση από άνθρωπο σε άνθρωπο θα διαφέρει καθώς η αξιολόγηση του χρώματος ή της οσμής μπορεί να επηρεαστεί από προσωπικές προτιμήσεις, από τον φωτισμό του χώρου την ώρα που γίνεται η εκτίμηση, από προβλήματα στην όραση και στην όσφρηση, καθώς και από διάφορους άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η αξιολόγηση γενικά μπορεί να βασιστεί σε ένα πάνελ από εκπαιδευμένα άτομα ή σε ένα πάνελ καταναλωτών. Στη παρούσα φάση χρησιμοποιήθηκε μη εκπαιδευμένο πάνελ περίπου 14-15 ατόμων, τα οποία ήταν μέλη του εργαστηρίου, προκειμένου να φανεί κατά πόσο τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων μπορούν να συσχετιστούν με την γνώμη απλών καταναλωτών και να διευκρινιστούν τυχόν αποκλίσεις που μπορεί να παρατηρήθηκαν. Έτσι, κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας, κοβόταν από κάθε δείγμα από το μπούτι φιλέτο κοτόπουλου ένα μικρό κομμάτι, τοποθετούνταν σε κενό τρυβλίο Petri και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασίες ψύξης (-20°C) για να πραγματοποιηθεί ο οργανοληπτικός έλεγχος μελλοντικά. Τα προς εξέταση δείγματα 18 ώρες πριν από τον οργανοληπτικό έλεγχο αποψύχθηκαν ομοιόμορφα στους 4°C . Ο οργανοληπτικός έλεγχος διήρκεσε 2 ημέρες και ο χώρος στον οποίο πραγματοποιήθηκε η διεξαγωγή του ελέγχου είχε σταθερή θερμοκρασία, κοντά στους $20-25^{\circ}\text{C}$, ο φωτισμός ήταν τεχνητός και η υγρασία σε ελεγχόμενα επίπεδα (Papadopoulou et al., 2011). Τα δείγματα ήταν κωδικοποιημένα και αξιολογήθηκαν ως προς την εμφάνιση και την οσμή με κλίμακα 1 έως 3. Πιο συγκεκριμένα, ο βαθμός 1 αντιστοιχούσε σε φρέσκο δείγμα με την επιθυμητή εμφάνιση (λευκό-ροζ χρώμα) και οσμή, που δεν παρουσίαζε αποκλίσεις από το δείγμα αναφοράς (0 η στην συντήρηση), ο βαθμός 2 αντιστοιχούσε σε δείγματα που παρουσίαζαν ελαφρά απόκλιση σε οσμή και εμφάνιση από τα φρέσκα, αλλά θεωρούνταν ακόμη αποδεκτά και τέλος ο βαθμός 3 αντιστοιχούσε σε δείγματα με έντονη δυσοσμία

(οσμή σήψης ή τυριού) και ασυνήθιστη εμφάνιση (αποχρωματισμός, πράσινο-καφέ χρώμα, γλοιώδης επιφάνεια), τα οποία και χαρακτηρίζονταν ως μη αποδεκτά (Argyri et al., 2010, Papadopoulou et al., 2011, Lytou, Nychas and Panagou, 2018). Πρέπει να σημειωθεί ότι για την διευκόλυνση του πάνελ καθώς και για να υπάρχει κάποιο μέτρο σύγκρισης δόθηκαν 3 φρέσκα δείγματα ως πρότυπα (standards) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων.

3.1.4 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)

Για την εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier, ταυτόχρονα με την διαδικασία της δειγματοληψίας, κοβόταν ένα μικρό κομμάτι κρέατος από το μπούτι φιλέτο κοτόπουλου περίπου στα 3 g και τοποθετούνταν σε κενό τρυβλίο Petri προκειμένου να αναλυθεί φασματοσκοπικά.

Η διαδικασία πραγματοποιούνταν με την χρήση του φασματοφωτόμετρου FT/IR 6200 JASCO και τα δείγματα τοποθετούνταν σε κρύσταλλο ZnSe 45 ° HATR - Horizontal Attenuated Total Reflectance (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, USA) (Εικόνα 10). Κάθε φορά πριν την έναρξη της διαδικασίας των μετρήσεων, αλλά και μετά από κάθε τρία δείγματα, γινόταν η αναγκαία βαθμονόμηση του οργάνου με ένα φάσμα αναφοράς που δινόταν από μέτρηση του κρυστάλλου χωρίς δείγμα στην επιφάνειά του. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου μέσω του ειδικού λογισμικού Spectra Manager 2 (Jasco Corp.), λαμβάνονταν τα φάσματα των μετρήσεων του FTIR μέσα στο χρονικό διάστημα των 2 λεπτών. Στο χρονικό αυτό διάστημα πραγματοποιούνταν 100 σαρώσεις ανά δείγμα, δίνοντας ένα φάσμα δεδομένων από τα 4000 cm^{-1} έως τα 400 cm^{-1} . Κάθε φορά μετά από κάθε λήψη ο κρύσταλλος καθαριζόταν πολύ προσεκτικά με απορρυπαντικό, ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και στο τέλος με ακετόνη.



Εικόνα 10: Φασματοφωτόμετρο FT/IR 6200 JASCO.

3.1.4.1 Ανάλυση δεδομένων FTIR

3.1.4.1.1 Γραμμική Παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression- PLS-R)

Για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού με βάση δεδομένα που λήφθηκαν από το όργανο FTIR, έγινε παλινδρόμηση με χρήση της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLSR). Η μέθοδος αυτή συσχετίζει τα δεδομένα από δύο σύνολα δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (μεταβλητές απόκρισης, εξαρτημένες), με ένα γραμμικό πολυπαραγοντικό μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκει ένα νέο σύνολο-χώρο ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X scores), με ορθογώνια διάταξη, καθώς και ορίζει έναν αριθμό κύριων συνιστωσών (Latent variables, LVs) για τον νέο χώρο αυτό (Wold et al., 2001, Romia and Bernardez, 2009, Panagou et al., 2014). Με στόχο την απαλλαγή από τις πολυάριθμες και συσχετιζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές που συνεπάγονται το overfitting, κάθε λογισμικό PLSRS δίνει τη δυνατότητα εκπαίδευσης του μοντέλου και της πρόβλεψης της σημαντικότητας κάθε παράγοντα, τη διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation). Μέσω της διασταυρούμενης επικύρωσης, γίνεται διάκριση των δεδομένων σε κάποιες ομάδες, από τις οποίες μετά από διαδοχική χρήση δημιουργούνται μοντέλα με τα δεδομένα που απομένουν. Ύστερα από τη δημιουργία ενός μοντέλου, καταμετρώνται οι διαφορές μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της μεταβλητής Y . Το άθροισμα των τετραγώνων αυτών των διαφορών δίνει μια εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου. Είναι αναγκαίο να πραγματοποιείται επικύρωση κάθε μοντέλου πριν τη χρήση του για πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού. Αυτό ιδανικά θα πρέπει να γίνεται με ανεξάρτητα, αντιπροσωπευτικά δείγματα, εφόσον αυτά υπάρχουν. Ειδικά, υπάρχει δυνατότητα επανεκτίμησης του μοντέλου μετά από τυχαιοποίηση των δεδομένων (Wold et al., 2001).

Έγινε επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου, καθώς επιτρέπει την ανάλυση δεδομένων με πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές X και με πολύ «θόρυβο» (Wold et

al., 2001, Abdi, 2003). Επιπλέον, η PLSR ξεχωρίζει από τις άλλες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης, αφού με τη χρήση της διατηρείται η ασυμμετρία μεταξύ των προβλεπόμενων και των εξαρτημένων μεταβλητών (Abdi, 2003).

Για την εφαρμογή της PLSR, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα The Unscrambler® ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway) και κατασκευάστηκαν μοντέλα για την ανάπτυξη της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* σε δείγματα τα οποία συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δειγμάτων που συλλέχθηκαν μεταξύ 1800 και 900 cm^{-1} και ορίστηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα δεδομένα του οργάνου FTIR και ως εξαρτημένες οι πληθυσμοί της OMX και των *Pseudomonas* spp. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό Savitzky–Golay, προκειμένου να επιτευχθεί η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων (Savitzky and Golay, 1964).

Για το μοντέλο ανάπτυξης της OMX, ως δείγματα ($n=228$) για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation), θεωρήθηκαν αυτά που συντηρήθηκαν στους 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 και 35 °C (δύο δείγματα για κάθε χρόνο δειγματοληψίας). Για τον έλεγχο της πρόβλεψης του μοντέλου (prediction), χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα ($n=97$) που συντηρήθηκαν στους 0, 5, 10 και 15 °C (δείγματα από τη δεύτερη επανάληψη). Να τονιστεί ότι η επιλογή των κατάλληλων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μετά από πολλές και διάφορες δοκιμές.

Για το μοντέλο ανάπτυξης των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, ως δείγματα ($n=228$) για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation), θεωρήθηκαν αυτά που συντηρήθηκαν στους 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 και 35 °C (δύο δείγματα για κάθε χρόνο δειγματοληψίας). Για τον έλεγχο της πρόβλεψης του μοντέλου (prediction), χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα ($n=97$) που συντηρήθηκαν στους 0, 5, 10 και 15 °C (δείγματα από τη δεύτερη επανάληψη). Να τονιστεί ότι η επιλογή των κατάλληλων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μετά από πολλές και διάφορες δοκιμές.

Για τα μοντέλα προσδιορισμού της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* με την μέθοδο PLSR, υπολογίστηκαν και λήφθηκαν υπόψη, η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος ανάπτυξης (Root Mean Square Error, RMSE_c), επικύρωσης (RMSE_v), πρόβλεψης (RMSE_p) (Romia and Bernardez, 2009, Bi et al., 2016), και οι συντελεστές συσχέτισης για την ανάπτυξη r_c (correlation coefficient in calibration), επικύρωση (r_v) και πρόβλεψης (r_p) (Dissing et al., 2013, Panagou et al., 2014, Ropodi et al., 2016). Οι παράγοντες συσχέτισης r και RMSE υπολογίζονται αυτόματα κατά την εφαρμογή των λογισμικών που χρησιμοποιούνται.

3.1.5 Εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), λαμβάνονταν με την βοήθεια λαβίδας και νυστεριού κάτω από ασηπτικές συνθήκες, 4 g άπαχου κρέατος και τοποθετούνταν σε σωληνάκια φυγοκέντρωσης των 50 ml,

στα οποία προσθέτονταν 8 ml δις απιονισμένου νερού HPLC και στην συνέχεια το δείγμα ομογενοποιούνταν χειρωνακτικά με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου για 1 min. Έπειτα, τα σωληνάκια τοποθετούνταν στη φυγόκεντρο (Multifuge IS-R centrifuge, Thermo Electron Corporation) για 10 min (4.500 rpm, 4 °C) και από το υπερκείμενο που προέκυπτε, παραλαμβάνονταν με μηχανική πιπέτα 5 ml, τα οποία μεταφέρονταν σε σωληνάκια φυγοκέντρωσης των 15 ml. Στο σημείο αυτό, προσθέτονταν 50 μ L από το συντηρητικό 1.0% sodium azide και 50 μ L από το αντιδραστήριο TFA (trifluoroacetic acid), προκειμένου να γίνει η καταβύθιση των πρωτεϊνών. Μετά από ανακίνηση 5 sec, τα σωληνάκια τοποθετούνταν για δεύτερη φυγοκέντρωση (με τις ίδιες συνθήκες που προαναφέρθηκαν) και 4 ml από το υπερκείμενο που προέκυπτε μεταφέρονταν σε νέα σωληνάκια των 15 ml. Τέλος, μικρός όγκος των δειγμάτων λαμβάνονταν με σύριγγα, διηθούνταν με φίλτρα 0.22 μ m και τοποθετούνταν σε ειδικά σωληνάκια (vials), από τα οποία θα γινόταν και η ένεση στο σύστημα της HPLC. Η διαδικασία της HPLC στηρίχτηκε στα δείγματα των χαμηλών θερμοκρασιών (0, 5, 10, 15 °C).

Για την προετοιμασία της κινητής φάσης (0.009N H_2SO_4), μέσα σε μια ογκομετρική φιάλη των 500 ml, η οποία εμπεριείχε νερό HPLC, προστέθηκαν σταδιακά 1.36 ml πυκνού θεικού οξέος. Έπειτα, σε μια νέα ογκομετρική φιάλη των 1000 ml, τοποθετήθηκαν αρχικά περίπου 300 ml νερό HPLC και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε αυτή την φιάλη 90 ml από την ογκομετρική φιάλη των 500 ml. Στην πορεία συμπληρώθηκε νερό HPLC και ακολούθησε καλή ανάδευση. Στη συνέχεια, ακολούθησε διήθηση με την συσκευή Millipore και κατά αυτό τον τρόπο η κινητή φάση ήταν έτοιμη για την τοποθέτηση της στο σύστημα της HPLC και την απαέρωση της με He.

Η διαδικασία πραγματοποιούνταν με το σύστημα HPLC (Jasco, Japan) (**Εικόνα 11**), το οποίο αποτελούνταν από:

- Τη παλινδρομική αντλία (Jasco, PU-980 intelligent pump)
- Τη μονάδα τριπλής βαθμίδας (Jasco LG-980-02 ternary gradient pump)
- Τον αυτόματο δειγματολήπτη (Jasco AS-2055)
- Το δίαυλο επικοινωνίας (Jasco LC-Net II)
- Τον ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Jasco RI-2031)
- UPS
- Τη μονάδα του υπολογιστή
- Τη διάταξη απαέρωσης



Εικόνα 11: Διάταξη συστήματος HPLC (Jasco, Japan).

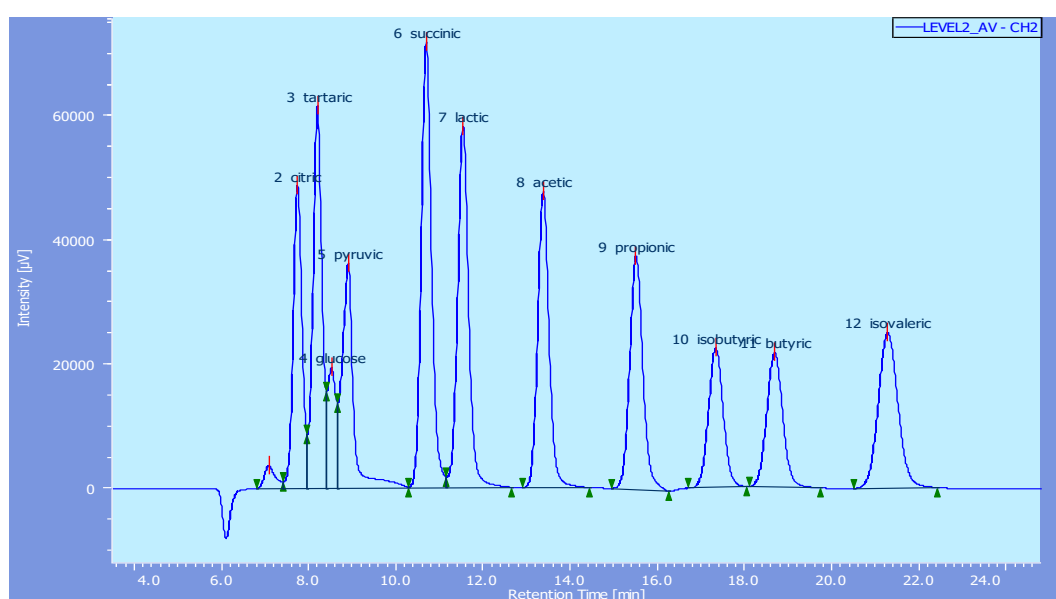
Κατά τη διαδικασία ανάλυσης τα δείγματα εκλύονταν ισοκρατικά με διάλυμα κινητής φάσης ($0.009N\ H_2SO_4$) μέσω στήλης Aminex HPX-87H ($300 \times 7.8\ mm$, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) με ροή $0.7\ ml/min$, όγκο ένεσης $20\ \mu L$ και σε θερμοκρασία θερμικού θαλάμου-φούρνου $65\ ^\circ C$. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων ήταν το Jasco Chrompass Chromatography Data system v1.7.403.1.

Διαλύματα οργανικών οξέων αναφοράς (κιτρικό, πυροσταφυλικό, ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό, προπιονικό, ισοβουτυρικό, βουτυρικό, ισοβαλερικό) αναλύθηκαν με το ίδιο πρόγραμμα και οι χρόνοι συγκράτησης τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**, ενώ στην **Εικόνα 12** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος. Για την καμπύλη αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν 7 διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων οργανικών οξέων: $1/2$, $1/5$, $1/10$, $1/20$, $1/50$, $1/100$ της αρχικής συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης που περιγράφεται από την εξίσωση: $y = a + bx$ (όπου y =εμβαδό της εκάστοτε κορυφής και x = συγκέντρωση του οξέος που αναλύθηκε στην HPLC) και εκφράστηκαν σε g οξέος ανά L δείγματος.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα που είχαν συντηρηθεί στις χαμηλές θερμοκρασίες ($0, 5, 10, 15\ ^\circ C$), με 3 επαναλήψεις (A, B, C) έκαστο. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Skandamis και Nychas (2001), με σχετικά μερικές τροποποιήσεις όπως αναφέρονται και παραπάνω.

Πίνακας 7: Πρότυπα οργανικά οξέα και χρόνοι συγκράτησης.

Οργανικά οξέα	Χρόνος συγκράτησης (min) (tR)
Κιτρικό	7.8
Πυροσταφυλικό	9.1
Ηλεκτρικό	10.8
Γαλακτικό	11.6
Οξικό	13.5
Προπιονικό	15.6
Ισοβουτυρικό	17.4
Βουτυρικό	18.8
Ισοβαλερικό	21.2



Εικόνα 12: Προφίλ πρότυπου διαλύματος οργανικών οξέων.

3.1.5.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων HPLC

3.1.5.1.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA)

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών είναι μια πολυμεταβλητή μέθοδος στατιστικής επεξεργασίας δεδομένων, με την οποία επιχειρείται ο προσδιορισμός των τυχόν υφιστάμενων γραμμικών συσχετίσεων- τάσεων που υπάρχουν σε ένα μεγάλο αριθμό μεταβλητών και η ερμηνεία τους. Με τη τεχνική αυτή επιτυγχάνεται να γίνει συμπύκνωση της πληροφορίας που περιέχεται στις αρχικές μεταβλητές, σε ένα μικρότερο αριθμό νέων μεταβλητών, που είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών, με όσο το δυνατόν μικρότερη απώλεια πληροφορίας (Shlens, 1993). Αυτό γίνεται με την προβολή των δεδομένων σε ένα νέο σύστημα αξόνων, οι οποίοι προέρχονται από γραμμικό μετασχηματισμό των αρχικών μεταβλητών. Βασικός

σκοπός της ανάλυσης αυτής είναι η μείωση των διαστάσεων ενός συνόλου δεδομένων, που αποτελείται από μεγάλο αριθμό αλληλοεξαρτώμενων μεταβλητών, ενώ συγκρατείται η μέγιστη δυνατή διασπορά τους. Αυτό κατορθώνεται με τον μετασχηματισμό των δεδομένων σε μια καινούργια ομάδα μεταβλητών, τις κύριες συνιστώσες, οι οποίες δεν συσχετίζονται μεταξύ τους και ταξινομούνται έτσι ώστε, οι πρώτες κύριες συνιστώσες να έχουν όσο το δυνατόν περισσότερη διασπορά από το σύνολο. Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα XLstat του Microsoft Excel 2013.

3.1.3.1.2 Διακριτική Ανάλυση (Discriminant Analysis)

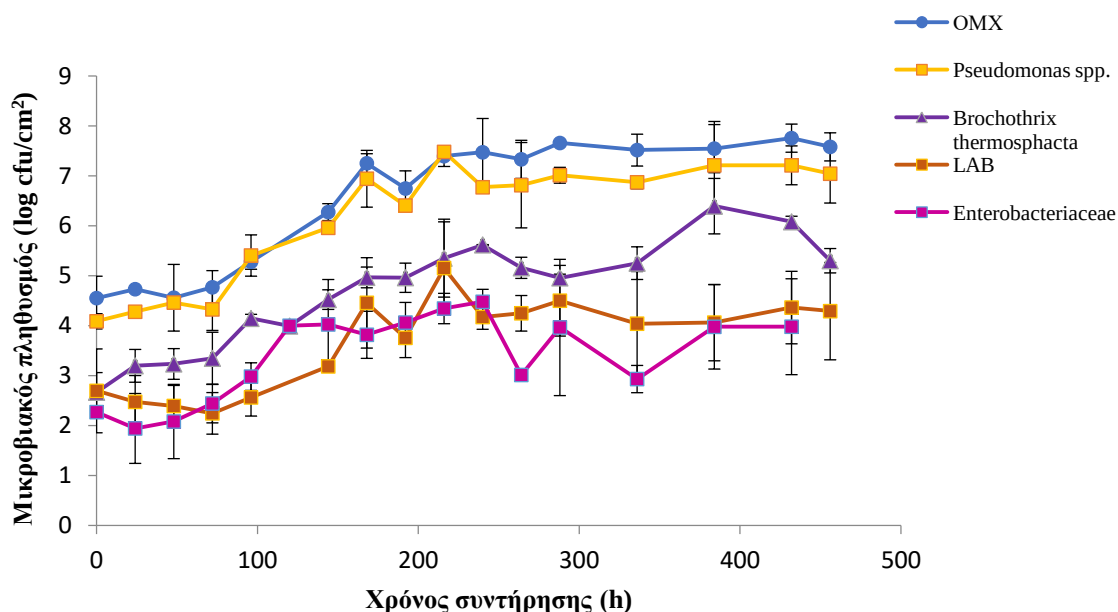
Η Διακριτική ανάλυση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός προγνωστικού μοντέλου μέλους ομάδας με βάση τα παρατηρούμενα χαρακτηριστικά κάθε περίπτωσης. Παράγει συναρτήσεις από ένα δείγμα παρατηρήσεων για τις οποίες είναι γνωστή η ομάδα στην οποία κάθε μια παρατήρηση ανήκει και στη συνέχεια οι συναρτήσεις μπορούν να εφαρμοστούν σε νέες περιπτώσεις με μετρήσεις μεταβλητών πρόβλεψης αλλά άγνωστη την ομάδα στην οποία ανήκουν (Hallinan, 2012). Η Διακριτική ανάλυση παράγει μια νέα μεταβλητή συνδυάζοντας τις αρχικές μεταβλητές κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιούνται οι διαφορές μεταξύ των προκαθορισμένων ομάδων. Επιπλέον, ένας βασικός σκοπός της Διακριτικής ανάλυσης είναι η κατανόηση του συνόλου των δεδομένων. Μια προσεκτική εξέταση του μοντέλου πρόβλεψης που προκύπτει από την ανάλυση μπορεί να δώσει πληροφόρηση για τη σχέση μεταξύ της ιδιότητας μέλους ομάδας και των μεταβλητών που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της. Η διακριτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα XLstat του Microsoft Excel 2013.

4. Αποτελέσματα

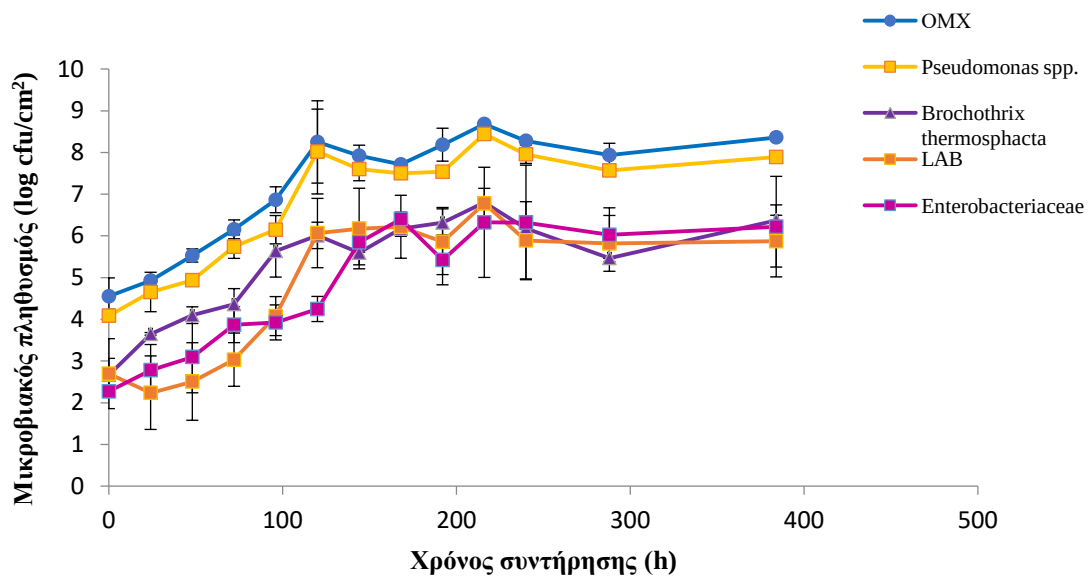
4.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροοργανισμών που είχαν αναπτυχθεί στα συντηρημένα υπό αερόβιες συνθήκες και σε διαφορετικές θερμοκρασίες δείγματα, έγινε η καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών στα τρυβλία της κάθε αραίωσης (με εύρος 50- 300 αποικίες) και αναγωγή στο αρχικό δείγμα. Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης των 0, 5, 10, 15 °C ήταν η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta*, τα εντεροβακτήρια και οι ζύμες/μύκητες. Αντίστοιχα, στις υψηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης των 20, 25, 30, 35 °C μελετήθηκε η ανάπτυξη μόνο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, των *Pseudomonas* spp. και των εντεροβακτηρίων, καθώς όπως έχει προαναφερθεί η ανάπτυξη των υπολοίπων μικροοργανισμών δεν επηρεάζει καταλυτικά την αλλοίωση του τροφίμου σε αυτές τις υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης.

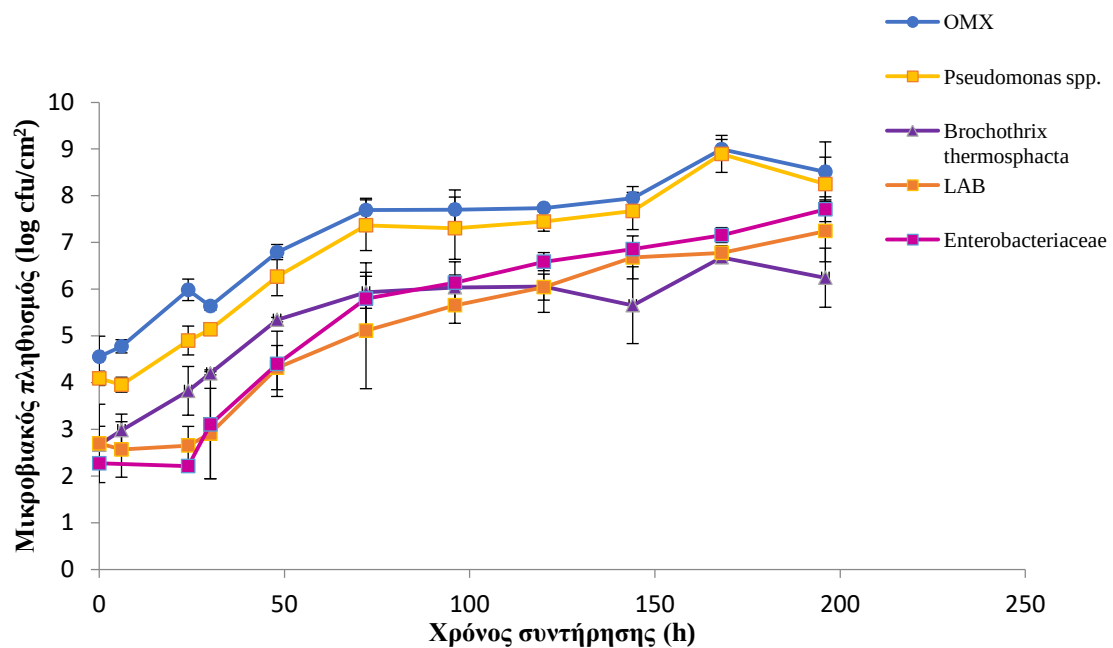
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τις χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης παρουσιάζονται στα ακόλουθα γραφήματα (Γραφήματα 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Πιο συγκεκριμένα, για την κατασκευή των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των $\log \text{cfu/cm}^2$ και οι τυπικές αποκλίσεις των δύο επαναλήψεων συντήρησης ($n=4$), καθώς λαμβάνονταν δύο δείγματα ανά κάθε δειγματοληψία.



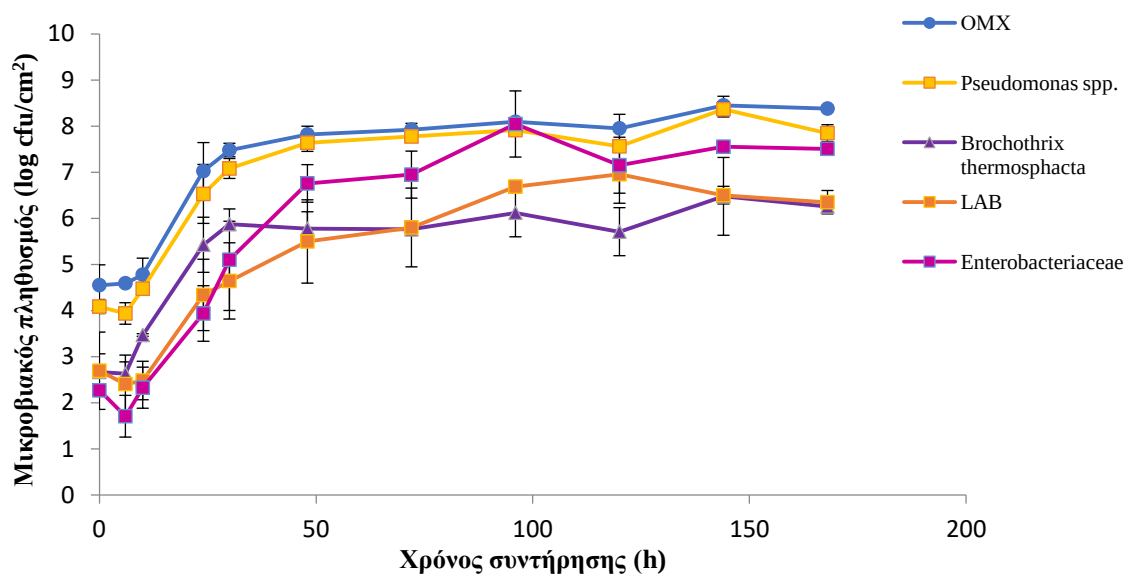
Γράφημα 1: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 0 °C.



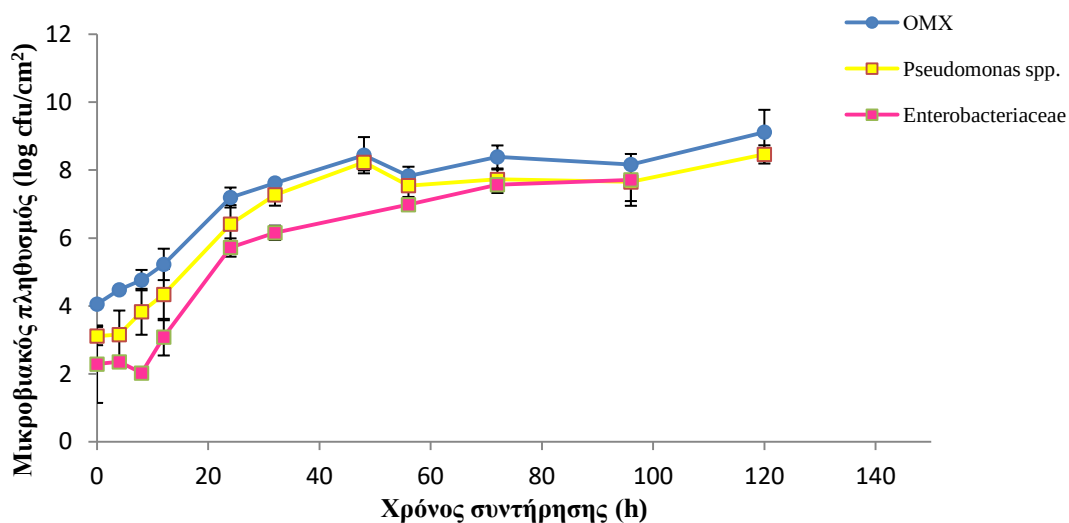
Γράφημα 2: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 5 °C.



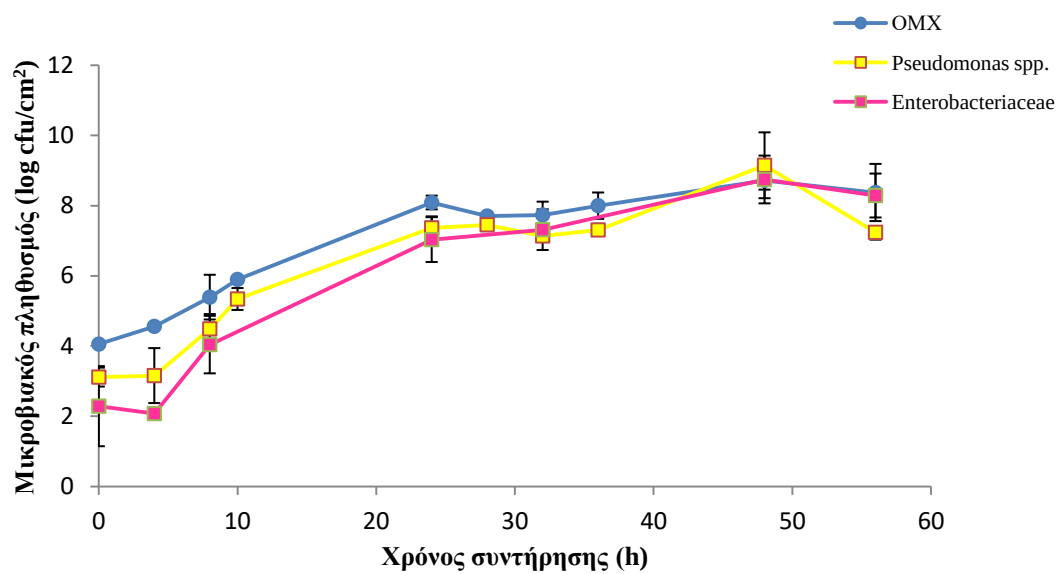
Γράφημα 3: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 10 °C.



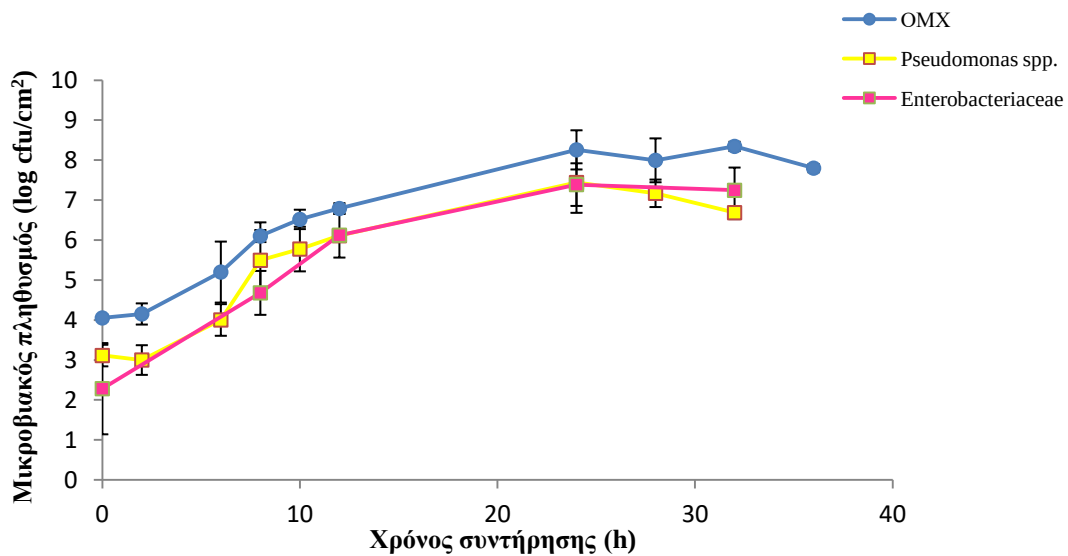
Γράφημα 4: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 15 °C.



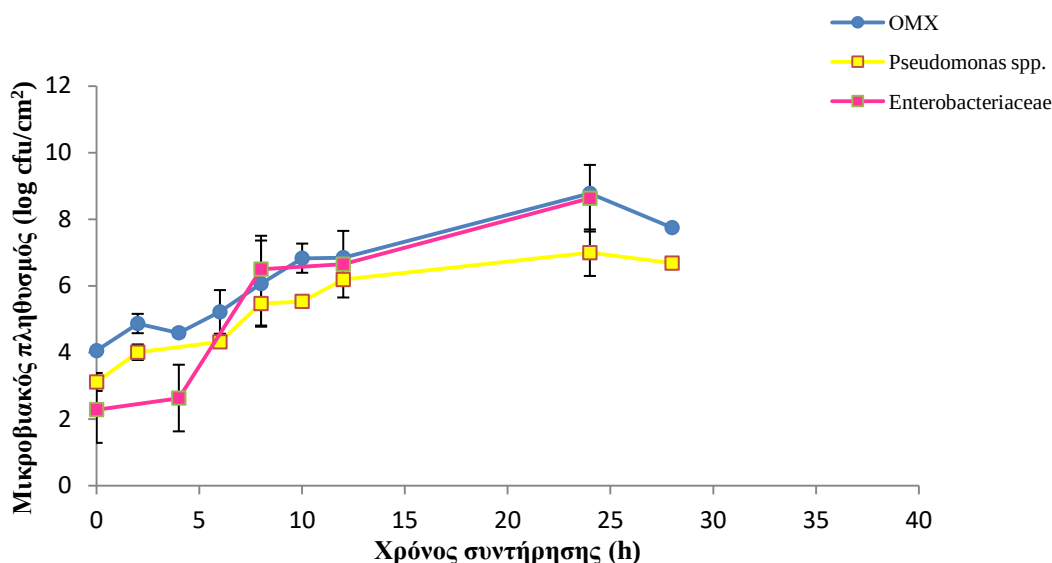
Γράφημα 5: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 20 °C.



Γράφημα 6: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπουτί κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 25 °C.



Γράφημα 7: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπουτί κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 30 °C.



Γράφημα 8: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 35 °C.

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται ότι στα **Γραφήματα 1, 2, 3 και 4** που αντιστοιχούν στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, ο αρχικός πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (στις 0 ώρες συντήρησης) ήταν 4.55 log cfu/cm², για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ανερχόταν στους 4.08 log cfu/cm², για τα οξυγαλακτικά βακτήρια ο πληθυσμός ήταν 2.69 log cfu/cm², για το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* ήταν 2.66 log cfu/cm², ενώ για τα εντεροβακτήρια ο πληθυσμός έφτανε τους 2.26 log cfu/cm². Στον **Πίνακα 8** αναγράφονται αναλυτικά για κάθε θερμοκρασία συντήρησης (0, 5, 10, 15 °C) και για κάθε μικροβιακό πληθυσμό ο αρχικός (για την 0 ώρα συντήρησης) και ο τελικός πληθυσμός των μικροοργανισμών. Τα διαγράμματα επιβεβαιώνουν πως ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., καθώς η πορεία των καμπυλών ανάπτυξης τους στα **Γραφήματα 1, 2, 3 και 4** ακολουθούσε παρόμοια πορεία ανάπτυξης με αυτήν της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Skandamis & Nychas, 2001, Dominguez and Schaffner, 2007, Nychas et al., 2008). Επιπλέον, με βάση τον **Πίνακα 8** φαίνεται ότι ο αρχικός αλλά και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας με τον πληθυσμό των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp. να βρίσκονται πολύ κοντά, πράγμα το οποίο με την σειρά του επιβεβαιώνει την κυρίαρχη παρουσία του γένους *Pseudomonas* spp. Παράλληλα, η δεύτερη πληθυσμιακά μεγαλύτερη κατηγορία αλλοιογόνων μικροοργανισμών φαίνεται ότι ήταν τα εντεροβακτήρια, τα οποία στις θερμοκρασίες συντήρησης των 10 και 15 °C έφεραν σχετικά υψηλό μικροβιακό φορτίο συγκριτικά με οποιαδήποτε άλλη μικροβιακή ομάδα, πέραν αυτής των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp..

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας αρχικού και τελικού πληθυσμού για OMX, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και Enterobacteriaceae για τις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5, 10, 15 °C).

Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός OMX (log CFU/cm ²) (0 h)	Τελικός πληθυσμός OMX (log CFU/cm ²)
0	4.55	7.57 (456 h)
5	4.55	8.36 (384 h)
10	4.55	8.51 (196 h)
15	4.55	8.38 (168 h)
Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός <i>Pseudomonas</i> spp. (log CFU/cm ²) (0 h)	Τελικός πληθυσμός <i>Pseudomonas</i> spp. (log CFU/cm ²)
0	4.08	7.04 (456 h)
5	4.08	7.89 (384 h)
10	4.08	8.24 (196 h)
15	4.08	7.84 (168 h)
Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός <i>Brochothrix thermosphacta</i> (log CFU/cm ²) (0 h)	Τελικός πληθυσμός <i>Brochothrix thermosphacta</i> (log CFU/cm ²)
0	2.66	5.30 (456 h)
5	2.66	6.37 (384 h)
10	2.66	6.24 (196 h)
15	2.66	6.25 (168 h)
Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός LAB (log CFU/cm ²) (0 h)	Τελικός πληθυσμός LAB (log CFU/cm ²)
0	2.69	4.29 (456 h)
5	2.69	5.87 (384 h)
10	2.69	7.24 (196 h)
15	2.69	6.35 (168 h)
Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός Enterobacteriaceae (log CFU/cm ²) (0 h)	Τελικός πληθυσμός Enterobacteriaceae (log CFU/cm ²)
0	2.26	3.97 (432 h)
5	2.26	6.22 (384 h)

10	2.26	7.70 (196 h)
15	2.26	7.50 (168 h)

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα ανάπτυξης για τις χαμηλές θερμοκρασίες, προκύπτει μια σχετικά μεγάλη διαφοροποίηση μικροβιακής ανάπτυξης για όλα τα είδη μικροοργανισμών από θερμοκρασία σε θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στους 0 και 5 °C, σε διάφορες ώρες συντήρησης ο μικροβιακός πληθυσμός διέφερε σημαντικά σε σχέση με τον μικροβιακό πληθυσμό για δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10 και 15 °C για τις ίδιες ώρες συντήρησης. Ενδεικτικά παρακάτω στον **Πίνακα 9** αναγράφεται πως μεταβάλλεται ο μικροβιακός πληθυσμός από θερμοκρασία σε θερμοκρασία κατά την συντήρηση των δειγμάτων σε διάφορες ώρες συντήρησης (24, 48, 72, 96 ώρες). Με βάση τον **Πίνακα 9** φαίνεται ο καθοριστικός ρόλος της θερμοκρασίας στην συντήρηση του προϊόντος, καθώς οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, όπως για παράδειγμα οι 0 και 5°C, λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη μικροοργανισμών συγκριτικά με τις θερμοκρασίες συντήρησης των 10 και 15 °C, που ευνοήθηκε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (Παπαδοπούλου, 2013).

Επιπρόσθετα, στα πλαίσια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα για τον προσδιορισμό ζυμών/μυκήτων. Λόγω αναξιόπιστων αποτελεσμάτων, καθώς παρατηρήθηκαν πολλές επιμολύνσεις κατά την διαδικασία των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων τα διαγράμματα ανάπτυξης για τις ζύμες/μύκητες παρατίθενται στο **Παράρτημα Α**.

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας μικροβιακής ανάπτυξης για OMX, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και Enterobacteriaceae για χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5, 10, 15 °C) στις 24, 48, 72, 96 ώρες συντήρησης.

Θερμοκρασία (°C)	Ώρα συντήρησης (h)	OMX (log CFU/cm ²)	<i>Pseudomonas</i> spp. (log CFU/cm ²)	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (log CFU/cm ²)	LAB (log CFU/cm ²)	Enterobacteriaceae (log CFU/cm ²)
0	24	4.73	4.27	3.19	2.47	1.94
5	24	4.92	4.65	3.64	2.23	2.78
10	24	5.98	4.89	3.82	2.65	2.11
15	24	7.02	6.52	5.42	4.33	3.93
0	48	4.55	4.46	3.23	2.39	2.08
5	48	5.52	4.93	4.09	2.50	3.09
10	48	6.79	6.26	5.34	4.31	4.39
15	48	7.81	7.64	5.77	5.49	6.75
0	72	4.76	4.32	3.34	2.24	2.44
5	72	6.15	5.74	4.36	3.03	3.86
10	72	7.69	7.36	5.93	5.11	5.79

15	72	7.92	7.77	5.76	5.80	6.94
0	96	5.27	5.40	4.14	2.56	2.98
5	96	6.86	6.14	5.63	4.07	3.92
10	96	7.70	7.30	6.03	5.65	6.13
15	96	8.09	7.91	6.12	6.68	8.04

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται ότι στα **Γραφήματα 5, 6, 7 και 8** που αντιστοιχούν στις υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης, ο αρχικός πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (στις 0 ώρες συντήρησης) ήταν $4.05 \log \text{cfu/cm}^2$, για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ανερχόταν στους $3.11 \log \text{cfu/cm}^2$ και για τα εντεροβακτήρια ο πληθυσμός έφτανε τους $2.28 \log \text{cfu/cm}^2$. Στον **Πίνακα 10** αναγράφονται αναλυτικά για κάθε θερμοκρασία συντήρησης (20, 25, 30, 35 °C) και για κάθε μικροβιακό πληθυσμό ο αρχικός (για την 0 ώρα συντήρησης) και ο τελικός πληθυσμός των μικροοργανισμών. Με βάση τα διαγράμματα και τις τιμές των αρχικών αλλά και τελικών μικροβιακών πληθυσμών φαίνεται ότι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ακολουθούν την πορεία της καμπύλης ανάπτυξης της ΟΜΧ μέχρι και την θερμοκρασία των 25°C, ενώ μετά ο μικροβιακός τους πληθυσμός φαίνεται να παρουσιάζει μια σχετική πτώση. Αντίθετα, τα εντεροβακτήρια παρουσίασαν μια ανοδική τάση και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης ακολουθώντας την πορεία της ΟΜΧ στις θερμοκρασίες συντήρησης των 30 και 35 °C, δείχνοντας ότι αυτά αποτελούν πλέον την κυρίαρχη αλλοιωγόνο μικροχλωρίδα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία (Gill and Newton, 1978, Doulgeraki et al., 2012), καθώς αυτές οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν την ανάπτυξη τους και θερμοκρασίες μέχρι τους 37 °C είναι τυπικές για την ανάπτυξη των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (Baylis, 2011).

Πίνακας 10: Συγκεντρωτικός πίνακας αρχικού και τελικού πληθυσμού για ΟΜΧ, *Pseudomonas* spp. και Enterobacteriaceae για τις υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης (20, 25, 30, 35°C).

Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός ΟΜΧ (log CFU/cm ²) (0 h)	Τελικός πληθυσμός ΟΜΧ (log CFU/cm ²)
20	4.05	9.12 (120 h)
25	4.05	8.37 (56 h)
30	4.05	7.80 (36 h)
35	4.05	7.74 (28 h)
Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός <i>Pseudomonas</i> spp. (log CFU/cm ²)	Τελικός πληθυσμός <i>Pseudomonas</i> spp. (log CFU/cm ²)

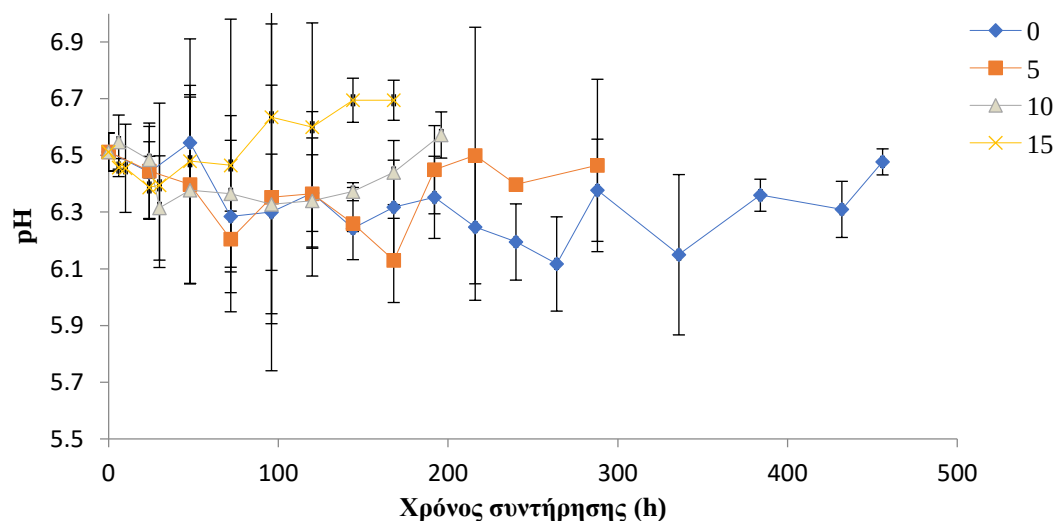
(0 h)		
20	3.11	8.46 (120 h)
25	3.11	7.23 (56 h)
30	3.11	7.01 (36 h)
35	3.11	6.68 (28 h)
Θερμοκρασία (°C)	Αρχικός πληθυσμός Enterobacteriaceae (log CFU/cm ²) (0 h)	Τελικός πληθυσμός Enterobacteriaceae (log CFU/cm ²)
20	2.28	7.71 (96 h)
25	2.28	8.28 (56 h)
30	2.28	7.24 (32 h)
35	2.28	8.62 (24 h)

4.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH

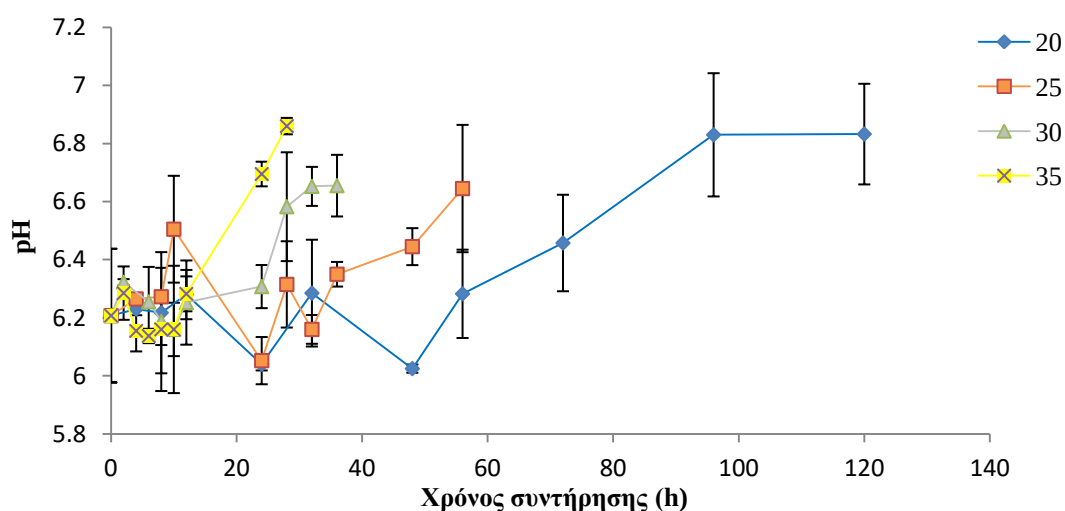
Το pH των δειγμάτων παρουσίασε σχετικά πολύ μικρές μεταβολές κατά τη διάρκεια συντήρησης του στις διαφορετικές θερμοκρασίες, χωρίς όμως να επεκτείνεται σε τιμές εκτός του φυσιολογικού εύρους για το μπούτι κοτόπουλου του οποίου το pH κυμαίνεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στο 6.62 (Wattanachant et al. 2004). Στο **Γράφημα 9** παρουσιάζεται η διακύμανση του pH κατά τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες των 0, 5, 10, 15 °C και στο **Γράφημα 10** φαίνεται η διακύμανση του pH κατά τη συντήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασίες των 20, 25, 30 και 35 °C. Ενδεικτικά στον **Πίνακα 11** παρουσιάζεται η αρχική, η τελική, η ελάχιστη και η μέγιστη παρατηρούμενη τιμή pH κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτου μπούτι κοτόπουλου σε όλες τις διαφορετικές θερμοκρασίες. Γενικά, οποιαδήποτε αύξηση στην τιμή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων οφείλεται στην πρωτεολυτική δραστηριότητα των μικροοργανισμών που επικρατούν τη δεδομένη περίοδο στο δείγμα (κυρίως των *Pseudomonas* spp., όπως αποδείχθηκε και από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα), οι οποίοι παράγουν βασικούς μεταβολίτες, όπως αμμωνία, μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα, σουλφίδια και αμίνες (Nychas and Tassou, 1997, Σπυρέλλη, 2018), τα οποία ευθύνονται για την άνοδο του pH στα δείγματα. Αντίθετα, οποιαδήποτε πτώση του pH μπορεί να οφείλεται στη δραστηριότητα μικροοργανισμών, όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ο *Brochothrix thermosphacta*, τα οποία παράγουν οργανικά οξέα κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης, με αποτέλεσμα η τιμή του pH των αλλοιωμένων δειγμάτων να είναι χαμηλότερη της αρχικής (Borch, Kant-Muemans & Blixt, 1996).

Ωστόσο, όπως φαίνεται και από τα **Γραφήματα 9** και **10** και από τον **Πίνακα 11** αλλά και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Ellis, Broadhurst & Goodacre, 2004), δεν μπορεί να υπάρξει κάποια άμεση συσχέτιση της μεταβολής του pH με τη

θερμοκρασία, καθώς αυτή επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων που αφορούν τόσο ενδογενείς ιδιότητες του δείγματος, όσο και το περιβάλλον συντήρησης του.



Γράφημα 9: Διακύμανση του pH κατά τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες των 0, 5, 10, 15 °C.



Γράφημα 10: Διακύμανση του pH κατά τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες των 20, 25, 30 κα 35 °C.

Πίνακας 11: Αρχική, τελική, ελάχιστη και μέγιστη τιμή pH κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτου μπούτι κοτόπουλου σε διαφορετικές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C).

Τιμή pH	Θερμοκρασία (°C)							
	0	5	10	15	20	25	30	35
Αρχική	6.51	6.51	6.51	6.51	6.20	6.20	6.20	6.20

Τελική	6.47	6.46	6.57	6.69	6.83	6.64	6.65	6.86
Ελάχιστη παρατηρούμενη	6.15	6.13	6.31	6.38	6.04	6.16	6.16	6.15
Μέγιστη παρατηρούμενη	6.54	6.51	6.57	6.69	6.83	6.64	6.65	6.86

4.3 Αποτελέσματα μαθηματικών μοντέλων

4.3.1 Αποτελέσματα πρωτογενούς μοντέλου- Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης

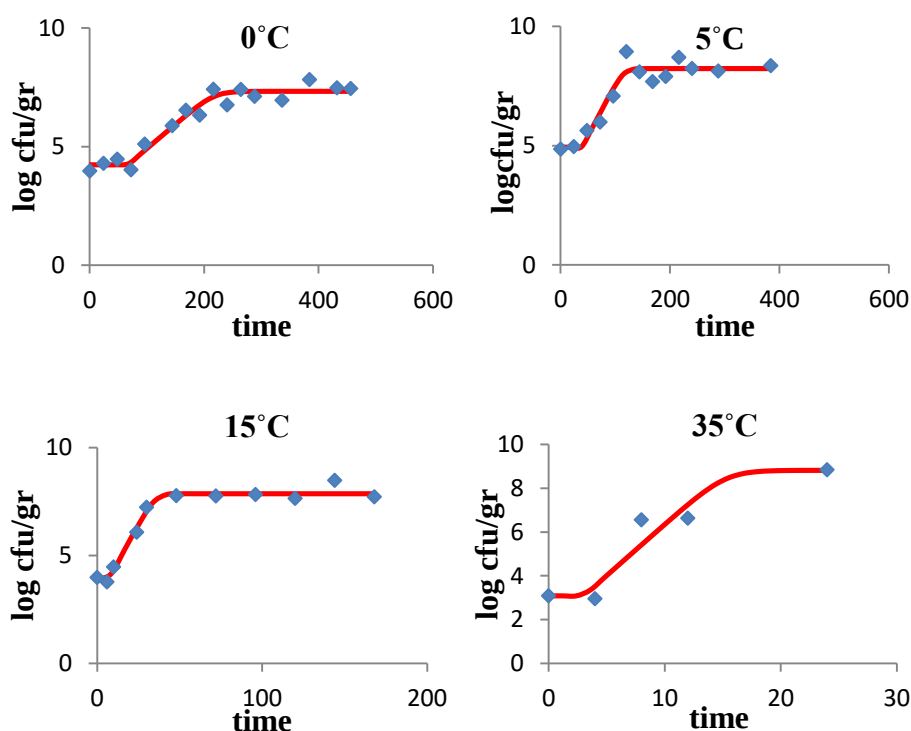
Κατά την εφαρμογή πρωτογενών μοντέλων ανάπτυξης (Baranyi και Roberts, 1994) για τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν που είναι η ΟΜΧ, τα γένη των βακτηρίων *Pseudomonas* spp., ο *Brochothrix thermosphacta*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα εντεροβακτήρια προέκυψαν οι παρακάτω κινητικές παράμετροι (**Πίνακας 10**). Στον **Πίνακα 12** παρουσιάζονται οι κινητικές παράμετροι για όλους τους μικροοργανισμούς και για όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C). Όσον αφορά τα αποτελέσματα των χαμηλών θερμοκρασιών, στους 0 και 5 °C παρατηρείται σχετικά μεγάλη φάση προσαρμογής και μικρός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε αυτές τις θερμοκρασίες υπάρχει μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης όλων των μικροοργανισμών. Αντιθέτως, στις θερμοκρασίες των 10 και 15 °C παρατηρείται μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος αυξάνεται περισσότερο στους 15 °C, αλλά και μικρότερη φάση προσαρμογής, η οποία τείνει να λαμβάνει τις χαμηλότερες τιμές κυρίως στους 15 °C. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συντήρηση των δειγμάτων στις θερμοκρασίες των 10 και 15 °C δεν επιδρά παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη μικροοργανισμών (Panagou et al., 2014). Παρόμοια συμπεριφορά προσαρμογής παρουσίασαν και οι μικροοργανισμοί που συντηρήθηκαν στις πιο υψηλές θερμοκρασίες των 20, 25, 30, 35 °C, στις οποίες μάλιστα παρατηρείται ακόμα πιο μικρή φάση προσαρμογής και μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης, καθώς οι θερμοκρασίες αυτές ευνοούν στο έπακρο την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν. Αξίζει να επισημανθεί πως κατά την εφαρμογή του μοντέλου, το τυπικό σφάλμα προσαρμογής παρέμεινε σημαντικά μικρότερο της μονάδας με τη μεγαλύτερη τιμή στις χαμηλές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15 °C) να φτάνει στο 0.6302 και για τις υψηλές θερμοκρασίες (20, 25, 30, 35 °C) να ξεπερνάει κατά λίγο τη μονάδα φτάνοντας στο 1.3307, ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 παρέμεινε υψηλός σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος λαμβάνοντας τιμές πολύ κοντά στη μονάδα, γεγονός που επιβεβαιώνει την καταλληλότητα του μοντέλου. Ακολούθως, στο **Γράφημα 11** παρουσιάζονται χαρακτηριστικά καμπυλών ανάπτυξης, μετά την εφαρμογή του μοντέλου, στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί καλύτερη προσαρμογή.

Πίνακας 12: Κινητικές παράμετροι αύξησης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών του φιλέτου μπούτι κοτόπουλου κατά τη συντήρηση του υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες των 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994).

OMX						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
0	0.0403	27.2559	4.3734	7.5608	0.9216	0.3418
5	0.0798	19.6596	4.6009	8.2453	0.9330	0.3646
10	0.1032	2.2E-08	4.5748	8.2112	0.8922	0.4943
15	0.2374	4.7103	4.4376	8.1260	0.9154	0.4333
<i>Pseudomonas spp.</i>						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
0	0.0491	54.9351	4.2385	7.0655	0.9088	0.3635
5	0.0820	21.1429	4.1772	7.9009	0.9168	0.4332
10	0.1383	10.0036	4.0378	7.9324	0.8932	0.5525
15	0.3203	6.5947	4.0130	7.8472	0.9646	0.3125
<i>Brochothrix thermosphacta</i>						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
0	0.0282	4.7E-07	2.7188	5.6063	0.8352	0.4454
5	0.0668	3.9170	2.8022	6.1670	0.8694	0.4489
10	0.1233	1.7816	2.7245	6.1717	0.9293	0.3584
15	0.3683	5.4743	2.6344	6.0064	0.9284	0.3870
LAB						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
0	0.0456	66.1431	2.2308	4.3496	0.7276	0.4980
5	0.1252	55.9818	2.4713	6.2475	0.9127	0.5132
10	0.0772	9.5048	2.6383	7.3208	0.9380	0.4209
15	0.2013	5.7340	2.5342	6.5750	0.9501	0.3912
Enterobacteriaceae						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
0	0.1886	45.0992	2.2399	4.2694	0.5569	0.6302
5	0.0614	21.7448	2.3779	6.2616	0.9108	0.4640
10	0.1273	11.2084	2.0473	7.1042	0.9419	0.4878
15	0.3094	8.1552	1.9908	7.4251	0.9631	0.4383
OMX						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
20	0.3328	3.4272	4.1471	8.3614	0.9404	0.4519
25	0.5044	1.7112	4.0509	8.1141	0.9244	0.4760
30	0.7268	2.4444	4.1045	8.0973	0.9550	0.3483
35	0.6817	1.7243	4.2520	8.2415	0.8536	0.6179

<i>Pseudomonas</i> spp.						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
20	0.3888	3.1253	3.0449	7.9119	0.9686	0.3746
25	0.8835	3.8451	3.0328	7.6085	0.8820	0.7080
30	0.8259	2.4751	3.0495	7.0817	0.9256	0.4442
35	0.5890	0.4528	3.2687	6.8265	0.9055	0.4153

Enterobacteriaceae						
T	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	y0 (log cfu/cm ²)	yend (log cfu/cm ²)	R ²	RMSE
20	0.4180	7.5403	2.2371	7.4029	0.9513	0.5386
25	0.4652	1.8442	2.2016	8.3987	0.9214	0.7080
30	1.0077	2.7177	2.3235	7.3107	0.9255	0.5958
35	1.7580	3.1212	2.2763	8.1820	0.7579	1.3307

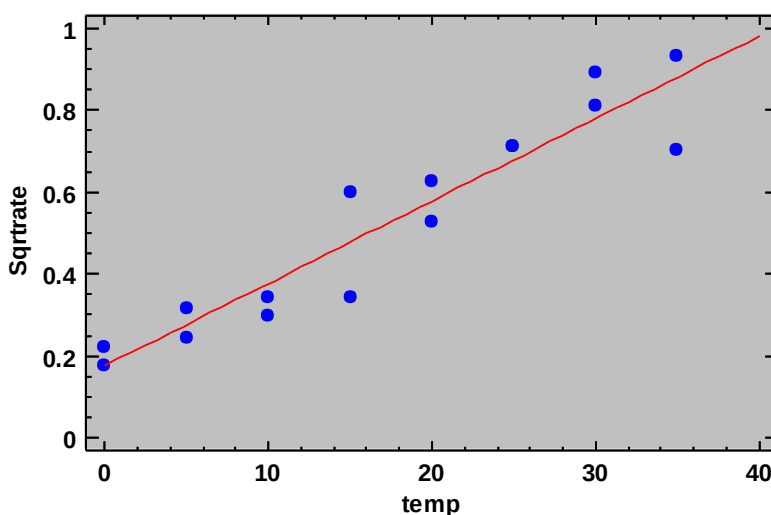


Γράφημα 11: Χαρακτηριστικά παραδείγματα προσαρμογής του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi και Roberts (1994) στα πειραματικά δεδομένα για την ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp. στους 0 °C (πάνω αριστερά), της OMX στους 5 °C (πάνω δεξιά), των *Pseudomonas* spp. στους 15 °C (κάτω αριστερά) και των εντεροβακτηρίων (κάτω δεξιά).

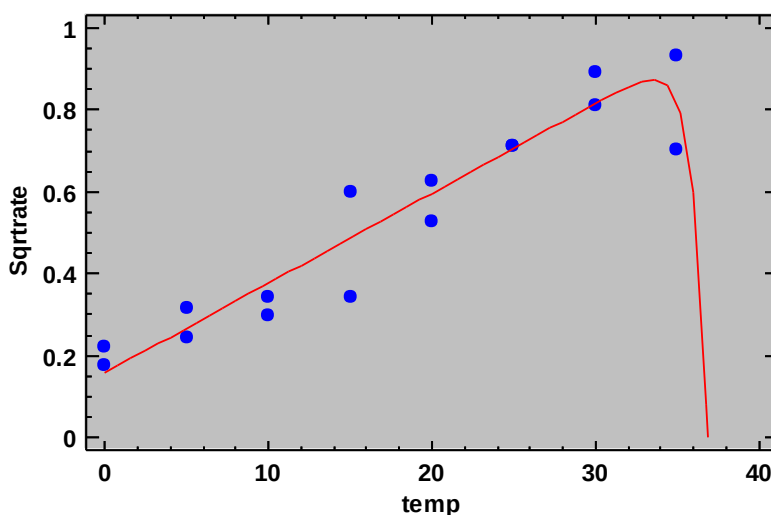
4.3.2 Αποτελέσματα δευτερογενούς μοντέλου- Προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του προγράμματος STATGRAPHICS Centurion XVII, Version 17.2.00, εφαρμόστηκε η εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky

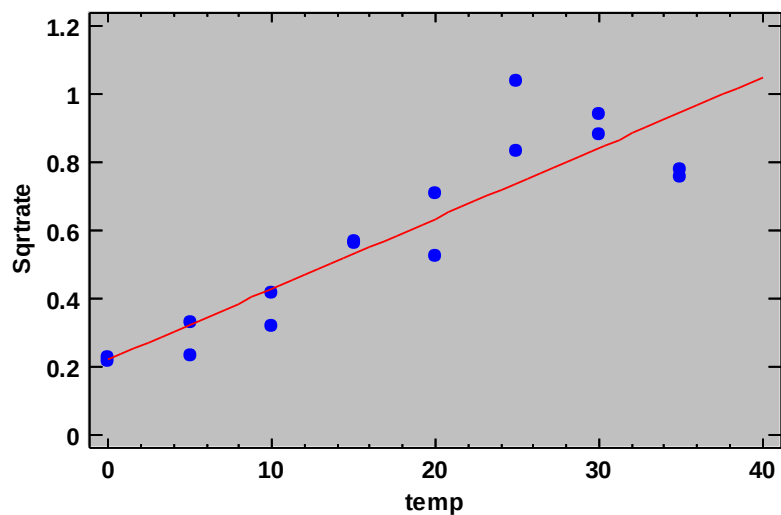
αλλά και η τροποποιημένη εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky, προκειμένου να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στη ρίζα του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ($\mu_{\max}$) τόσο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Γράφημα 12,13) όσο και των *Pseudomonas* spp. (Γράφημα 14,15). Οι τιμές που υπολογίστηκαν για την ελάχιστη ($T_{\min}$) και τη μέγιστη ($T_{\max}$) θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών, του συντελεστή συσχέτισης-παλινδρόμησης (b), της παραμέτρου c , της τιμής R^2 και RMSE παρουσιάζονται στους Πίνακες 13 και 14.



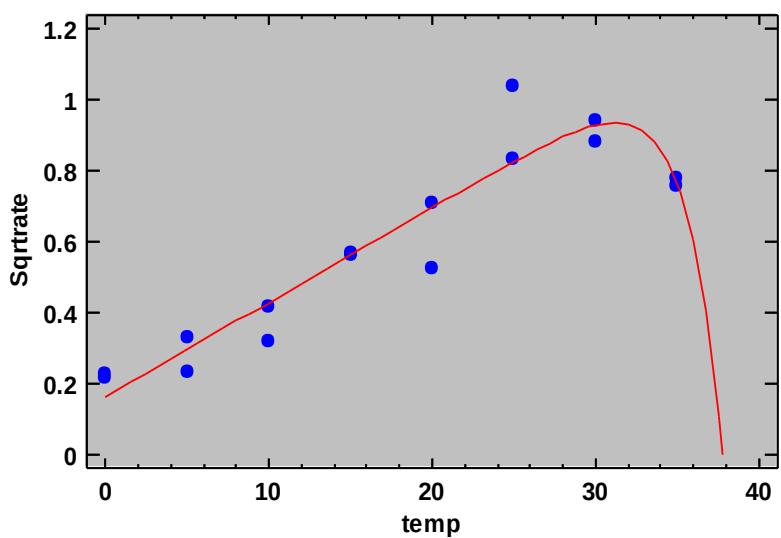
Γράφημα 12: Επίδραση της θερμοκρασίας στη ρίζα του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της OMX σύμφωνα με την εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky.



Γράφημα 13: Επίδραση της θερμοκρασίας στη ρίζα του μέγιστου ειδικού ρυθμού της OMX σύμφωνα με την τροποποιημένη εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky.



Γράφημα 14: Επίδραση της θερμοκρασίας στη ρίζα του μέγιστου ειδικού ρυθμού των *Pseudomonas* spp. σύμφωνα με την εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky.



Γράφημα 15: Επίδραση της θερμοκρασίας στη ρίζα του μέγιστου ειδικού ρυθμού των *Pseudomonas* spp. σύμφωνα με την τροποποιημένη εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky.

Πίνακας 13: Παράμετροι της εξίσωσης του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky για την OMX και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp..

Παράμετροι του μοντέλου	OMX	<i>Pseudomonas</i> spp.
b	0.02	0.02
Tmin	-8	-10
R ²	0.8957	0.8091

RMSE	0.0637	0.0853
-------------	--------	--------

Πίνακας 14: Παράμετροι της τροποποιημένης εξίσωσης του δευτερογενούς μοντέλου Ratkowsky για την OMX και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp..

Παράμετροι του μοντέλου	OMX	<i>Pseudomonas</i> spp.
b	0.02	0.02
Tmin	-7	-6
Tmax	36	37
c	1.14	0.42
R²	0.9099	0.9089
RMSE	0.0586	0.0522

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η ρίζα του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, τουλάχιστον μέχρι τους 30-35 °C. Πιο συγκεκριμένα, από τα γραφήματα φαίνεται ότι για την OMX η ρίζα του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης αυξάνεται σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C, ενώ για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. παρατηρείται μια σχετική πτώση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C. Αυτό με την σειρά του επιβεβαιώνει την δράση άλλων μικροοργανισμών, πιθανότατα των εντεροβακτηρίων, σε αυτές τις υψηλές θερμοκρασίες (30- 35 °C). Με βάση τα αποτελέσματα, κατά τα οποία η τιμή R² πλησιάζει τη μονάδα, αλλά και με βάση τις χαμηλές τιμές του RMSE (<1) (Sant'Ana, Franco and Schaffner, 2012, Feng et al., 2018), μπορούμε να συμπεράνουμε πως το δευτερογενές μοντέλο του Ratkowsky και πιο συγκεκριμένα το δευτερογενές μοντέλο της τροποποιημένης εξίσωσης Ratkowsky, είναι το κατάλληλο μοντέλο για την περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.

4.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου

Κατά την πραγματοποίηση του οργανοληπτικού ελέγχου εξετάστηκαν δείγματα φιλέτου μπούτι κοτόπουλου, που είχαν συντηρηθεί αερόβια σε διαφορετικές θερμοκρασίες (n= 103), ως προς την εμφάνιση και την οσμή. Όπως έχει προαναφερθεί, τα δείγματα με βαθμολογία 1 ορίστηκαν ως φρέσκα και αποδεκτά, τα δείγματα με βαθμολογία 2 ως οριακά αποδεκτά με χαρακτηριστικά που δεν τα καθιστούσαν εμφανώς αλλοιωμένα και τέλος με βαθμολογία 3 ορίστηκαν ως μη αποδεκτά τα δείγματα που παρουσίαζαν έντονη δυσοσμία και ασυνήθιστη εμφάνιση. Συμπερασματικά, τα δείγματα που τελικά θεωρήθηκαν ως αποδεκτά από τον μέσο καταναλωτή ήταν αυτά με βαθμολογία από 1 έως 2, ενώ αυτά με βαθμολογία μεγαλύτερη από 2 θεωρήθηκαν αλλοιωμένα. Στον **Πίνακα 15** παρουσιάζονται για την κάθε θερμοκρασία, οι ώρες συντήρησης που απαιτούνταν

μέχρις ότου ένα δείγμα να αναγνωριστεί από το πάνελ ως αλλοιωμένο, ο μικροβιακός πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και των *Pseudomonas* spp. που επικρατούσε τη δεδομένη χρονική στιγμή, καθώς και οι βαθμολογίες που συγκέντρωσε το ανάλογο δείγμα ως προς την εμφάνιση και την οσμή. Όπως φαίνεται και από τον **Πίνακα 15**, η αλλοίωση γινόταν αντιληπτή αρκετά σύντομα στις υψηλές θερμοκρασίες, ενώ στις χαμηλές καθυστέρουσε αρκετά και ιδιαιτέρως στους 0 °C, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η θερμοκρασία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την εξέλιξη της αλλοίωσης σε ένα τρόφιμο (Koutsoumanis et al., 2005, Mataragas et al., 2019). Στην περίπτωση των 30 °C, φάνηκε ότι η γνώμη του καταναλωτικού κοινού είχε μεγάλη απόκλιση σε σχέση με τον μικροβιακό πληθυσμό και θεωρήθηκε το δείγμα ως αλλοιωμένο χωρίς να είναι. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στον τρόπο που αξιολογεί ο καθένας, σε διάφορες προσωπικές προτιμήσεις και πολλούς άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Γενικά, σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, η μικροβιακή αλλοίωση στα δείγματα που είχαν συντηρηθεί στους 30 °C επέρχεται κυρίως στις 12 ώρες συντήρησης και μετά. Αξίζει να αναφερθεί πως στα δείγματα προχωρημένης αλλοίωσης, παρατηρούνταν σύμφωνα με το καταναλωτικό κοινό επιφανειακή κολλοειδής επιφάνεια- γλίτσα και έντονη μυρωδιά σήψης, που υποδηλώνει την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού σε επίπεδα μεγαλύτερα από $10^7 \log \text{cfu/cm}^2$ (Nychas et al., 2008, Papadopoulou et al., 2011, Lytou, Nychas and Panagou, 2018). Η υπόθεση αυτή συμπίπτει με τα μικροβιολογικά δεδομένα, καθώς ο κυρίαρχος μικροοργανισμός, που όπως φάνηκε μέχρι την θερμοκρασία των 25 °C ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., μέσω της πρωτεολυτικής τους δραστηριότητας παράγουν δύσοσμες ενώσεις όπως αμμωνία, σουλφίδια και αμίνες καθώς και εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες που ευθύνονται για την αλλοιωμένη εμφάνιση των δειγμάτων (Borch, 1996, Dominguez and Schaffner, 2007, Nychas et al., 2008).

Πίνακας 15: Συνοπτικά αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου.

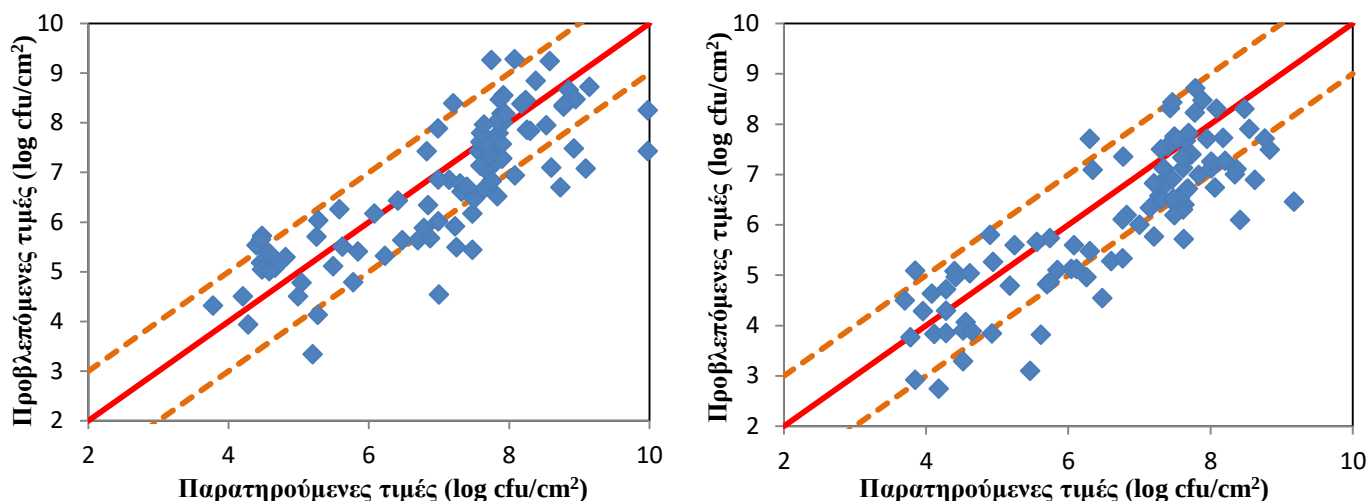
Θερμοκρασία (°C)	Ώρες συντήρησης (h)	OMX ($\log \text{cfu/cm}^2$)	<i>Pseudomonas</i> spp. ($\log \text{cfu/cm}^2$)	Αποτελέσματα οργανοληπτικού
0	240	6.99	6.76	2.50
5	96	7.08	6.38	2.30
10	48	6.90	6.55	2.28
15	24	7.46	6.98	2.13
20	24	7.40	6.80	2.53
25	24	8.22	7.59	2.93
30	6	4.66	3.72	2.13
35	12	6.84	6.25	2.15

4.5 Αποτελέσματα από την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)

Για την αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp. σε δείγματα από φιλέτο μπούτι κοτόπουλου, τα οποία ήταν αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες, παρατίθενται παρακάτω στον **Πίνακα 16**, οι δείκτες απόδοσης για την εκπαίδευση, την επικύρωση και τη πρόβλεψη του μοντέλου. Οι συντελεστές συσχέτισης r_c , r_{cv} , r_p και για τις δύο κατηγορίες μικροβιακών πληθυσμών λαμβάνουν τιμές που κυμαίνονται από 0.8153 μέχρι 0.9301, εκτός από τον συντελεστή r_{cv} στην περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp. που είναι κοντά στην τιμή 0.7522. Γενικά, οι τιμές αυτές των συντελεστών συσχέτισης, συνδυαστικά με τα $RMSE_C$, $RMSE_{CV}$, $RMSE_P$ όπου κυμαίνονται μεταξύ 0.5456 έως 1.1564, υποδεικνύουν ότι τα δεδομένα από την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) συσχετίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.. Η ικανοποιητική απόδοση του μοντέλου για την OMX και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. φαίνεται στο **Γράφημα 16**, στο οποίο παρουσιάζονται τα διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών.

Πίνακας 16: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) σε δείγματα από φιλέτο μπούτι κοτόπουλου αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες.

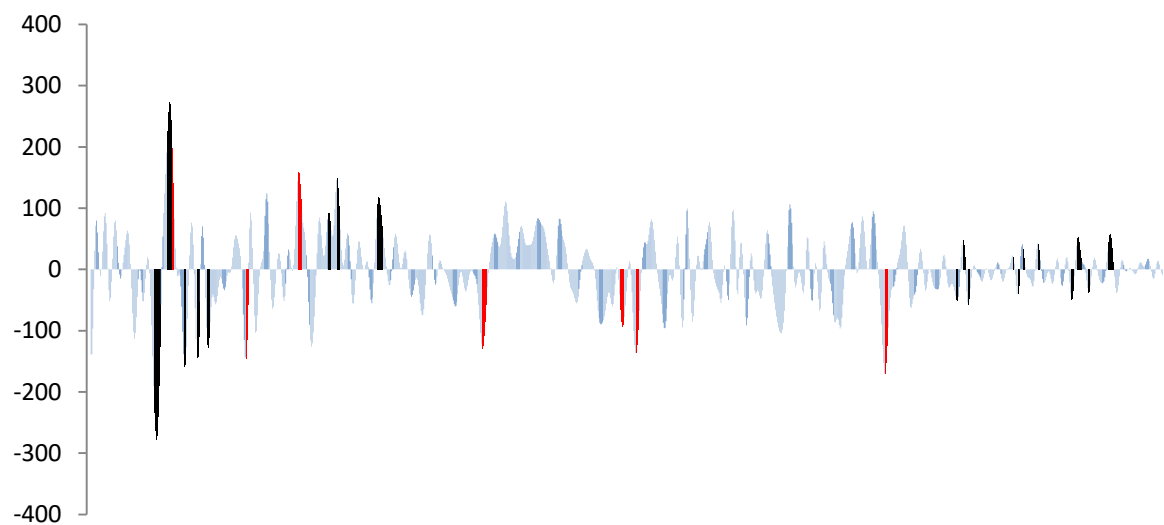
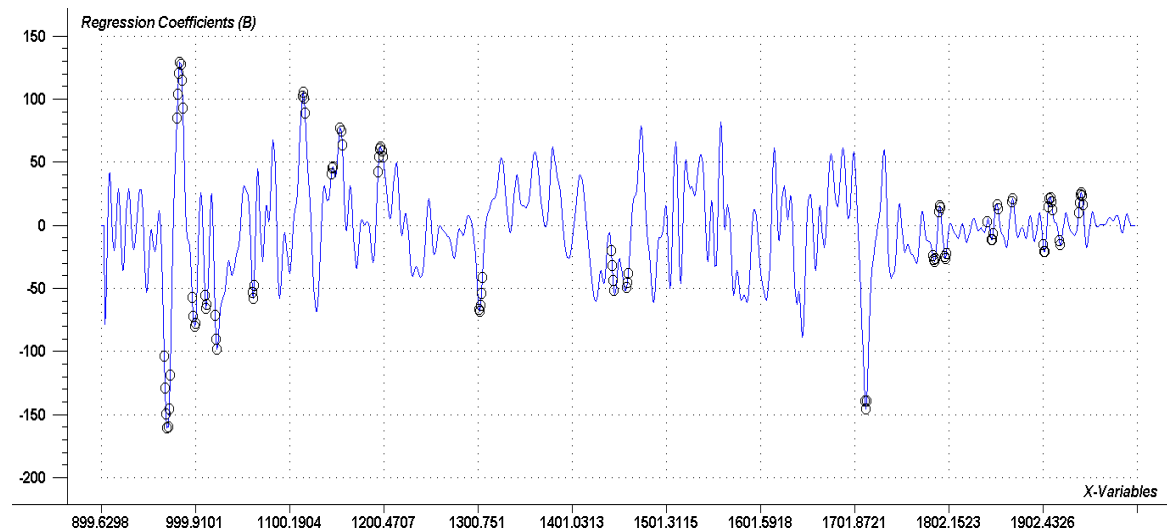
		OMX	<i>Pseudomonas</i> spp.
Εύρος Βαθμονόμησης (log cfu/g)		3.77-11.20	2.30-10.57
Εύρος Πρόβλεψης (log cfu/g)		3.77-9.97	3.69-9.17
Λανθάνουσες συνιστώσες (LVs)		12	11
Ανάπτυξη	$RMSE_C$	0.5456	0.8006
	r_c	0.9301	0.8948
Επικύρωση CV	$RMSE_{CV}$	0.8730	1.1564
	r_{cv}	0.8168	0.7522
Πρόβλεψη	$RMSE_P$	0.9017	1.0341
	r_p	0.8153	0.8232



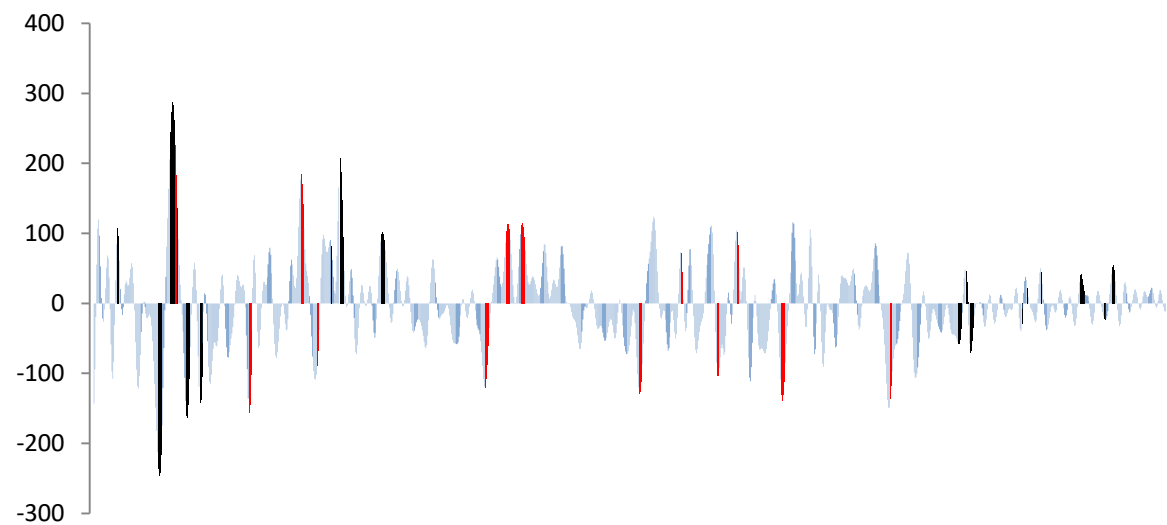
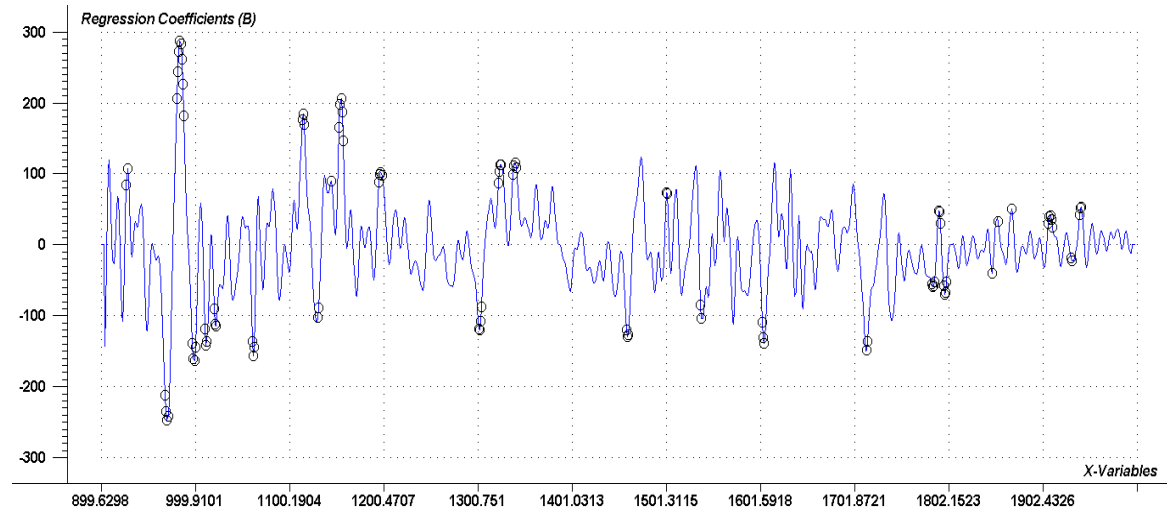
Γράφημα 16: Διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων (—) με τις παρατηρούμενες (♦) τιμές για την OMX (αριστερά) και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. (δεξιά) σε δείγματα από φιλέτο μπούτι κοτόπουλου αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες. Οριοθέτηση ορίων αστοχίας πρόβλεψης στον ± 1 λογάριθμο.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δαχτυλικά αποτυπώματα ώστε να προσδιοριστούν οι διάφορες βιοχημικές αλλαγές που μπορεί να υποστεί ένα τρόφιμο κατά την αλλοίωση του (Paradourou et al., 2011). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν μεταξύ 1800 έως 900 cm^{-1} για φρέσκα και αλλοιωμένα δείγματα σε διάφορες θερμοκρασίες και σε διάφορους χρόνους συντήρησης. Οι σημαντικότερες κορυφές που παρατηρούνται στο κρέας κοτόπουλου είναι στα 1.639 cm^{-1} , λόγω της παρουσίας νερού (O- H δονήσεις τάσης) με ταυτόχρονη συμμετοχή από αμίδιο I, στα 1.550 cm^{-1} εξαιτίας της απορρόφησης από αμίδιο II (N- H δεσμοί, C- N δονήσεις τάσης). Δονήσεις αμιδίου μπορεί να παρατηρηθούν επίσης και στα 1.398 cm^{-1} , ενώ κορυφές στα 1.314 και 1.238 cm^{-1} οφείλονται στα αμίδια III (C- N δονήσεις τάσης, N- H δεσμοί, C- O δονήσεις τάσης, O= C- N δεσμοί). Κορυφές στα 1.460 , 1.240 και 1.175 cm^{-1} μπορεί να αποδοθούν στα λίπη (C O εστέρες). Επιπλέον, κορυφές που προκύπτουν στα 1.025 έως 1.140 cm^{-1} μπορεί να οφείλονται στις αμίνες (C- N δονήσεις τάσης) (Alexandrakis et al., 2009, Vasconcelos et al., 2014). Γενικά, οι αριθμοί κυμάτων στα 1640 cm^{-1} και 1080 cm^{-1} , από 1.320 έως 1.305 cm^{-1} , από 1.408 έως 1.365 cm^{-1} και από 1580 έως 1480 cm^{-1} , αποδίδονται σε C- N δονήσεις τάσης από αμίνες και από αμίδια I και II αντίστοιχα. Αυτές οι ζώνες υποδηλώνουν έντονα ότι τα φάσματα FTIR σε αυτό το εύρος των συχνοτήτων οφείλονται στην παρουσία πρωτεϊνών και πιθανών ελεύθερων αμινοξέων, αμινών ή ουσιών που φέρουν άζωτο και τις αλληλεπιδράσεις τους με το νερό. Αυτό με την σειρά του επιβεβαιώνει το

γεγονός ότι οι πρωτεολυτικές αλλαγές αναγνωρίζονται ως ένα μείζον συμβάν που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μικροβιακής αλλοίωσης και συνδέεται με τη δυναμική της αλλοίωσης στο κρέας κοτόπουλου (Alexandrakis et al., 2009, Vasconcelos et al., 2014 Ellis et al., 2004). Παρακάτω στα **Γραφήματα 17** και **18** διαφαίνονται οι κορυφές που δόθηκαν από τα φασματογραφήματα και με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι πιο σημαντικές κορυφές, οι οποίες συνδέονται με την αλλοίωση. Επίσης, από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) προσδιορίστηκαν 12 κύριες συνιστώσες (PCs) για το μοντέλο της OMX και 11 για το μοντέλο που αφορά τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp..



Γράφημα 17: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης για την ανάπτυξη της ΟΜΧ. Οι σημαντικότερες κορυφές συμβολίζονται με μαύρο χρώμα και οι κορυφές που συνδέονται με την αλλοίωση με κόκκινο χρώμα (κάτω διάγραμμα).

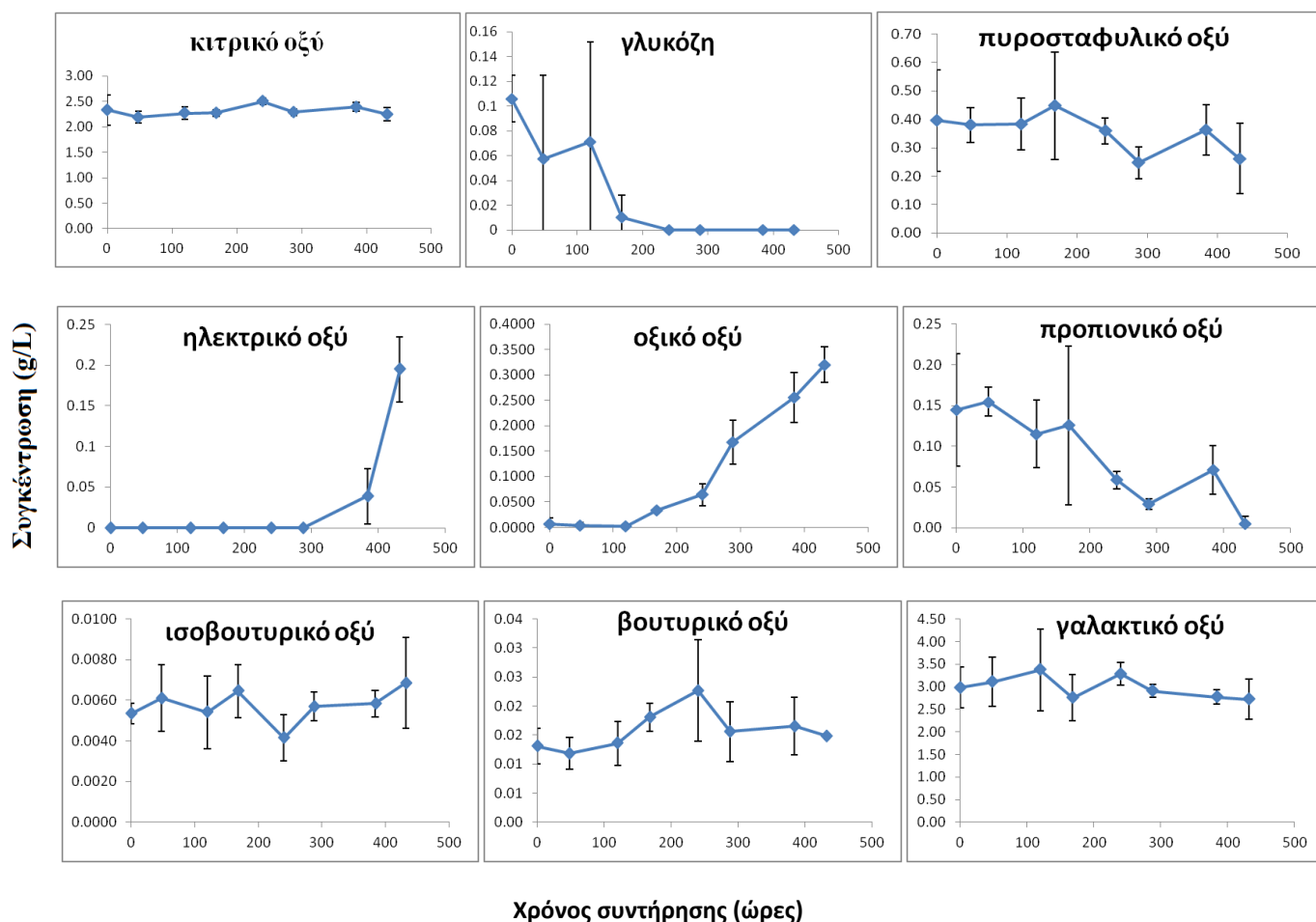


Γράφημα 18: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης για την ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp.. Οι σημαντικότερες κορυφές συμβολίζονται με μαύρο χρώμα και οι κορυφές που συνδέονται με την αλλοίωση με κόκκινο χρώμα (κάτω διάγραμμα).

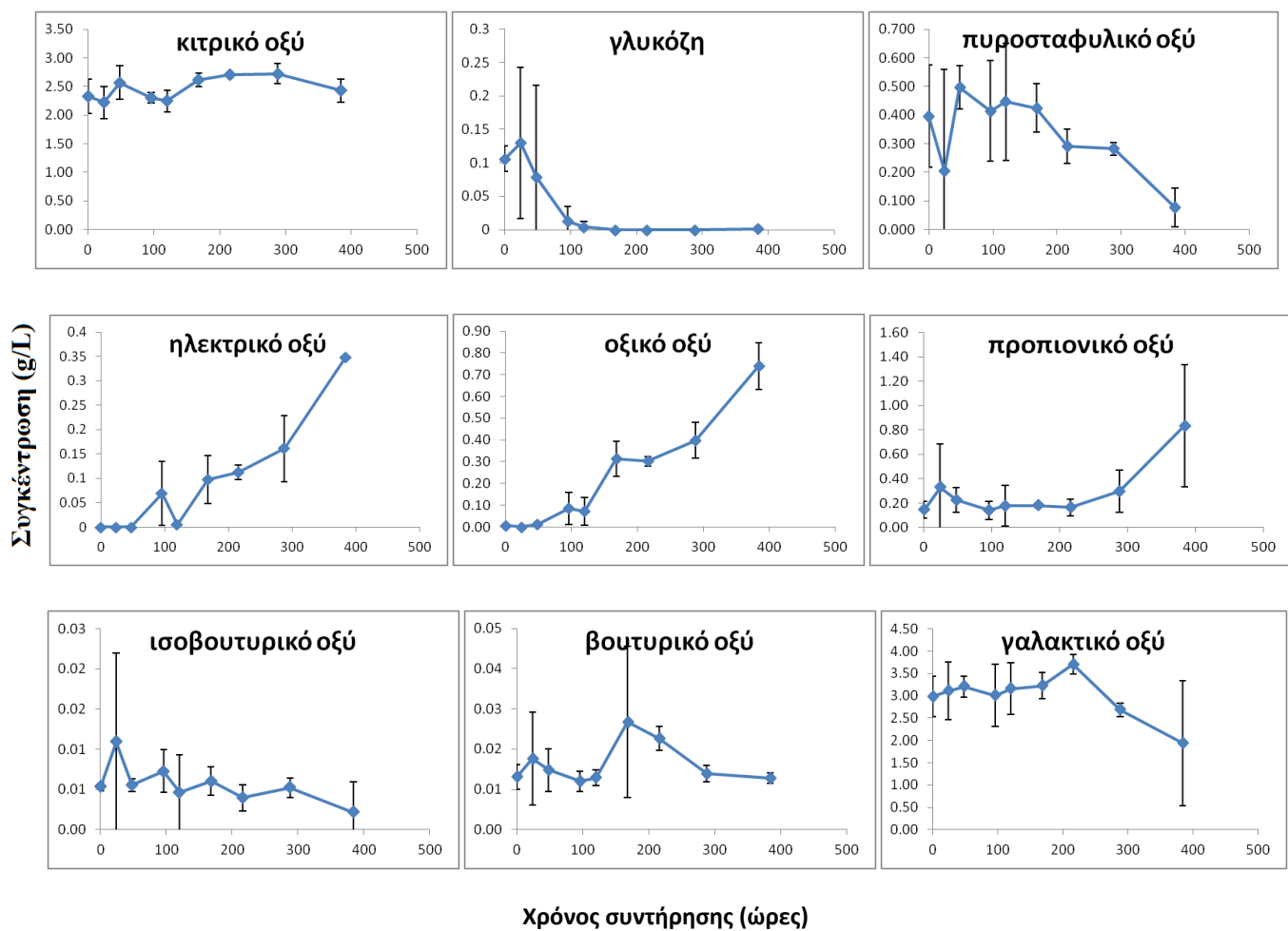
4.6 Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Γενικά, οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και των παραγόμενων οξέων διαφέρουν ανά περίπτωση, καθώς μπορεί να επηρεαστούν από τη σύσταση των αερίων της ατμόσφαιρας και από τη θερμοκρασία συντήρησης των δειγμάτων. Στα παρακάτω **Γραφήματα (19, 20, 21, 22)** παρουσιάζεται αναλυτικά η διακύμανση της συγκέντρωσης των οξέων (κιτρικό, πυροσταφυλικό, ηλεκτρικό, οξικό, προπιονικό, ισοβουτυρικό, βουτυρικό και γαλακτικό οξύ) και της γλυκόζης σε δείγματα που ήταν αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες στους 0, 5, 10 και 15 °C. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε όλες τις θερμοκρασίες, καθώς είναι ευνόητο ότι καταναλώθηκε από τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς. Η μόνη διαφοροποίηση είναι στο χρονικό διάστημα που παρατηρείται αυτή η μείωση, καθώς στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (0 και 5 °C) η συγκέντρωση της γλυκόζης μειώνεται με πιο αργό ρυθμό, ενώ στις πιο υψηλές θερμοκρασίες (10 και 15 °C) μειώνεται πιο γρήγορα, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο ρυθμός μείωσης της γλυκόζης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Κουρκούλη, 2020). Όσον αφορά το γαλακτικό οξύ, παρά τις μικρές αυξομειώσεις, διατηρήθηκε γενικά σε σταθερά επίπεδα. Αυτό συμβαίνει επειδή ναι μεν παράχθηκε από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αλλά καταναλώθηκε δε από τον κυρίαρχο αλλοιογόνο πληθυσμό, όπου σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα αλλά και την υπάρχουσα βιβλιογραφία, είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. Γενικά είναι γνωστό ότι οι αερόβιες συνθήκες τείνουν να προκαλούν σταδιακή μείωση του γαλακτικού οξέος, σε αντίθεση με τις τροποποιημένες ατμόσφαιρες, οι οποίες ευνοούν την αύξηση της συγκέντρωσης του, λόγω της κυριαρχίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αυτές τις συνθήκες (Argyri et al., 2011, Kapetanakou, Agathaggelou and Skandamis, 2014, Lytou, Nychas and Panagou, 2018). Το οξικό οξύ φαίνεται να αυξήθηκε κατά την εξέλιξη της αλλοίωσης, σε όλες τις θερμοκρασίες, παρατηρώντας μόνο μια σταδιακή μείωση στην θερμοκρασία των 15 °C κατά το τέλος της εξέλιξης της αλλοίωσης. Η αύξηση του οξικού οξέος οφείλεται στην αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων αλλά και του βακτηρίου *Brochothrix thermosphacta*, οι οποίοι μεταβολίζουν τη γλυκόζη προς παραγωγή οργανικών οξέων όπως του οξικού (Borch et al., 1996, Ellis and Goodacre, 2001). Επιπλέον, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος έλαβε χώρα σε δείγματα προχωρημένης αλλοίωσης και μάλιστα η παραγωγή του καθυστέρησε αισθητά στις χαμηλές θερμοκρασίες των 0 και 5 °C, εν αντιθέσει με τις πιο υψηλές θερμοκρασίες των 10 και 15 °C. Οι τελικές συγκεντρώσεις του ισοβουτυρικού, βουτυρικού, κιτρικού και πυροσταφυλικού οξέος, παρά ορισμένες αυξομειώσεις, φαίνεται ότι παρέμειναν πρακτικά ίδιες με τις αρχικές, με μια μικρή διαφοροποίηση να παρατηρείται στην θερμοκρασία των 15 °C, στην οποία η συγκέντρωση του πυροσταφυλικού οξέος φαίνεται να μειώνεται πιο αισθητά σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες με την

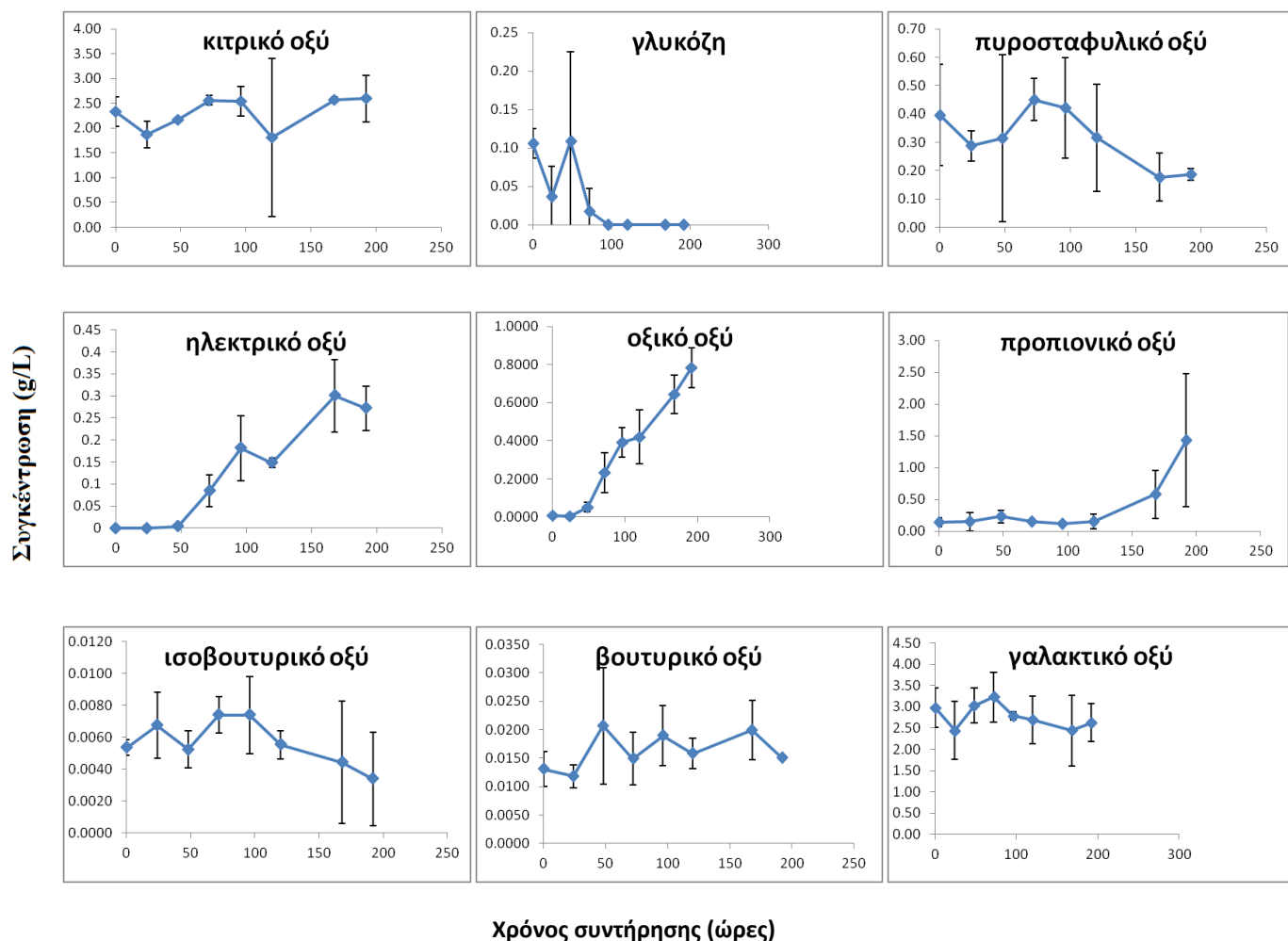
εξέλιξη της αλλοίωσης. Αυτό πιθανότατα αιτιολογείται από την έντονη δραστηριότητα των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp., τα οποία χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα ανάπτυξης το πυροσταφυλικό οξύ. Επίσης, μια έντονη διαφοροποίηση παρατηρείται στην συγκέντρωση του προπιονικού οξέος στους 0 °C, η οποία μειώνεται σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες στις οποίες παρατηρείται αύξηση.



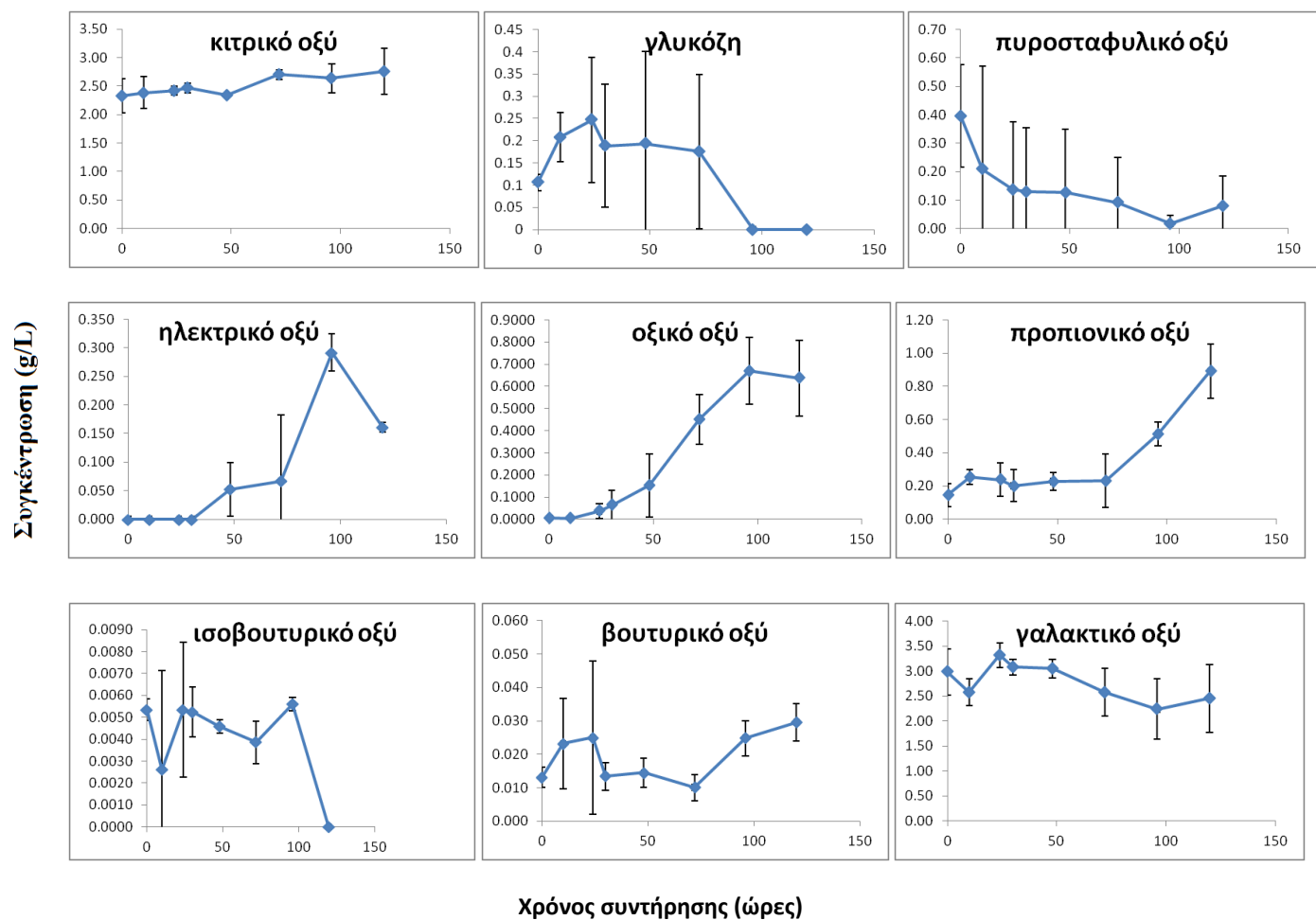
Γράφημα 19: Εξέλιξη της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των οργανικών οξέων σε δείγματα φιλέτου μπούτι κοτόπουλου, συντηρημένων υπό αερόβιες συνθήκες στους 0 °C.



Γράφημα 20: Εξέλιξη της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των οργανικών οξέων σε δείγματα φιλέτου μπούτι κοτόπουλου, συντηρημένων υπό αερόβιες συνθήκες στους 5 °C.



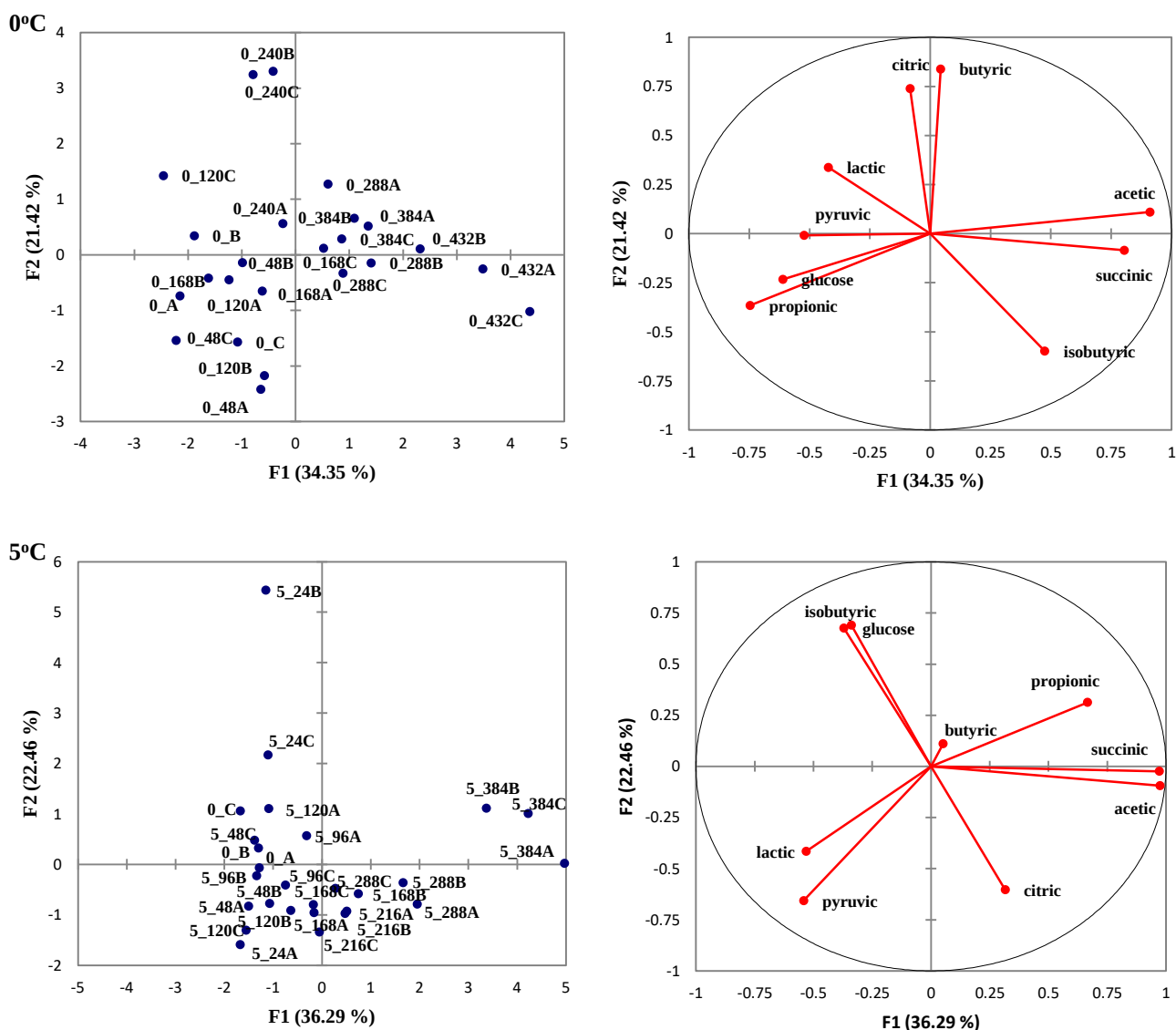
Γράφημα 21: Εξέλιξη της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των οργανικών οξέων σε δείγματα φιλέτου μπούτι κοτόπουλου, συντηρημένων υπό αερόβιες συνθήκες στους 10 °C.



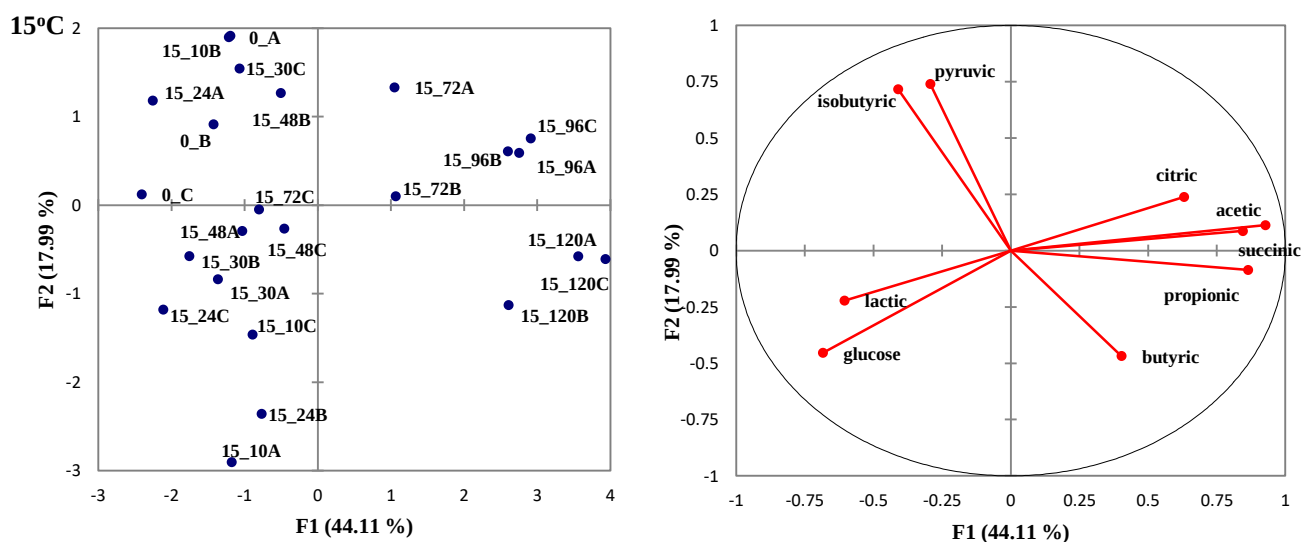
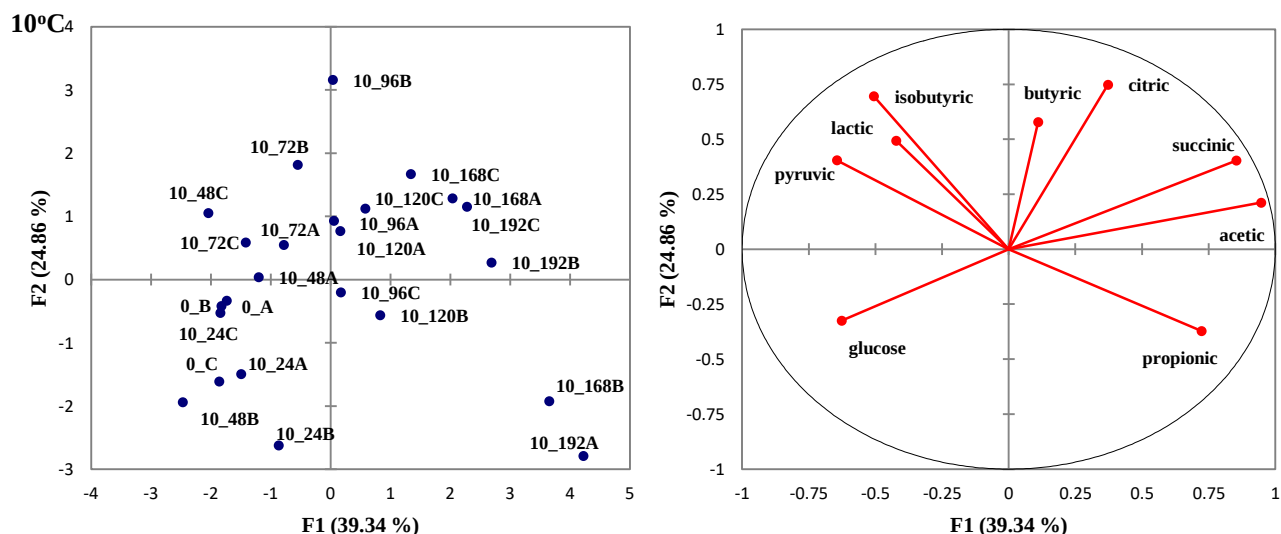
Γράφημα 22: Εξέλιξη της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των οργανικών οξέων σε δείγματα φιλέτου μπούτι κοτόπουλου, συντηρημένων υπό αερόβιες συνθήκες στους 15 °C.

Αναφορικά με την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), στα **Γραφήματα 23** και **24**, παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δειγμάτων που συντηρήθηκαν για μικρότερο χρονικό διάστημα (ώρες συντήρησης) και των οποίων το μικροβιακό φορτίο σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα δείγματα, τα οποία συντηρήθηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και στα οποία σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα αντιστοιχούσε υψηλότερο μικροβιακό φορτίο για όλες τις θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15 °C). Ο διαχωρισμός αυτός είναι περισσότερο ευκρινής στις υψηλότερες θερμοκρασίες των 10 και 15 °C και αυτό μπορεί να στηριχτεί στο γεγονός ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες των 0 και 5 °C λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών καθυστερώντας κατά αυτό τον τρόπο την γρήγορη αλλοίωση του προϊόντος συγκριτικά με τις υψηλότερες θερμοκρασίες (Doulgeraki et al., 2012, Tuncer et al., 2008, Gill and Newton, 1978). Σύμφωνα με τα **Γραφήματα 23** και **24**, η αύξηση του οξικού και ηλεκτρικού οξέος συσχετίστηκε κυρίως με τα αλλοιωμένα

δείγματα, ενώ η συγκέντρωση της γλυκόζης με τα πιο φρέσκα δείγματα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του προπιονικού οξέος συσχετίστηκε με αλλιωμένα δείγματα που είχαν συντηρηθεί στους 5, 10 και 15 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα.



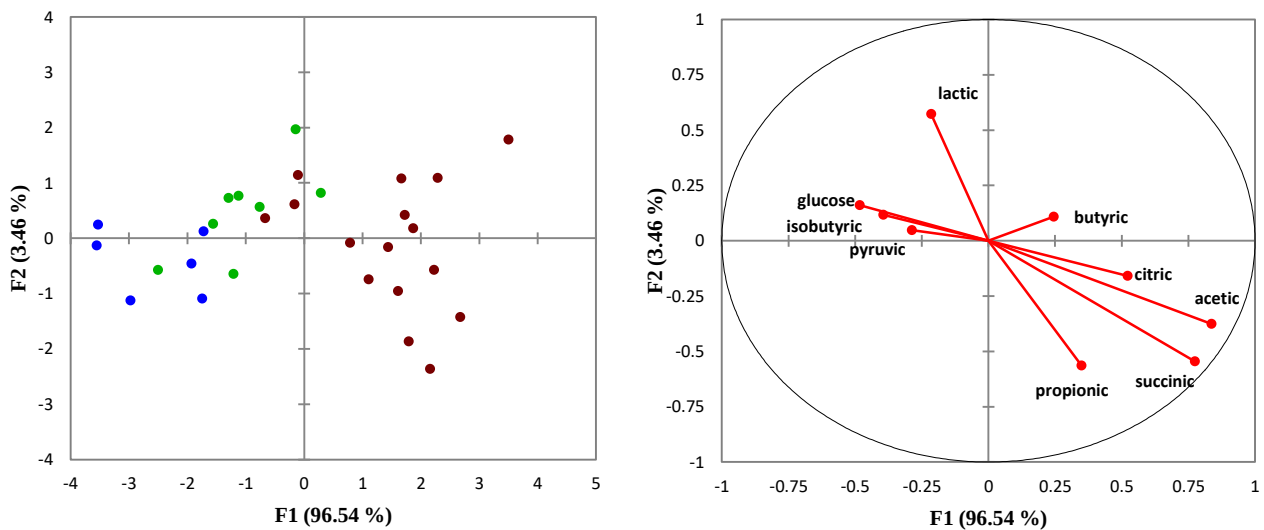
Γράφημα 23: Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) για τον πληθυσμό της OMX σε δείγματα από μπούτι φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκαν στους 0 °C και 5 °C (αριστερά= ώρες συντήρησης, δεξιά= συγκέντρωση γλυκόζης και οργανικών οξέων).



Γράφημα 24: Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) για τον πληθυσμό της OMX σε δείγματα από μπούτι φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκαν στους 10 °C και 15 °C (αριστερά= ώρες συντήρησης, δεξιά= συγκέντρωση γλυκόζης και οργανικών οξέων).

Σχετικά με τη Διακριτική Ανάλυση (DA), στο **Γράφημα 25**, οι μέσοι όροι από τους χρόνους συντήρησης των συνολικών δειγμάτων για όλα τα θερμοκρασιακά εύρη (0, 5, 10 και 15 °C) διαχωρίστηκαν σε τρεις διαφορετικές κλάσεις (φρέσκα, ημι-αλλοιωμένα και αλλοιωμένα). Σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα ως φρέσκα θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία ο μικροβιακός πληθυσμός κυμαίνονταν μεταξύ 4.6- 5.5 log cfu/gr, ως ημι- αλλοιωμένα τα δείγματα μεταξύ 5.6- 7.4 log cfu/gr και ως αλλοιωμένα τα δείγματα με μικροβιακό φορτίο μεταξύ 7.5- 9 log cfu/gr. Με βάση την ανάλυση αυτή και το **Γράφημα 25** είναι περισσότερο διακριτός ο διαχωρισμός των αλλοιωμένων δειγμάτων σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες.

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η παρουσία του ηλεκτρικού και προπιονικού οξέος συνδέεται κυρίως με δείγματα προχωρημένης αλλοίωσης, γεγονός που επιβεβαιώνει την ευκολότερη διάκριση των αλλοιωμένων δειγμάτων συγκριτικά με τις άλλες κλάσεις. Επίσης, στα δείγματα προχωρημένης αλλοίωσης παρατηρήθηκε η παραγωγή του βουτυρικού, ισοβουτυρικού και κιτρικού οξέος.



Γράφημα 25: Αποτελέσματα Διακριτικής Ανάλυσης (DA) σε δείγματα από μπούτι φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκαν στους 0 °C, 5 °C, 10 °C και 15 °C (ομαδοποίηση των δειγμάτων σε φρέσκα (F), ημι- αλλοιωμένα (SS) και αλλοιωμένα (SP) και τα παραγόμενα οξέα).

5. Συμπεράσματα

Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις και τη χρήση των μαθηματικών μοντέλων, επιβεβαιώθηκε η μεγάλη επίδραση που ασκεί η θερμοκρασία συντήρησης στην επιβίωση και στην ανάπτυξη της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας στο κρέας κοτόπουλου, υπό αερόβιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα διαγράμματα ανάπτυξης που προέκυψαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις, βρέθηκε ότι ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός σε όλες τις θερμοκρασίες ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., ακολουθούμενα από τα εντεροβακτήρια στις πιο υψηλές θερμοκρασίες, το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Συγκριτικά τα διαγράμματα ανάπτυξης των χαμηλών θερμοκρασιών με αυτών των υψηλών, υποδηλώνουν μια μεγάλη διαφοροποίηση στην μικροβιακή ανάπτυξη, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, σε αντίθεση με τις υψηλότερες θερμοκρασίες, οι οποίες την ευνοούν. Ο κανόνας αυτός συμπίπτει και με τα αποτελέσματα των μαθηματικών μοντέλων (πρωτογενών και δευτερογενών), όπου στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε μεγάλη φάση προσαρμογής και μικρός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε σχέση με τις πιο υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες δεν δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των μικροβίων. Γενικά, το pH των δειγμάτων παρουσίασε αρκετές αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησης, υποδηλώνοντας ότι δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, αλλά από διάφορες ενδογενείς μεταβολές του προϊόντος, οι οποίες οφείλονται κατά κύριο λόγο στην πρωτεολυτική δραστηριότητα των *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως στην παραγωγή σημαντικών οργανικών οξέων, όπως του οξικού και του γαλακτικού που προκύπτουν από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Επιπλέον, ο οργανοληπτικός έλεγχος έδειξε ότι η αλλοίωση γινόταν αντιληπτή αρκετά σύντομα στις υψηλές θερμοκρασίες από τους καταναλωτές, ενώ στις χαμηλές καθυστέρησε αρκετά, γεγονός που επιβεβαιώνει με τη σειρά του ότι η θερμοκρασία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την εξέλιξη της αλλοίωσης σε ένα τρόφιμο. Το πάνελ των καταναλωτών έκρινε ως αλλοιωμένα τα δείγματα στα οποία ο μικροβιακός πληθυσμός ξεπερνούσε τους 5 λογαρίθμους, προκαλώντας ανεπιθύμητες μεταβολές στην εμφάνιση και την οσμή του κρέατος κοτόπουλου.

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR), εμφάνισαν ικανοποιητικούς συντελεστές απόδοσης για το μοντέλο εκτίμησης του πληθυσμού της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp.. Συγκεκριμένα, οι δείκτες πρόβλεψης ήταν $RMSE_p = 0.9017$, $r_p = 0.8153$ για την OMX και $RMSE_p = 1.0341$, $r_p = 0.8232$ για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, από τους συντελεστές παλινδρόμησης, προέκυψε ότι τα σημαντικότερα φάσματα αντιστοιχούσαν σε μήκη κύματος, τα οποία αποδίδονταν σε C- N δονήσεις τάσης από αμίνες και από αμίδια I

και II, καθώς και από την παρουσία πρωτεϊνών και πιθανών ελεύθερων αμινοξέων ή ουσιών που φέρουν άζωτο και τις αλληλεπιδράσεις τους με το νερό. Αυτό υποδεικνύει ότι η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) μπορεί να ανιχνεύσει μια από τις πιο βασικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την αλλοίωση του κρέατος κοτόπουλου, την πρωτεόλυση. Συνεπώς, αποτελεί μια γρήγορη, χρήσιμη και μη- επεμβατική μέθοδος που μπορεί να ανιχνεύσει την αλλοίωση στην επιφάνεια του προϊόντος. Ωστόσο, για να επιτευχθεί μια ολιστική προσέγγιση για την πορεία της αλλοίωσης του κοτόπουλου, απαιτείται ανάλυση δεδομένων και δειγμάτων κάτω από ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών αλλά και σε διαφορετικές τροποποιημένες συνθήκες που καθυστερούν την αλλοίωση, προκειμένου να ενισχυθεί η κατανόηση για το πώς οι βιοχημικές αλλαγές επηρεάζουν την πορεία της αλλοίωσης. Η διερεύνηση τέτοιων ταχέων μεθόδων ανάλυσης μπορεί στο μέλλον να οδηγήσει στην αντικατάσταση των χρονοβόρων κλασσικών μικροβιολογικών μεθόδων.

Τέλος, η ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), φάνηκε ότι αποτελεί μια τεχνική, η οποία μπορεί να περιγράψει σε ικανοποιητικό βαθμό την εξέλιξη της αλλοίωσης προϊόντων κρέατος, μέσω της ποσοτικοποίησης των μικροβιακά παραγόμενων οξέων, αλλά και της καταναλισκόμενης γλυκόζης. Επίσης, όταν συνδυαστεί με στατιστικές αναλύσεις όπως η Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και η Διακριτική ανάλυση (DA), επιτρέπει το διαχωρισμό των δειγμάτων είτε βάσει του μικροβιακού πληθυσμού που έχει αναπτυχθεί σε αυτά, είτε βάσει της μεταβολής των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, ομαδοποιώντας τα σε φρέσκα, οριακά αλλοιωμένα και εμφανώς αλλοιωμένα.

6. Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βουδούρης Ε.Κ., Κοντομηνάς Μ.Γ. (2002). Εισαγωγή στην Χημεία Τροφίμων. ΟΕΔΒ, Αθήνα, έκδοση 2002.
- Κουρκούλη, Α (2020). *Εκτίμηση της αλλοίωσης φιλέτου κοτόπουλου με τη χρήση κλασικών και σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών*. Πτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παπαδοπούλου, Ο.Σ. (2013). *Εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος με σύγχρονες μεθόδους*. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Ραφτοπούλου, Ο. Σ. (2019). *Εκτίμηση μέσω πολυφασματικής απεικόνισης της αλλοίωσης και αξιολόγηση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόντα κοτόπουλου*. Μεταπτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Σπυρέλλη, Ε. (2018). *Αντικατάσταση μικροβιολογικών αναλύσεων χοιρινού κιμά με τη χρήση αισθητήρων*. Μεταπτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Ταραντίλης, Π. & Παππάς, Χ. (2015), *Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ξένη Βιβλιογραφία

- A. Edelman, J. Diewok, K.C. Schuster, B. Lend. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 1139-1145.
- Abdi, H. (2003). Partial least square regression (PLS regression). *Encyclopedia for research methods for the social sciences*, 6(4), 792-795.
- Adam, K. H., Flint, S. H. & Brightwell, G. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: Sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packed beef, lamb and venison. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1539–1544.
- Adams, M.R., Moss, M.O. (2008). Food Microbiology, In: Food Microbiology. Royal Society of Chemistry. Cambridge: UK.
- Allen, C., Russell, S. and Fletcher, D. (1997). The relationship of broiler breast meat colour and pH to shelf-life and odor development. *Poultry Science* 76: 1042-1046.

- Allen, C.D., Fletcher, D.L., Northcutt, J.K. and Russell, S.M. (1998). The relationship of broiler breast colour to meat quality and shelf-life. *Poultry Science* 77: 361-366.
- Alexandrakis, D., Downey, G. and Scannell, A. (2009). Rapid Non-destructive Detection of Spoilage of Intact Chicken Breast Muscle Using Near-infrared and Fourier Transform Mid-infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), pp.338-347.
- Alonso-Calleja, C., Martí'nez-Fernández, B., Prieto, M., & Capita, R. (2004). Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiology*, 21(2), 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00060-1).
- Ammor, M. S., Argyri, A., & Nychas, G. J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81(3), 507-514.
- Andreevskaya, M., Johansson, P., Laine, P., Smolander, O. P., Sonck, M., Rahkila, R., & Björkroth, J. (2015). Genome sequence and transcriptome analysis of meat-spoilage-associated lactic acid bacterium *Lactococcus piscium* MKFS47. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(11), 38003811.
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2014). Monitoring microbial spoilage of foods by vibrational spectroscopy (FT-IR & Raman). *Novel food preservation and microbial assessment techniques*, 386.
- Argyri, A. A., Panagou, E.Z., Tarantilis, P. A., Polysiou, M., Nychas, G-J. E. (2010). Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sensors and Actuators B*, 145 (1), 146–154
- Argyri, A.A., Doulgeraki, A.I., Blana, V.A., Panagou, E.Z., Nychas, G-J.E., (2011). Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. *Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens*.
- Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De Vos, P., Massart, D. L., Devriese, L. A., De Zutter, L., & Van Hoof, J. (1999). A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 15-28.
- Arnaut-Rollier, Isabelle, Lieven De Zutter, and Jan Van Hoof. (1999). Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International journal of food microbiology* 48.2, 87-96.
- Ayres J C, Ogilvy W S and Stewart G F (1950). Post mortem changes in stored meats. I. Microorganisms associated with development of slime on eviscerated cut-up poultry. *Food Technology* 4, 199-205.

- Baranyi, J., & Roberts, T.A., (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol*, 23, 277–294.
- Barbut, S., (2014). Review: Automation and meat quality-global challenges. *Meat Sci.* doi:10.1016/j.meatsci.2013.07.002.
- Bi, Y., Yuan, K., Xiao, W., Wu, J., Shi, C., Xia, J., & Zhou, G. (2016). A local pre-processing method for near-infrared spectra, combined with spectral segmentation and standard normal variate transformation. *Analytica chimica acta*, 909, 30-40.
- Bjorkroth, K.J., Korkeala, H.J., (1997a). Ropy slime-producing *Lactobacillus* sake strains possess a strong competitive ability against a commercial biopreservative. *Int. J. Food Microbiol.* 38:117-123.
- Bjorkroth, K.J., Korkeala, H.J., (1997b). Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole meat product in a meat processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:448-453.
- Blackburn, C. d.W. (2006). Managing microbial food spoilage: An overview. In C. d. W. Blackburn (Ed.), *Food spoilage microorganisms* (pp. 147–170). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Borch, E., Kant-Muemans, M-L., Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33 (1), 103-120
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L., Blixt, Y., (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33:103-120.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. (2012). Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry. *Journal of Food Quality*, 35(5), 372-382.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. (2013). A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. *Food Control*, 29 (2), 451-460.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.J., Villani, F., Ercolini, D., (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiol.* 45:83-102.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G-J., Villani, F., Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45, Part A, 83-102.
- Cenci-Goga, B.T., (2012). Fattori che influenzano la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi negli alimenti. In: G. Colavita (ed.), *Igiene e Tecnologie degli alimenti di origine animale*. Le Point Vétérinaire Italie Ed., Milano, Italy, pp 19-25.
- Cenci-Goga, B.T., Karama, M., Sechi, P., Iulietto, M.F., Novelli, S., Mattei, S., (2014). Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of Mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Dairy Sci.* 97:6708-6718.

- Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., & Baucells, M. D. (2005). Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid oxidation. *Poultry Science*, 84(1), 48-55.
- Cris Baylis, Mieke Uyttendaele, Han Joosten and Andy Davies (2011). *The Enterobacteriaceae and their significance to the Food Industry*. Commissioned by the ISLI Europe Emerging Microbiological issues task force.
- D.I. Ellis, D. Broadhurst, D.B. Kell, J.J. Rowland, R. Goodacre. (2002) Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp. 2822-2828.
- Dainty, R. H., (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 19-34.
- Dave, D., Chaly, A.E. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(4), 486-510.
- Dissing, B. S., Papadopoulou, O. S., Tassou, C., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2013). Using multispectral imaging for spoilage detection of pork meat. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2268-2279.
- Dominguez, S. A., Schaffner, D. W. (2007). Development and validation of a mathematical model to describe the growth of *Pseudomonas* spp. in raw poultry stored under aerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 120 (3), 287–295.
- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.J., (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157:130-141.
- Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., Kaghli, D.M., Nychas, G.J. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*. 27: 1028-1034.
- Dransfield E., and Sosnicki A.A. (1999). Relationship between muscle growth and poultry.
- Drosinos, E.H., Board, R. G. (1994). Metabolic activities of *pseudomonas* in batch cultures in extract of minced lamb. *Journal of Applied Microbiology*, 77(6), 613-620.
- Dušková, M., Kameník, J., Karpíšková, R., 2013. *Weissella viridescens* in meat products - a review. *Acta Vet. Brno* 82:237-241.
- EC 852/2004, [online]. Διαθέσιμο στο: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0852-20090420>.
- EC 853/2004, [online]. Διαθέσιμο στο: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0853-20140601>.

- EFSA Journal 2016, Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat.14 (6):4523. [online]: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4523>.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, 514 (2), 193–201
- Ellis, D. I., Goodacre, R. (2001). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 414-424.
- Ellis, D., Broadhurst, D. and Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, 514(2), pp.193-201.
- Enfors S.O. (2008). Food Microbiology. Department of Bioprocess Technology/KTH.
- Enfors, S.-O., Molin, G., Ternstroem, A., (1979). Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen or air on the microbial flora of pork stored at 4°C. *Journal of Applied Bacteriology* 47, 197-208.
- Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, L., Di Monaco, R., Ferranti, P., Mauriello, G., Villani, F., (2010b). Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the overall behavior as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology* 142,120-131.
- Ercolini, D., Ferrocino, L., La Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., Villani, F., (2010a). Development of spoilage Microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology* 27, 137-143.
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, I., Mauriello, G., Villani, F., (2007). Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P.lundensis* and *P.putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2354-2359.
- Estelles-Lopez, L., Ropodi, A., Pavlidis, D., Fotopoulou, J., Gkousari, C., Peyrodie, A., Panagou, E., Nychas, G.-J, Mohareb, F. (2017). An automated ranking platform for machine learning regression models for meat spoilage prediction using multi-spectral imaging and metabolic profiling. *Food Research International* 99:206-215.
- F. Ghollasi-Mood, M. Mohsenzadeh, M. Reza Housaindokht, M. Varidi (2017). Microbial and chemical spoilage of chicken meat during storage at isothermal and fluctuation temperature under aerobic conditions. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*.
- Fairbairn, D.J., Law, B.A., (1986).Proteinases of psychotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J.Dairy Res*, 53,139-177.

- FAO, 2018. Food Outlook- Biannual Report on Global Food Markets [online]. Διαθέσιμο στο: <http://www.fao.org/3/CA0239EN/ca0239en>.
- Fellenberg M. A. and Speisky H. (2006). Antioxidants: their effects on broiler oxidative.
- Feng, C. H., Makino, Y., Oshita, S., & Martín, J. F. G. (2018). Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. *Food control*, 84, 165-176.
- Feng, C-H., Makino, Y., Oshita, S., García Martín, J. F. (2018). Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. *Food Control*, 84, 165-176
- Fletcher, D. (1999). Broiler breast meat colour variation, pH, and texture. *Poultry Science* 78: 1323-1327.
- Franca Marangoni, Giovanni Corsello, Claudio Cricelli, Nicola Ferrara, Andrea Ghiselli, Lucio Lucchin & Andrea Poli(2015): Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: an Italian consensus document, *Food & Nutrition Research*, 59:1, 27606, DOI:10.3402/fnr.v59.27606
- Froning, G.W., Daddario, J. and Hartung, T.E. (1968). Colour and myoglobin concentration in turkey meat as affected by age, sex and strain. *Poultry Science* 47:1827-1835.
- Gill, C.O., Newton, K.G., (1978). The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Science* 14, 43-60.
- Göksoy, E.; Kirkan, S.; Kok, F. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. *Poult. Sci.* 2004, 83, 1427–1432.
- Goodacre, R., Vaidynathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G., Kell, D.B., (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 22, 245-252.
- Gospavic, R., Kreyenschmidt, J., Bruckner, S., Popov, V., Haque, N. (2008). Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 127 (3), 290–297.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M., 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 78:79-97
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M., 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 78:79-97.
- Guide, W. E. (2018). WATT executive guide to world poultry trends.
- Guide, W. E. (2019). WATT executive guide to world poultry trends.

- Guillier, L. (2016). Predictive microbiology models and operational readiness. *Procedia Food Science*, 7, 133 – 136.
- Hallinan, J. S. (2012). Data mining for microbiologists. *Systems Biology of Bacteria*, 27-79. doi: 10.1016/b978-0-08-099387-4.00002-8.
- Hamad, S. H. (2012). Factors Affecting the Growth of Microorganisms in Food. In *Progress in Food Preservation* (eds R. Bhat, A. Karim Alias and G. Paliyath). doi:10.1002/9781119962045.ch20.
- Harada, T., Nguyen, D. P., Nguyen, T. A. D., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Motooka, D., & Kawahara, R. (2016). *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(10), 3779-3785.
- Hernandez-Macedo, M.L., Contreras-Castillo, C.J., Tsai, S.M., Da Cruz, S.H., Sarantopoulos, C.I., Padula, M., Dias, C.T. (2012). Gases and volatile compounds associated with micro-organisms in blown pack spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *Lett. Appl Microbiol.* 55:467-475.
- Hinton, A., Jr.; Cason, J.A.; Ingram, K.D. (2004). Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 91, 155–165.
- Hinton, A., Jr.; Cason, J.A.; Ingram, K.D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 91, 155–165.
- Höll, L.; Behr, J.; Vogel, R.F. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* 2016, 60, 84–91.
- Holzapfel, W.H., (1998). The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In: Board, R.G., Davies, A.R. (Eds). *The Microbiology of Meat and Poultry*, Blackie Academic and Professional, London, pp. 35-84.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), (1998). *Micro-Organisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities*. Blackie Academic and Professional, London. 615 pp.
- Iulietto, F. M., Sechi, P., Elena Borgogni & Beniamino T. Cenci-Goga (2015). Meat Spoilage: A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science*, 14:3, 4011, DOI:10.4081/ijas.2015.4011.
- J. He, I.E. Rodriguez-Saona, M.M. Giusti Mid-infrared spectroscopy for juice authentication—Rapid differentiation of commercial juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007), pp. 4443-4452.
- J.L. Damez, S. Clerjon. (2008). Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science*, 80, pp. 132-149.
- Jääskeläinen, E., Johansson, P., Kostainen, O., Nieminen, T., Schmidt, G., Somervuo, P., & Björkroth, J. (2013). Significance of heme-based respiration in

meat spoilage caused by *Leuconostoc gasicomitatum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(4), 1078-1085.

- Jääskeläinen, E., Vesterinen, S., Parshintsev, J., Johansson, P., Riekkola, M. L., & Björkroth, J. (2015). Production of buttery-odor compounds and transcriptome response in *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* LMG18811T during growth on various carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(6), 1902-1908.
- Jay J. M., (2005), Modern food Microbiology. 7th Edition, Chapman & Hall, Food Science Texts.
- Kakouri, A., Nychas, G.J.E. (1994). Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, 76(2), 163-172.
- Koort, J., Murros, A., Coenye, T., Eerola, S., Vandamme, P., Sukura, A., & Björkroth, J. (2005). *Lactobacillus oligofermentans* sp. nov., associated with spoilage of modified-atmospherepackaged poultry products. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(8), 4400-4406.
- Koutsoumanis, K., & Taoukis, P. S. (2005). Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. *In Improving the safety of fresh meat* (pp. 503-561). Woodhead Publishing.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., Nychas, G.J., 2006. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:124-134.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., Nychas, G-J.E. (2006). Development of microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 124-134.
- Koutsoumanis, K., Taoukis, P. S., Nychas, G-J. E. (2005). Development of a Safety Monitoring and Assurance System for chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*, 100 (1-3), 253–260
- Lambert, A.D., Smith, J.P., Dodds, K.L. (1991). Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat-a review. *Food Microbiology* 8, 267-297.
- Lambropoulou, K.A., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E. (1996). The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 30(3), 281-291.
- Lee HS., Kwon M., Heo S., Kim MG, Kim GB (2017). Characterization of the Biodiversity of the Spoilage Microbiota in Chicken Meat Using Next Generation Sequencing and Culture Dependent Approach. *Korean Journal Food Science Animal Resource*. 2017; 37(4): 535-541.
- Li, H.H., Chen, Q.S., Zhao, J.W., Wu, M.Z. (2015). Nondestructive detection of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in pork meat by intergrading hyper

spectral imaging and colourimetric sensor combined with a nonlinear data fusion. *LWT-Food Science and Technology*. 63:268-274.

- Lianou, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2016). Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. In P. Subramaniam (Ed.). *The stability and shelf life of food* (Second Edition, pp.3–42). Duxford, UK: Woodhead Publishing.
- Lonergan, S.M., Topel, D. G., Marple, D. N. (2019). *Meat microbiology and safety*. *The Science of Animal Growth and Meat Technology*, 183-204.
- Lytou, A. E., Nychas, G-J. E., Panagou, E. Z. (2018). Effect of pomegranate based marinades on the microbiological, chemical and sensory quality of chicken meat: A metabolomics approach. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 42–53.
- Lytou, A., Panagou, E. Z., Nychas, G-J. E. (2016). Development of a predictive model for the growth kinetics of aerobic microbial population on pomegranate marinated chicken breast fillets under isothermal and dynamic temperature conditions. *Food Microbiology*, 55, 25-31.
- Mariutti, L. R., & Bragagnolo, N. (2017). Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. *Food Research International*, 94, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.003>.
- Mataragas, M., Bikouli, V. C., Korre, M., Sterioti, A., Skandamis, P. N. (2019). Development of a microbial Time Temperature Indicator for monitoring the shelf life of meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52, 89–99
- Mataragas, M., Skandamis, P., Nychas, G-J. E., Drosinos, E.H. (2007). Modeling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. *Meat Science*, 77 (3), 348–356
- McMeekin, T. A. (2007). Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat science*, 77(1), 17-27.
- McMillin, K.W., 2008. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci*, 80, 43-65.
- Mead GC (2004). Shelf-life and spoilage of poultry meat, In: Mead GC, editor. *Poultry meat processing and quality*. Cambridge, UK, Woodhead, 2004. p. 283-303.
- Mead, G. (1985). Enumeration of pseudomonads using cephaloridine-fucidin-cetrimide agar (CFC). *International Journal of Food Microbiology*, 2(1-2), pp. 21-26.
- Mead, G. C., & Adams, B. W. (1977). A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. *British poultry science*, 18(6), 661-670.
- N. Wideman, C.A. O'Bryan and P.G. Crandall (2016). Factors affecting poultry meat colour and consumer preferences - A review. *Department of Food Science, University of Arkansas*, 2650 Young Ave., Fayetteville, AR 72704, USA.

- N. Prieto, R. Roehe, P. Lavín, G. Batten, S. Andrés (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83, pp. 175-186.
- Ndob, A. M., Melas, M., & Lebert, A. (2015). Physical-chemical Properties of Foods: New Tools for Prediction. Elsevier
- Nowak A., Rygala A., Oltuszek-Walczak E., Walczak P.(2012).The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways. *J. Sci. Food Agric.* 2012;92:1304–1310. doi: 10.1002/jsfa.4701.
- Nychas, G. J. E., Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1998). Chemical changes in stored meat. In R. G. Board, & A. R. Davies (Eds.). *The microbiology of meat and poultry* (pp. 288–326). London: Blackie Academic and Professional.
- Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Mohareb, F. (2016). Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, 12, 13-20.
- Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat science*, 78(1-2), 77-89.
- Nychas, G.-J.E., Skandamis, P., (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP).In: Sofos, J.N. (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat*. CRC/Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 461-502.
- Nychas, G.-J.E., Marshall, D.L. & Sofos, J.N., (2007). Meat, Poultry, and Seafood. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, pp. 105-140 Edited by M. P. Doyle, L. R. Beuchat, Washington D.C: ASM Press.
- Panagou, E. Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J. M., Nychas, G.-J. E. (2014). Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 1–11
- Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G. J. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, 44(10), 3264-3271.
- Papadopoulou, O., Panagou, E. -Z., Tassou, C. -C., & Nychas, G.-J.E., (2011). Contribution of Fourier transforms infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Res Int*, 44, 3264–3271.
- Papadopoulou, O., Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Nychas, G.-J.E., (2011). Contribution of Fourier transforms infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International* 44:3264-3271.

- Paramithiotis, S., Pappa, A., Drosinos, E. and Zoiopoulos, P. (2009). Microbiological, physico-chemical and safety parameters of cereal-based animal diets. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1(3), pp.170-178.
- Pawar S.C., Sarate R.M., Ghosh J.S. (2011). Spoilage of chilled chicken meat and liver by psychrophilic lipase. *American Journal of Food Technology* 6, 166-172.
- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Microbial spoilage of foods: Fundamentals. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.). *The microbiological quality of food* (pp. 1–21). Duxford, UK: Woodhead Publishing.
- Pin, C., Garcia de Fernando, G.D., Ordonez, J.A., 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4441-4447.
- Plavsic, D., Okanovic, D., Gubic, J., & Njezic, Z. (2015). Microbiological and chemical evaluation of dried smoked meat product. *Procedia Food Science*, 5, 239–242. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.061>.
- Pogasic, T., Maillard, M.B., Leclerc, A., Herve, C., Chuat, V., Lee, A.L., Valence, F., Thierry, A., (2015). A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbial.* 46, 145-153.
- Prauser, H. (1985). N. R. Krieg, (Editor, Volume 1), J. G. Holt (Editor-in-Chief), R. G. E. Murray, D. J. Brenner, M. P. Bryant, J. G. Holt, N. R. Krieg, J. W. Moulder, N. Pfennig, P. H. A. Sneath and J. T. Staley (Editorial Board), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1. XXVII + 964 S., zahlr. Abb., 328 Tab. Baltimore-London 1984. Williams and Wilkins. \$ 85.00. ISBN: 0-683-04108-8. *Journal of Basic Microbiology*, 25(10), pp.698-699.
- Rafael D. Chaves, Alessandra R. Silva, Anderson S. Sant'Ana, Felipe B. Campana & Pilar R. Massaguer (2012). Gas-producing and spoilage potential of Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria isolated from chilled vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Science and Technology*.
- Rahkila, R., Johansson, P., Säde, E., & Björkroth, J. (2011). Identification of Enterococci from Broiler Products and a Broiler Processing Plant and Description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(4), 1196-1203.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. (1982). Relationship between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 149 (1):1-5.
- Ray, B., Bhunia, A., (2013). *Fundamental food microbiology*, 5th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Ray, B., Bhunia, A., (2013). *Fundamental food microbiology*, 5th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Reid R, Lindqvist R, Fanning S, Whyte P, Kerry J and Bolton D, (2015). The microbiology of beef chilling: do the observations fit the predictions? Poster 189,

Abstract book page 111, poster presented at the EFSA Expo conference 'Shaping the future of food safety together', Milan, Italy, 14–16 October 2015.

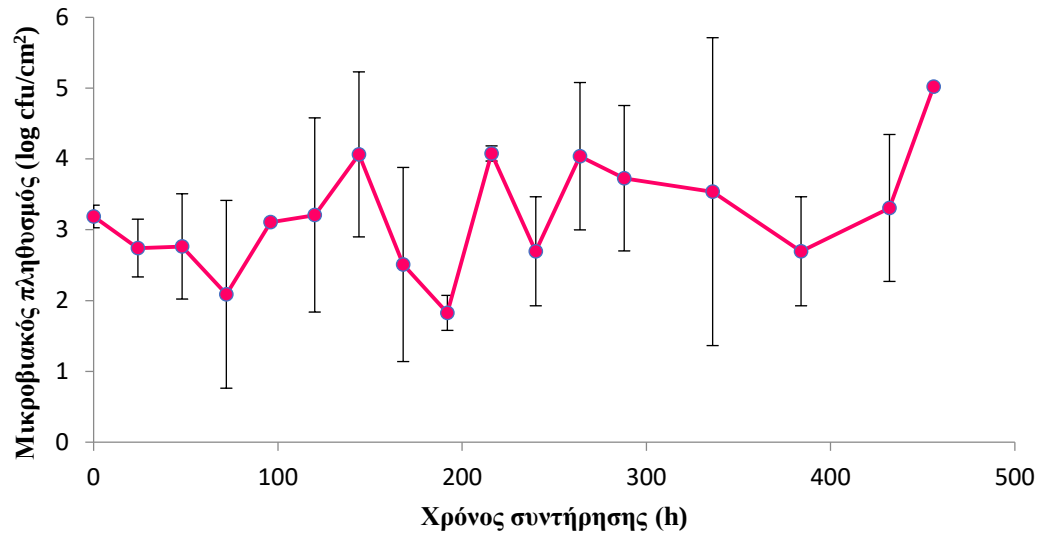
- Remenant, B., Jaffres, E., Dousset, X., Pilet, M.F., Zagorec, M., (2015). Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiol* 45:45-53.
- Romia, M.B, Bernardez, M.A. (2009). Multivariate Calibration of Quantitative Analysis. In: Sun D.W.(ed.) *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Oxford: Elsevier Inc.
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2016). Data mining derived from food analyses using non-invasive/non-destructive analytical techniques; determination of food authenticity, quality & safety in tandem with computer science disciplines. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 11-25.
- Ross, T., Dalgaard, P. (2003). Secondary Models. In: McKellar, R.C., Lu, X. (eds.) *Modeling Microbial Responses in Food*. Florida: CRC Press.
- Rouger, A., Tresse, O., Zagorec, M., (2017). Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species and Dynamics. *Microorganisms MDPI*.
- Russell, S.M. The Effect of an acidic, copper sulfate-based commercial sanitizer on indicator, pathogenic, and spoilage bacteria associated with broiler chicken carcasses when applied at various intervention points during poultry processing. *Poult. Sci.* 2008, 87, 1435–1440.
- S.A. Ammor, A. Argyri, G.J.E. Nychas (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics, *Meat Science*, 81, pp. 507-514.
- Savitzky, A., Golay, M.J.E. (1964). "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures". *Analytical Chemistry*. 36 (8): 1627–39.
- S.N. Rindhe, P.N. Zanjad, V.K. Doifode, A. Siddique, M.S. Mendhe (2008). Assessment of microbial contamination of chicken products sold in Parbhani city. *Veterinary World*, Vol.1 (7): 208-210.
- Säde, E., Murros, A., & Björkroth, J. (2013). Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food microbiology*, 34(2), 252-258.
- Sant'Ana, A. S., Franco, B. D. G. M., Schaffner, D. W. (2012). Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. *Food Microbiology*, 30 (1), 267-273
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health.
- Shlens J. (1993). *A Tutorial on Principal Component Analysis*.
- Silva C.M.G. and Gloria M.B.A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4°C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry* 78, 241–248.

- Skandamis, P. N., Nychas, G.-J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (6), 1011-1022
- Smolander, M.; Alakomi, H.-L.; Ritvanen, T.; Vainionpää, J.; Ahvenainen, R. (2014). Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A. Time-temperature indicators as quality-indicating tools. *Food Control* 2014, 15, 217–229.
- Snyder, A. B., Worobo, R. W. (2018). The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control*, 85, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.025>.
- Te Giffel, M. C., Zwietering, M. H. (1999). Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 46 (2), 135-149.
- Thornley M J, Ingram M and Barnes E M (1960). The effects of antibiotics and irradiation on the *Pseudomonas-Achromobacter* flora of chilled poultry. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 487-498.
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Panagou, E., & Nychas, G. J. (2016). Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*, 161, 606-614.
- Tsigarida, E., Boziaris, I. S., Nychas, G.-J. E., (2003). Bacterial synergism or antagonism in a Gel Cassette system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7204-7209.
- Tuncer, B.; Sireli, U. T. Microbial growth on broiler carcasses stored at different temperatures after air- or water-chilling. *Poult. Sci.* 2008, 87, 793–799.
- Tuncer, B.; Sireli, U. T. Microbial growth on broiler carcasses stored at different temperatures after air- or water-chilling. *Poult. Sci.* 2008, 87, 793–799.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Food Data Central, 2020. <https://fdc.nal.usda.gov/>
- Helena Vasconcelos., Christina Saraiva., Jose Manuel Marques Martins De Almeida (2014). Evaluation of the Spoilage of Raw Chicken Breast Fillets Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Tandem with Chemometrics.
- W. Verbeke, F. J. A. Perez-Cueto, M. D. de Barcellos, A. Krystallis, K. G. Grunert European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork *Meat Science*, 84 (2009), pp. 284-292.
- Wang, G. Y., Wang, H. H., Han, Y. W., Xing, T., Ye, K. P., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2017). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. *Food microbiology*, 63, 139-146.
- Wattanachant, S., Benjakul, S. and Ledward, D. A. (2004). Composition, colour, and texture of Thai indigenous and broiler chicken muscles. *Poultry Science* 83:123-128.

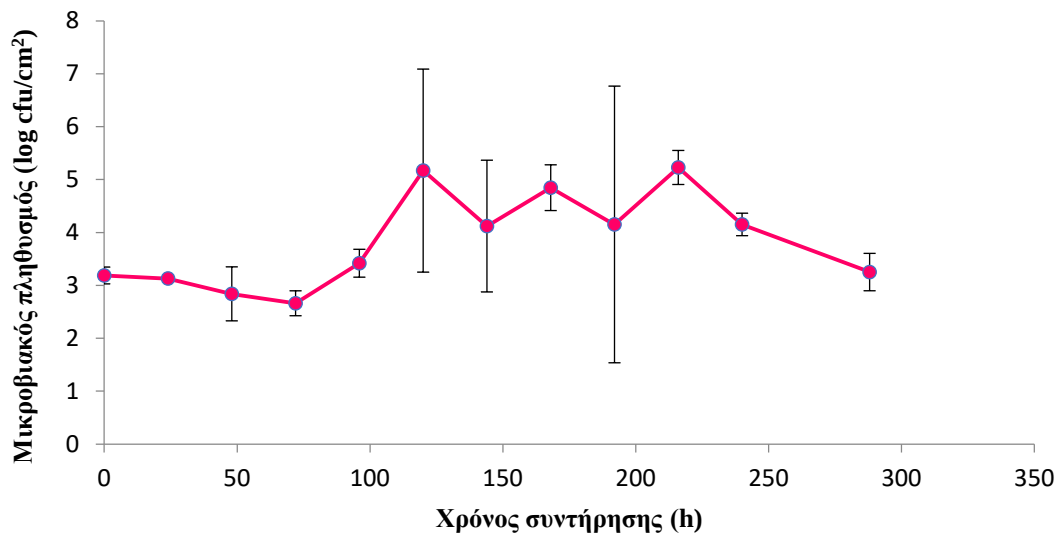
- Whiting, R. C. (1995). Microbial modeling in foods, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35 (6), 467-494.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58(2), 109-130.
- Yang, X., Youssef, M.K., Gill, C.O., Badoni, M., Lopez-Campos, O., 2014. Effects of meat pH on growth of 11 species of psychrotolerant clostridia on vacuum packaged beef and blown pack spoilage of the product. *Food Microbiol.* 39:13-18.
- Young, L.L., Reviere, R.D. & Cole, A.B., 1988. Fresh meat red meat: a place to apply modified atmosphere. *Food Techn*, 42, 65-69.
- Zhang, Q.Q.; Han, Y.Q.; Cao, J.X.; Xu, X.L.; Zhou, G.H.; Zhang, W.Y. The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. *Poult. Sci.* 2012, 91,208–214.
- Zwietering, M. H., Wiltjes, T., DE WIT, J. C., & RIET, K. V. T. (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 55(12), 973-979.

Παράρτημα Α

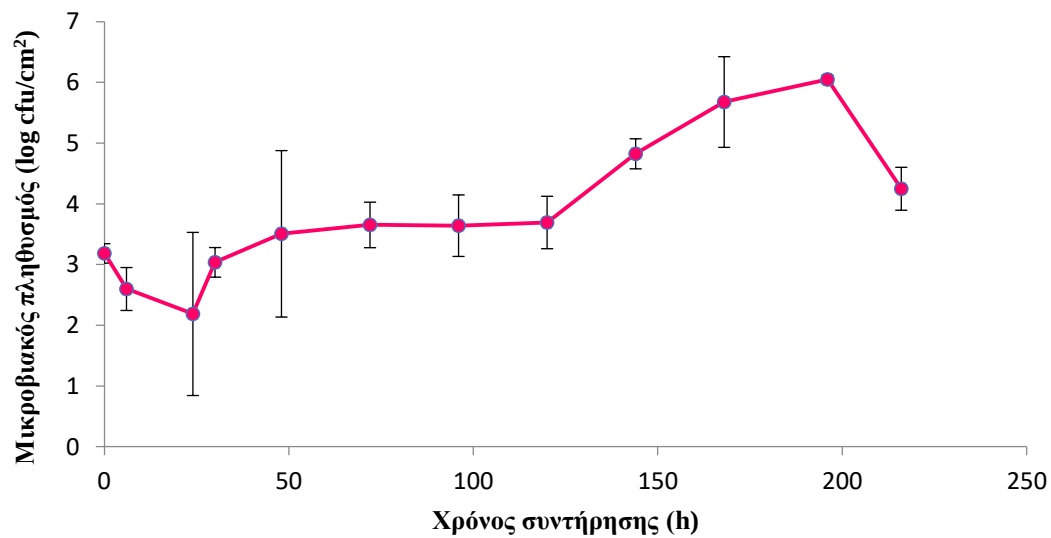
Γράφημα 1: Καμπύλες ανάπτυξης για το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 0 °C.



Γράφημα 2: Καμπύλες ανάπτυξης για το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων για τη συντήρηση φιλέτου μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 5 °C.



Γράφημα 3: Καμπύλες ανάπτυξης για το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων για τη συντήρηση φιλέτου μπουτί κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 10 °C.



Γράφημα 4: Καμπύλες ανάπτυξης για το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων για τη συντήρηση φιλέτου μπουτί κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες στους 15 °C.

