



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

**Διδακτορική διατριβή**

Αξιολόγηση της ποιότητας, ασφάλειας και αυθεντικότητας του κρέατος  
με ταχείες μεταβολομικές μεθόδους

**Δημήτριος Ε. Παυλίδης**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2020

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

**Διδακτορική διατριβή**

Αξιολόγηση της ποιότητας, ασφάλειας και αυθεντικότητας του κρέατος  
με ταχείες μεταβολομικές μεθόδους

“Meat quality, safety and authenticity assessment by means of rapid  
metabolomics-based methods”

**Δημήτριος Ε. Παυλίδης**

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)  
Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Συνεπιβλέπων)  
Σκανδάμης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Συνεπιβλέπων)  
Πανάγου Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ  
Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ  
Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ  
Μποζιάρης Ιωάννης, Καθηγητής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Αξιολόγηση της ποιότητας, ασφάλειας και αυθεντικότητας του κρέατος με ταχείες μεταβολομικές μεθόδους

*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων*

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ως τώρα έλεγχοι ασφάλειας, ποιότητας και αυθεντικότητας αφορούν πολύπλοκες τεχνικές, οι οποίες κατά γενική ομολογία είναι χρονοβόρες, δίνουν ετεροχρονισμένα αποτελέσματα και συχνά μεροληπτικά. Στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσης διδακτορικής διατριβής με σκοπό να συναντηθούν οι ως άνω επιτηρήσεις σε εύλογο χρονικό διάστημα, αξιοποιήθηκε το μεταβολικό προφίλ (*metabolomics*), όπως αυτό προκύπτει από τις αναλυτικές πλατφόρμες: (α) Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας σε συνδυασμό με μικροεκχύλιση στερεής φάσης (HS/SPME-GC/MS), (β) ηλεκτρονική μύτη (e-nose), και (γ) Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με κλασσική μικροβιολογία και πολυμεταβλητή στατιστική. Στις περιπτώσεις που το ερώτημα ήταν «μικροβιολογικής φύσεως» τα δεδομένα των αισθητήρων συσχετίστηκαν με τις μικροβιακές αποκρίσεις. Σε εκείνες που αφορούσε ζητήματα αυθεντικότητας/νοθείας συσχετίστηκαν με τα μεταδεδομένα.

Στο “Κεφάλαιο 2”, δείγματα κιμά (βόειος, χοιρινός, ανάμικτος: 70/30% βόειος/χοιρινός) συλλέχθηκαν τυχαία κατά τη διετή επισκόπηση από μεγάλη βιομηχανική μονάδα της Αθήνας. Τα δείγματα αναλύθηκαν μικροβιολογικά και με GC/MS, όπου και αναπτύχθηκε μια επικυρωμένη μέθοδος για την αυθεντικότητα του κιμά με βάση το πτητικό προφίλ. Η Ανάλυση σε Κύριες Συνιστώσες (PCA) χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση τυχόν ομαδοποιήσεων. Εν συνεχεία η Ταξινόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) εφαρμόστηκε για να ταξινομήσει τα δείγματα και να συσχετίσει τις μεταβλητές με τις αντίστοιχες κατηγορίες κρέατος. Το σύνολο των δεδομένων χωρίστηκε 70/30% για βαθμονόμηση (70%) και έλεγχο του μοντέλου (30%) αντίστοιχα. Κατά τη βαθμονόμηση το 99, 100 και 100% των δειγμάτων ταξινομήθηκαν ορθά ως βόεια, χοιρινά και ανάμικτα αντίστοιχα, ενώ κατά τον έλεγχο τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 100, 100 και 95%. Και στα δύο υποσύνολα δεδομένων, η ΣΟΤ ανήλθε σε 99% κατά μέσο όρο. Εν συνεχεία, αναδείχθηκαν οι σημαντικές μεταβλητές (πτητικές ουσίες) κατά τη ταξινόμηση και συσχετίστηκαν με τις επιμέρους κατηγορίες κρέατος. Τέλος, αξιολογήθηκε η επίδραση της εποχής δειγματοληψίας, καθώς επίσης η ημέρα παρασκευής κιμά από τη σφαγή στο πτητικό προφίλ.

Στο «Κεφάλαιο 3» για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία διερευνήθηκε η μικροβιολογική και μεταβολομική (HPLC και GC/MS) σύσταση φιλέτων αλόγου κατά την συντήρηση σε παραδοσιακή συσκευασία στους 0, 5, 10, και 15°C. Προέκυψε πως η μικροβιακή συσχέτιση πλησιάζει τα υπόλοιπα κόκκινα κρέατα, με αξιοσημείωτη υψηλή παρουσία Ζυμών και Μυκήτων. Υπολογίστηκε κατ' εκτίμηση η εμπορική διάρκεια ζωής 263, 177, 92, 59 και 254, 169, 90, 58 ώρες βάσει της OMX και ψευδομονάδων για τους 0, 5, 10, και 15°C αντίστοιχα. Αξιολογήθηκε η μικροβιολογική κατάσταση αναπτύσσοντας μοντέλο παλινδρόμησης με μηχανές διανυσμάτων υποστήριξης (SVM-R) για πρόβλεψη της OMX, όπου και υπολογίστηκε συντελεστής συσχέτισης 0,915 και 0,910 και RMSE 0.88 και 0.89 κατά την εκμάθηση με στους 0, 5 και 15°C και έλεγχο στους 10°C αντίστοιχα. Όσον αφορά τα HPLC αποτελέσματα, η συγκέντρωση του προπιονικού, μυρμηγκικού, γαλακτικού, και ηλεκτρικού οξέος μειώθηκε κατά την αερόβια συντήρηση αλογίσσιων φιλέτων. Παράλληλα, το οξικό, κιτρικό, βουτυρικό και ισοβουτυρικό οξύ αυξήθηκαν. Όσον αφορά το πτητικό προφίλ, η κορυφή της πεντανάλης, εξανάλης, οκτανάλης, εννεανάλης, δεκανάλης συσχετίστηκε θετικά με τα φρέσκα δείγματα, καθώς το διακετύλιο, ακετοΐνη, επτάν-2-όνη, οκτάν-2-όνη, εξανοϊκό οξύ, 3-&2-μέθυλο-βουτανόλη, και 3-μέθυλο-βουτανάλη με τα δείγματα με  $> 7,2 \log_{10} \text{CFU/g}$ . Τέλος, η εξανάλη, πεντανόλη, και 1-οκτέν-3-όλη συσχετίστηκαν θετικά με δείγματα με  $\text{OMX} > 4,6$  και  $< 7,2 \log_{10} \text{CFU/g}$ .

Κατά το «Κεφάλαιο 4», στείρα (St) και φυσικά επιμολυσμένα (NC) μοσχαρίσια φιλέτα, συντηρήθηκαν αερόβια στους 2, 8 και 15 °C και αναλύθηκαν μικροβιολογικά ως προς την OMX και ως προς τους επιμέρους μικροβιακούς μεταβολίτες (χρησιμοποιώντας HS/SPME-GC/MS και HPLC-PDA-RI). Η ανάλυση του βιοχημικού μονοπατιού, κατέδειξε σημαντικά μονοπάτια κατά τη συντήρηση: κύκλος κιτρικών, γλυκόλυση, μεταβολισμός πυρουβικού, μεταβολισμός δικαρβοξυκλικών, μεταβολισμός αμινοξέων. Οι ουσίες 3-&2-μεθυλο-1-βουτανόλη, 3-& 2-μεθυλο-1-βουτανάλη, 2-μεθυλο-1-προπανάλη, βουταν-2-όνη, πενταν-2-όνη, επταν-2-όνη, εννεαν-2-όνη, κιτρικό, οξικό και βουτυρικό οξύ αναδείχτηκαν ως δυνητικοί μικροβιακοί μεταβολίτες στο κρέας και συσχετίστηκαν με την αλλοιωμένη κατηγορία. Η Συνολικά Ορθή Ταξινόμηση (ΣΟΤ%) κατά τη Διακριτική ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) μεταξύ NC και S ήταν 100, 88 και 100% κατά την επαλήθευση για HPLC, GC/MS και συζευγμένο σύνολο δεδομένων. Τα αποτελέσματα του SVM-R μοντέλου απέδωσε τιμές για τη ρίζα μέσου τετραγωνικού σφάλματος (RMSE) 0,84, 0,74 και 0,58 κατά την εκμάθηση στους 2 και 15°C και 0,95, 0,99 και 0,82 κατά τον έλεγχο στους 8°C για HPLC, GC/MS και συζευγμένο σύνολο δεδομένων αντίστοιχα.

Παράλληλα, η δυναμική της αλλοίωσης των στελεχών *Serratia liquefaciens* B293 και *Hafnia alvei* B295 μελετήθηκε in situ σε επιμολυσμένα φιλέτα υπό αερόβια συντήρηση στους 4 και 10°C και αναλύοντας με HS/SPME-GC/MS, HPLC-PDA-RI και HATR/FTIR (φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier). Οι παραπάνω ενώσεις, συν οξικός ισοαμυλεστέρας, μεθανοθειόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, βενζολοακεταλδεΰδη και βενζαλδεΰδη βρέθηκε ότι παράγονται από τα δύο στελέχη. Η ανάλυση βιοχημικού μονοπατιού κατέδειξε τον μεταβολισμό των πυρουβικών, κύκλο κιτρικών και τη γλυκόλυση ως τις σημαντικότερες βιοχημικές διεργασίες. Όσον αφορά τα FTIR αποτελέσματα, και τα δυο στελέχη είχαν υψηλές απορροφήσεις στους κυμματαριθμούς που αντιστοιχούν στα αμίδια, αμίνες, και ακόρεστες αλδεύδες και κετόνες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταβολομική-προσέγγιση που αναπτύχθηκε σε αυτή τη διατριβή, σε συνδυασμό με πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο προκαταρκτικού ελέγχου της μικροβιολογικής κατάστασης και αυθεντικότητας του κρέατος. Υπό προϋποθέσεις, θα μπορούσε να αντικαταστήσει μερικώς τη χρονοβόρα και ετεροχρονισμένη ISO μέθοδο καταμέτρησης τρυβλίων.

**Επιστημονική περιοχή:** Μικροβιολογία Τροφίμων

**Λέξεις κλειδιά:** μικροβιολογία τροφίμων, αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, ποιότητα, ασφάλεια, αυθεντικότητα, νοθεία, μηχανική μάθηση, GC/MS, HPLC, μεταβολομική, αλλοίωση κρέατος

## **Meat quality, safety and authenticity assessment by means of rapid metabolomics-based methods**

*Department of Food Science and Human Nutrition  
Laboratory of Microbiology and Biotechnology of foods*

### **ABSTRACT**

So far, safety, quality and authenticity assessment involve complex techniques, which are admittedly time-consuming, provide retrospective results and often biased. Under the context of the current doctoral thesis, in order to meet the above surveillance, metabolomics through different analytical platforms: (a) solid-phase microextraction - Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-SPME/GC-MS), (b) electronic nose (e-nose), and (c) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in tandem with multivariate statistics was utilized. In cases where the question had "microbiological background" the sensor responses were correlated with the microbial data. In those cases where the task was the freshness and/or authenticity assessment, the responses were associated with the metadata.

In "Chapter 2", beef, pork and mixed (70% beef and 30% pork) minced meat samples were obtained from a large meat processing plant in Athens during a two-year survey and analyzed both microbiologically and by means of HS-SPME/GC-MS. A validated method for the authentication of raw minced meat was developed based on the volatile fingerprints. Unsupervised (PCA) and supervised (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) multivariate statistical methods were applied to visualize, group and classify the samples. The data-set was splitted 70/30% for model calibration and validation respectively. During model calibration 99, 100 and 100% of the samples were correctly classified as beef, pork and mixed meat samples, respectively, while for model prediction the respective percentages were 100, 100 and 95% respectively. In both datasets, the overall correct classification rate amounted to 99% on average. Subsequently, the important variables (volatile substances) derived during classification were correlated with each meat category. Finally, the effect of sampling at different periods of the year and slaughtering to minced meat preparation on the volatilome formation was assessed.

In "Chapter 3", the microbiological association and shelf-life (SL) of horse fillets during aerobic storage at isothermal conditions (0-15 °C) was investigated for first time to our knowledge. In parallel, the metabolic profile of the samples was quantified by HS-SPME/GC-MS and HPLC-PDA-RI. It was shown that the microbial association was similar to those found for other red

meats, with a remarkably high presence of Yeasts and Moulds. The SL was estimated deterministically 263, 177, 92, 59 and 254, 169, 90, 58 hours for TVC and pseudomonads for 0, 5, 10, and 15 °C, respectively. Considering HPLC results, the concentration of propionic, formic, lactic and succinic acids decreased during aerobic storage of horse fillets, contrary to acetic, citric, butyric and isobutyric acid which increased. As far as the volatilome formation during aerobic storage is concerned, pentanal, hexanal, octanal, nonanal, decanal, were correlated with fresh samples, while diacetyl, acetoin, 2-heptanone, 2-octanone, hexanoic acid, 3-&2-methyl-butanol, and 3-methyl-butanal with samples with  $TVC > 7.2 \log_{10}CFU/g$ . Lastly, the areas of hexanal, pentanol, and 1-octen-3-ol were correlated with samples with  $TVC > 4.6$  and  $< 7.2 \log_{10}CFU/g$ . Herein, a support vector machine regression (SVM-R) model using data from 0, 5 and 15°C used to predict the responses of the dataset at 10°C with a correlation coefficient 0.915 and 0.910 for training and testing, respectively.

In the “Chapter 4”, sterile (St) and naturally contaminated (NC) beef fillets were stored aerobically at 2, 8 and 15 °C and analyzed microbiologically for TVC and their corresponding microbial metabolites (utilizing HS/SPME-GC/MS and HPLC). The aim of the current study was to assess the microbial contribution to metabolome formation. The pathway analysis highlighted significant with great impact biochemical paths during the spoilage process. These are: citrate cycle, glycolysis, pyruvate, dicarboxylate, amino acid metabolism. Among the identified isolated compounds, 3- & 2-methyl-1-butanol, 3- & 2-methyl-1-butanal, 2-methyl-1-propanal, 2-butanone, 2-pentanone, 2-heptanone, 2-nonanone, citric, acetic and butyric acid were found to be produced from microbes and so, they were associated with the spoiled class. PLS-DA managed to discriminate accurately St and NC with an overall correct classification % 100, 88 and 100 for HPLC, GC/MS and fusion dataset respectively. Using the common and metabolic active compounds SVM-R model yielded satisfied estimated values, with Root Mean Square Error 0.84, 0.74 and 0.58 for HPLC, GC/MS, and joint datasets respectively for training at 2 and 15°C and 0.95, 0.99 and 0.82 for testing at 8°C.

The spoilage potential of the strains *Serratia liquefaciens* B293 and *Hafnia alvei* B295 was examined in in-situ contaminated beef fillets under aerobic storage at 4 and 10 °C by analyzing with HPLC, GC/MS and Fourier Transform Infra-Red (FTIR). The above-mentioned compounds, except for 2-nonanone, plus isoamyl acetate, methanethiol, 2,3-butanediol, benzeneacetaldehyde and benzaldehyde were found to be produced by both strains. Considering

FTIR results, both strains exhibited high intensity in the wavenumber regions corresponding to amides, amines, and unsaturated aldehydes and ketones

The results indicated that the metabolomics-approach employed in this study in tandem with multivariate data analysis could be applied as a primary tool for the assessment of the microbiological condition and authenticity of raw meat. Under certain conditions it could partially substitute the time-consuming, retrospective, ISO plating method.

**Scientific area:** Food microbiology

**Keywords:** food microbiology, meat spoilage, quality, safety, authenticity, adulteration, machine learning, metabolomics, volatilomics, GC/MS, HPLC, enose, pathway analysis





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

Διδακτορική Διατριβή

Αξιολόγηση της ποιότητας, ασφάλειας και αυθεντικότητας του κρέατος  
με ταχείες μεταβολομικές μεθόδους

© Δημήτριος Ε. Παυλίδης

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Σκανδάμης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Πανάγου Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Μποζιάρης Ιωάννης, Καθηγητής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

«Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Ν.4353/1932, Άρθρο 202, παρ. 2)

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκείνους που με δίδαξαν, με ενέπνευσαν και με καθοδήγησαν στην επίτευξη των στόχων μου.

Συγκεκριμένα, ευχαριστώ τον καθηγητή Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά ανάδοχο της υποψηφιότητας μου ως διδάκτορας δίνοντας μου την ευκαιρία να δουλέψω σε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Τον ευχαριστώ επίσης για την επίβλεψη και για τις χρήσιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Ευχαριστώ ακόμη τους συνεπιβλέποντες Επίκουρο Καθηγητή Αθανάσιο Μαλλούχο και τον αναπληρωτή καθηγητή Παναγιώτη Σκανδάμη, για την αποδοχή τους ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Ευστάθιο Πανάγου, ο οποίος μοιράστηκε πολλές φορές τους προβληματισμούς μου, δίνοντας μου πολύτιμες συμβουλές. Την ευγνωμοσύνη μου εκφράζω ακόμη στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Dr. Παναγιώτη Τσακανίκα τόσο στον επιστημονικό τομέα μέσω συμβουλών κατά την ανάλυση των δεδομένων, όσο και σε φιλικό επίπεδο. Επίσης τη συνάδελφο Αθηνά Ροπόδη για την άριστη συνεργασία και αλληλοβοήθεια στις παράλληλη έρευνα μας .

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Αναστάσιο Σταματίου για την βοήθεια στην προετοιμασία «στείρων» φιλέτων, την Όλγα Χονδροδήμου και τον Βασίλη Ηλιόπουλο για τη βοήθεια τους και τεχνική υποστήριξη κατά τις μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις αντίστοιχα. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου για τη συναδελφική σχέση που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια και τις ανησυχίες που μοιραστήκαμε.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ηθική και οικονομική στήριξη όλα αυτά τα χρόνια, όπως και το φίλο μου Γιώργο Δαγλαρίδη για τη στήριξη του. Ιδιαίτερα τη σύζυγό μου Αθανασία Βλάχου για την αγάπη, τη δύναμη και την πίστη της στις προσδοκίες μας.

Τέλος, στον γιο μου Μάνο (Εμμανουήλ Παυλίδη), αφιερώνω την παρούσα με την ελπίδα πως η προσπάθειά μου, οι προσπάθειες όλων θα του προσφέρουν ένα καλύτερο μέλλον.

## Contents


<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>Ευχαριστίες.....</b>	<b>10</b>
<b>ΟΡΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>18</b>
<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή .....</b>	<b>20</b>
1. Εισαγωγή.....	21
1.1. Ακεραιότητα των τροφίμων (Food integrity).....	21
1.1.1. Ακεραιότητα των τροφίμων - Αλλοίωση.....	22
1.1.1.1. Αλλοίωση στο κρέας και παράγοντες που την επηρεάζουν .....	22
1.1.1.2. Δημιουργία πτητικού προφίλ στο κρέας.....	24
1.1.1.3. Κυριότεροι αλλοιωγόννοι μικροοργανισμοί στο κρέας .....	25
1.1.2. Ακεραιότητα των τροφίμων - Αυθεντικότητα.....	29
1.1.3. Βιωσιμότητα πρωτογενούς παραγωγής & Κατανάλωση κρέατος αλόγου.....	32
1.2. Αξιολόγηση της ποιότητας- Συμβατικές Vs “Ταχείες Αναλυτικές Μέθοδοι” .....	33
1.2.1. Συμβατικές μέθοδοι .....	33
1.2.2. Νεότερες εξελίξεις.....	34
1.2.3. Προρρητική μικροβιολογία (Predictive Microbiology).....	35
1.2.4. Ταχείες αναλυτικές μέθοδοι .....	36
1.2.5. Μεταβολομικές μέθοδοι .....	38
1.2.3.2.1. Αέρια Χρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή Φασματομετρίας Μάζας (GC/MS) .....	40
1.2.3.2.2. Ηλεκτρονική μύτη (Electronic nose – enose).....	44
1.1.3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης/Απόδοσης (HPLC).....	47
1.2.3.2. Αξιολόγηση της αυθεντικότητας και ανίχνευση δυνητικής νοθείας με μεταβολομικές μεθόδους .....	48
<b>1.3. Σκοπός της Διδακτορικής διατριβής.....</b>	<b>4949</b>
<b>Chapter II: A volatilomics approach for off-line authenticity assessment of raw minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis .....</b>	<b>53</b>
2.1. Materials and Methods .....	54
2.1.1. Meat sample collection .....	54
2.1.2. Microbiological analysis.....	54
2.1.3. Analysis of volatile compounds.....	54
2.1.3.1. Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) .....	55

2.1.3.2. Gas Chromatography - Mass Spectrometry .....	55
2.1.3.3. Identification of volatile compounds and data pretreatment .....	556
2.1.4. Descriptive analysis .....	58
2.1.5. Unsupervised data analysis .....	58
2.1.6. Supervised data analysis .....	58
2.1.6.1. Model calibration .....	58
2.1.6.2. Model optimization and validation .....	59
2.2. Results and discussion .....	60
2.2.1. Microbiological and pH measurement .....	60
2.2.2. Volatile compounds identification .....	61
2.2.3. Data analysis .....	64
2.2.3.1. A volatilomics approach for the authenticity assessment of raw red meat in tandem with multivariate data analysis .....	65
2.2.3.2. Correlation of volatile compounds with each meat class .....	68
2.2.3.3. Effect of sampling at different periods of the year and slaughtering to minced meat preparation on the volatilome. ....	71
2.3. Conclusion .....	73
Chapter III: Microbial and metabolomic succession of aerobically stored horse fillets .....	75
3.1 Materials and Methods .....	76
3.1.1. Horse meat preparation .....	76
3.1.2. Microbiological analysis and pH measurement .....	76
3.1.3. Model development and shelf-life estimation .....	77
3.1.4. HPLC-PDA-RI .....	analysis 78
3.1.5. Headspace Solid Phase Micro-Extraction-GC/MS .....	analysis 79
3.1.6. Data .....	analysis 80
3.2 Results and discussion .....	81
3.2.1. Development of the microbial association and pH measurement .....	81
3.2.2. Predictive modelling and shelf-life estimation .....	83
3.2.3. HPLC analysis .....	85
3.2.4. HS/SPME-GC/MS analysis .....	87
3.3. Conclusion .....	889

Chapter IV: Volatilomics in tandem with HPLC and multivariate data analysis for the assessment of microbial spoilage of aerobically stored beef fillets, potential microbial biomarkers and contribution of enterobacteria to metabolome formation .....	90
4.1. Materials and Methods .....	91
4.1.1 Beef samples preparation.....	91
4.1.2. Meat contamination with enterobacteria and aerobic storage .....	91
4.1.3. Microbiological and pH analysis .....	92
4.1.4. HPLC-PDA-RI Analysis .....	92
4.1.5. Volatilome analysis by Headspace SPME-GC/MS .....	93
4.1.6. ATR/FT-IR measurement .....	93
4.1.7. Data collection and processing pipeline .....	94
4.2. Results .....	96
4.2.1. Microbiological load and pH measurement.....	96
4.2.2. HPLC and pathway analysis .....	96
4.2.3. VOCs metabolism.....	98
4.2.4. Assessment of spoilage through HPLC and GC/MS and data fusion.....	100
4.3. Discussion.....	104
4.4. Conclusion.....	106
Acknowledgements .....	107
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και Μελλοντική δουλειά .....	108
5.1. Συμπεράσματα.....	109
5.2. Μελλοντική έρευνα .....	111
Κεφάλαιο 6: Αναφορές.....	113
<b>Δημοσιεύσεις.....</b>	<b>146</b>

## List of Figures

<u><a href="#">Εικόνα 1.1: Ειδοποιήσεις RASSF (άξονας y) κατά τα έτη 2000-2015 σχετικά με την απάτη των τροφίμων (υιοθετήθηκε από Bouzembrak et al., 2018)</a></u> .....	31
<u><a href="#">Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση των omics τεχνολογιών στον τομέα των τροφίμων (“Foodomics”)</a></u> .....	39
<u><a href="#">Εικόνα 1.3: Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης στον τομέα του κρέατος τα τελευταία 30 χρόνια. (Πηγή: <a href="https://www.scopus.com/">https://www.scopus.com/</a>)</a></u> .....	45
<u><a href="#">Εικόνα 1.4: Ροή εργασιών που ακολουθήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή</a></u> ..	50
<u><a href="#">Fig 2.1.: GC/MS instrument utilized in the PhD thesis</a></u> .....	56
<u><a href="#">Fig. 2.2.: Typical GC/MS chromatogram during meat analysis; Green: Pork meat, White: beef</a></u> .....	57

<a href="#">Fig. 2.2.1: Box-plot for the microbiological and pH range of the collected meat samples, which were analyzed with HS/SPME-GC/MS (PCA: TVC; CFC: <i>Pseudomonas</i> spp., VRBGA: Enterobacteriaceae, STAA: <i>B. thermosphacta</i>, MRS: lactic acid bacteria). B: beef; P: pork; M: mixed minced meat (70/30% w/w beef/pork) .....</a>	60
<a href="#">Fig. 2.2.2: Two-dimensional Principal Component Analysis (PCA) plot of the transformed (z-score) calibration dataset for PC<sub>1</sub> and PC<sub>3</sub> .....</a>	65
<a href="#">Fig. 2.2.3: Partial least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) plot of the different meat samples (scores) (Green: Pork, Blue: beef; Red: Mixed meat samples) (A) and loadings plot of input variables X (B) for the first two latent variables (Ald, Alc, Mis, Hyd, and Est codes are expressed in the Table 2.2) .....</a>	66
<a href="#">Fig. 2.2.4: Loadings plot of input variables X for the first two latent variables (Ald, Alc, Mis, Hyd, and Est codes are expressed in the Table 2.2) .....</a>	68
<a href="#">Fig. 2.2.5: Beta-weighted regression coefficient (Bw) values of PLS-DA model for (a) beef, (b) pork and (c) mixed minced meat species (Grey bars represent important compounds, whereas blue non-important) .....</a>	71
<a href="#">Fig. 2.2.6: Correlation bi-plot of loadings with seasons of the year that collected the samples. (Ald, Alc, Hyd, Ter, Est codes are explained in Table 2.2) .....</a>	72
<a href="#">Fig. 2.2.7.: Correlation bi-plot of loadings with preparation of minced samples 1,3 and 5 days after slaughtering (Ald, Alc, Hyd, Ter, Est codes are explained in Table 2.2). .....</a>	73
<a href="#">Fig. 3.1: JASCO HPLC system with two detectors (PDA &amp; RI) connected in series (HPLC-PDA-RI) .....</a>	78
<a href="#">Fig. 3.2.: Typical HPLC chromatogram of beef meat through PDA (Photo-Diode Array) (A) and RI (Refractive Index) (B) detector respectively. ....</a>	79
<a href="#">Fig. 3.2.1: Microbial association of aerobically stored horse fillets at 0°C (A), 5°C (B), 10°C (C), and 15°C (D) .....</a>	81
	
<a href="#">Fig. 3.2.2: A: Predictions of the Suboptimal Ratkowsky square-root model (equation 1) for the effect of temperature on the maximum specific growth rate of Total Viable Counts; B: Predictions of the modified Arrhenius equation for the effect of temperature on the shelf life of aerobically stored horse fillets. ....</a>	84
<a href="#">Fig. 3.2.3.: Heatmap representation generated from Hierarchical Cluster Analysis of 25 most significant volatiles associated with the three classes of horse meat according to the microbial load during storage (class A: TVC &lt; 4.6 log<sub>10</sub>CFU/g; class B: 4.6 &lt; TVC &lt; 7.2 log<sub>10</sub>CFU/g; class C: TVC &gt;7.2 log<sub>10</sub>CFU/g). The color scale of cells represents the abundance of each volatile, with red indicating high abundance and blue indicating low abundance. ....</a>	87
<a href="#">Fig. 4.1: Total viable counts (TVC) (mean ± standard deviation) of naturally contaminated (NC) beef fillets during aerobic storage at 2 (blue), 8 (red) and 15°C (green) under isothermal conditions. ....</a>	95

<a href="#">Fig. 4.2: Pathway analysis with the metabolites mapped in a KEGG pathway (accessible at <a href="http://www.genome.jp/kegg/pathway.html">http://www.genome.jp/kegg/pathway.html</a>). In the scatter plot the x-axis indicates the impact whereas the y-axis significant changes in a pathway (p-value) (red: high probability and high impact and orange: indicate low probabilities pathways with high impact; A: NC, B: <i>S. liquefaciens</i>, C: <i>H. alvei</i>).....</a>	97
<a href="#">Fig. 4.3: Heatmap expressing the correlation of the 13 identified compounds through HPLC-PDA-RI with meat classes (F: &lt;5.8; 5.8 &lt; SF&lt;7.0; S: &gt;7.0 log<sub>10</sub>CFU/g; St: 1 log<sub>10</sub>CFU/g; Red: High correlation, Blue: low or no correlation between compounds and groups) .....</a>	98
<a href="#">Fig. 4.4.: Heatmap representation generated from Hierarchical Cluster Analysis of 25 most significant volatiles associated with Stiii, Ha, Sl (S: &lt;1.0 log<sub>10</sub>CFU/g, Ha: <i>Hafnia alvei</i>, Sl: <i>Serratia liquefaciens</i>).....</a>	99
<a href="#">Fig. 4.5: Correlation bi-plot of scores (training samples) and loadings (metabolites); NC: naturally contaminated meat cluster (n=101), blue scores: samples (n=88), red scores: loadings, S: sterile meat cluster; loading codes are explained in Table 2) .....</a>	101
<a href="#">Fig. 4.6.: Spoilage assessment through the three different datasets: HPLC with 13 variables (A), GC/MS with 47 variables (B) and data fusion (HPLC &amp; GC/MS) using 60 variables (C) (solid symbols: training 2 and 15°C; open symbols: test at 8°C; solid line: target line, dashed line: ± 1.0 log<sub>10</sub>CFU/g).....</a>	102
<a href="#">Fig. 4.7: Heatmap representation expressing the correlation of the significant compounds during PLS-DA classification with testing dataset (8oC) (F&lt;5.8; SF: &gt; 5.8 &amp; &lt; 7.0 log<sub>10</sub>CFU/g; S: &gt; 7.0 log<sub>10</sub>CFU/g; Red: High, Blue: low or no correlation between compounds and groups) .....</a>	102

## List of Tables

<a href="#">Πίνακας 1.1.: Μικροβιολογικά Κριτήρια για τον κιμά σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005 .....</a>	33
<a href="#">Πίνακας 1.2.: Συγκριτική απεικόνιση μεθόδων που εφαρμόζονται στην ανάλυση των τροφίμων.....</a>	38
<a href="#">Πίνακας 1.3: Διερεύνηση της συμμετοχής ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στην αλλοίωση ζωικών τροφίμων .....</a>	42
<a href="#">Πίνακας 1.4: Κυριότερες εφαρμογές της ηλεκτρονικής μύτης στον τομέα της «Επιστήμης Κρέατος».....</a>	45
<a href="#">Table 2.1: Compliance of TVC<sup>a</sup> of individual packing units according to directive 2073/2005 (EC).....</a>	61
<a href="#">Table 2.2: Common Volatile compounds identified in Beef, Pork and Mixed samples that were further used in statistical analysis and association to the discrimination process</a>	62
<a href="#">Table 2.3: Confusion matrix during PLS-DA utilizing 6 latent variables for the training (n=317) (A), and testing (n=140) (B) respectively .....</a>	6767

<u>Table 3.1: Estimated model parameters of the sub-optimal Ratkowski equation to describe the temperature dependency of <math>\mu_{max}</math> of TVC</u> .....	83
<u>Table 3.2.: Shelf life estimation in hrs of aerobically stored horse fillets for each temperature, using Total Viable Counts (A), <i>Pseudomonas</i> spp. (B), and <i>B. thermosphacta</i> as indexes</u> .....	85
<u>Table 3.3: Support vector machine regression model performance using radial basis function kernel (rbf-SVM-R), (A): training dataset: 0, 10 and 15°C, testing 5°C and (B): training dataset: 0, 5 and 15°C, testing 10°C, for the prediction of Total Viable Counts (TVC)</u> 86.....	86
<u>Table 4.1: Confusion matrix of NC Vs. St as derived from the 3 datasets using PLS-DA classifier (each line represents the sensitivity: %correct classification)</u> .....	100
<u>Table 4.2: Assessment of the support vector machine regression models (SVM-R) with the radial basis function (RBF)</u> .....	101

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Πίνακες / Supplementary Material (Tables) .....** **133**

<u>Table S2.1: Mean peak areas of common volatile compounds identified in Beef, Pork and Mixed meat samples and effect of sampling in different seasons of the year</u> .....	133
<u>Table S2.2: Additional volatile compounds not included in statistical analysis.</u> .....	134
<u>Table S3.1: Estimated growth kinetics parameters for the microbial groups Total Viable Counts (TVC), <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brochothrix</i> (<i>B.</i>) <i>thermosphacta</i>, lactic acid bacteria (LAB), Enterobacteriaceae and Yeasts and Moulds (Y&amp;M) measured in this study</u> .....	136
<u>Table S4.1: Common identified compounds that were shown to be metabolized during storage of NC, Ha, Sl</u> .....	137
<u>Table S4.2: Growth parameters of microbial population measured in this study</u> .....	139
<u>Table S4.3: Parameters for growth prediction of representative indicators using the polynomial equation: <math>y=a*t^3+b*t^2+c*t+d</math> (a, b, c, d: model constants)</u> .....	140

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Εικόνες (Supplementary Material – Figures).....** **141**

<u>Εικόνα S1.1: Κατανάλωση κρέατος (kg κατά κεφαλήν/έτος) αλόγου στην Ευρώπη (Πηγή: Eurostat Database, 2014).</u> .....	141
<u>Εικόνα S1.2: Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την ηλεκτρονική μύτη στα τρόφιμα τα τελευταία 30 χρόνια (Πηγή: <a href="https://www.scopus.com/">https://www.scopus.com/</a>).</u> .....	141
<u>Fig. S.3.1: Observed and Predicted growth kinetics of TVC in aerobically stored horse fillets at 0-15°C. (circles:15°C; boxes: 10°C; triangles: 5°C; rhombus: 0°C)</u> .....	142
<u>Fig. S3.2: Predictions of the estimated Suboptimal Ratkowsky square-root model using observed TVC values from beef (Data collected from Combase)</u> .....	142
<u>Fig. S3.3: Observed vs. predicted values for Total Viable Counts (TVC) during rbf-SVM regression model development, (A): training dataset: 0, 10 and 15°C (solid symbols), testing</u>	



<u>5°C (open symbols) and (B): training dataset: 0, 5 and 15°C (solid symbols), testing 10°C (open symbols).....</u>	143
<u>Fig. S3.4. Distribution fitting based on microbiological dataset range of the analyzed samples with GC/MS (alpha=0.7179, beta=0.5924, c=2.6294, d=9.7601) .....</u>	143
<u>Fig S4.1: Observed and estimated growth curves for the two utilized strains (data points: observed, solid lines: estimated values).....</u>	144
<u>Fig. S4.2: Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) plot of HPLC-PDA-RI (A) and GC/MS (B) data respectively for Sterile Vs. Naturally Contaminated Beef fillets using 5 principal components (NC: Naturally contaminates, S: Sterile).....</u>	144
<u>Fig S4.3: PLS-DA plot for S. liquefaciens (Sl) Vs. H. alvei (Ha) utilizing two (2) latent variables .....</u>	144
<u>Fig. S4.4.: PLS-DA plot of the fusion training dataset (GC/MS &amp; HPLC); Factor1Vs Factor2; <math>F \leq 5.79 \log_{10}CFU/g</math>, <math>5.8 \log_{10}CFU/g &lt; SF \leq 6.99 \log_{10}CFU/g</math>, αλλοιωμένα <math>S &gt; 7.0 \log_{10}CFU/g</math>.....</u>	145

**ΟΡΟΛΟΓΙΑ**

<b>Συντομία</b>	<b>Διεθνής Ορολογία</b>	<b>Μετάφραση</b>
A/O	de-boned	Άνευ οστού
OMX	Total Viable Counts/Total Aerobic Spoilage Bacteria	Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα
ANOVA	Analysis of Variance	Ανάλυση της Διακύμανσης
Af	Accuracy factor	Δείκτης ακρίβειας
ANN	Artificial Neural Networks	Τεχνητά Νεωρωνικά Δίκτυα
Bf	Bias factor	Δείκτης μεροληψείας
-	bi-plot	διγράφημα
-	Box-plot	Θηκογραφήματα
Ea	Activation energy	Ενέργεια ενεργοποίησης
GC/MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry	Αέρια Χρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή Φασματομετρίας Μάζας
	Heatmap	Θερμικός χάρτης
HCA	Hierrarchical Clustering	Ιεραρχική Συσταδοποίηση
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης / Πίεσης
HSPME	Headspace Solid Phase Micro-Extraction	Μικροεκχύλιση Αέριας Υπερκείμενης Φάσης
LB	Lower Bound	Χαμηλότερο επίπεδο εμπιστοσύνης - 95%
LV	Latent Variable	Λανθάνουσα Μεταβλητή
MAP	Modified Atmosphere Packaging	Ατμοσφαιρικά τροποποιημένη συσκευασία
-	Metabolomics	Ανάλυση μεταβολικού προφίλ
M.O.S.	Metal Oxide Semiconductor	Αισθητήρες Μεταλλικών Οξειδίων
NC	Naturally Contaminated	Φιλέτα με προυπάρχουσα φυσική χλωρίδα.
PCA	Principal Component Analysis	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών
PLS (R / DA)	Partial Least Squares (Regression / Discriminant Analysis)	Μέθοδος Ανάλυσης Μερικών ελαχίστων Τετραγώνων (Παλινδρόμηση / Διακριτή Ανάλυση)

PRESS	prediction residual error of sum of squares	μέθοδο ελαχιστοποίησης του σφάλματος του αθροίσματος των υπολειμμάτων, των αποστάσεων
r	Correlation coefficient	Συντελεστής συσχέτισης
rbf-SVM	Radial basis function-Support vector machine	Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης με συνάρτηση RBF
RE%	Relative Error (%)	Σχετικό Σφάλμα (%)
RMSE	Root mean square error	Ρίζα Μέσου Τετραγωνικού σφάλματος
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική Τυπική Απόκλιση
	Spoilers	Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί
SE	Standard Error	Τυπικό Σφάλμα
SSOs	Specific Spoilage Organisms	Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί
SVM	Support Vector Machine	Μηχανές Διανυσμάτων Στήριξης
TAS	Total Aerobic Spoilage Bacteria/ Total Viable Counts	Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα
TVC	Total Viable Counts/Total Aerobic Spoilage Bacteria)	Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα
UB	Upper Bound	Υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης-95%
Unsb	Unscrambler: version:9,3 10.2-10.4	
-	Volatilomics	Ανάλυση Πτητικού Μεταβολικού Προφίλ
-	Confusion Matrix	Πίνακας Ταξινόμησης
RoI	Reliability of Identification	Αξιοπιστία ταυτοποίησης
-	knowledgeability	Γνώση
-	αναδυόμενοι κίνδυνοι	emerging risks
-	Απάτη / Νοθεία	Food fraud
-	μικροσκοπία επιφθορισμού (	Epifluorescence
-	ηλεκτρική αντίσταση	electrical impedance
-	Βιοδείκτες	biomarkers
NGS		Next-generation sequencing

## **Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή**

## 1. Εισαγωγή

Η αλυσίδα εφοδιασμού των τροφίμων (food supply chain) έχει αναγνωριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) ως κρίσιμη υποδομή ανάπτυξης. Η πολυπλοκότητά της είναι η κύρια αιτία που παρουσιάζεται ευπαθής και συχνά ζημιογόνος. Ανάλογα με τη δομή (food matrix) των τροφίμων, μία φυσική πρωτογενής ή/και μεταγενέστερη επιμόλυνση από διάφορους μικροβιακούς και χημικούς παράγοντες, αλλά ακόμα και περιστατικά εξάπτησης λαμβάνουν χώρα παγκοσμίως. Παράλληλα, οι συνεχείς απαιτήσεις της παγκοσμιοποιημένης αγοράς, σε συνδυασμό με την αύξηση της παραγωγής, διανομής και παράδοσης πρώτων υλών και τελικών προϊόντων, αλλά και τους οδηγούς της ασφάλειας των τροφίμων (drivers of food safety) αναμένεται να αυξήσει τον αριθμό των αναλύσεων που απαιτούνται ανά παρτίδα ή/και κοντέινερ.

Κατά συνέπεια, απαιτούνται αξιόπιστα μοντέλα πρόβλεψης της συμπεριφοράς των υπευθύνων μικροοργανισμών στους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (McMeekin et al., 2008; McMeekin, Smale, Jenson, Ross, & Tanner, 2006). Χρειάζονται επίσης μεθοδολογίες ή/και τεχνικές (McMeekin et al., 2006), οι οποίες υποστηρίζονται από μαθηματικές εξισώσεις πρόβλεψης και ταξινόμησης, ούτως ώστε να εδραιωθεί επιστημονικά η διαδικασία λήψης αποφάσεων (decision-making). Με την εφαρμογή αυτών, θα ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες των τροφίμων λόγω αλλοίωσης με αποτελεσματικό και έγκαιρο τρόπο και θα καταστούν τελεσίδικες οι απαραίτητες διορθωτικές ενέργειες στον κατάλληλο χρόνο (Tamplin, 2018).

### 1.1. Ακεραιότητα των τροφίμων (Food integrity)

Οι καταναλωτές του σήμερα, «χαμένοι» στον κυκεώνα της αγοράς ανησυχούν όλο και περισσότερο για τις παραμέτρους που πρέπει να διέπουν την κατανάλωση τροφίμων. Τα τρόφιμα που διακινούνται, θα πρέπει να είναι ασφαλή (Food Safety), ποιοτικά (Food Quality) και αυθεντικά (Food Authenticity).

Κατά την προσπάθεια καθορισμού αυτών των παραμέτρων, προκύπτει πως η ασφάλεια είναι αδιαμφισβήτητο χαρακτηριστικό, το οποίο απορρέει από τον γενικό Ευρωπαϊκό Κανονισμό Ασφαλείας των Τροφίμων (EC 178/2002). Βάσει της διάταξης αυτής, κάθε τρόφιμο που διακινείται εντός της Ε.Ε. θα πρέπει δυνητικά να μην θέτει σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή. Όσον αφορά την ποιότητα, αποτελεί υποκειμενικό κριτήριο και ορίζεται διαφορετικά από τους καταναλωτές βάσει ηθών, εθίμων και διατροφικών συνηθειών (Nychas, Marshall, & Sofos, 2007; Paramithiotis, Skandamis, & Nychas, 2009), αλλά και γεωπολιτικών

παραγόντων. Τέλος, αναφορικά με την αυθεντικότητα, πρόσφατα διατροφικά σκάνδαλα (π.χ. μελαμίνη σε γάλα, αλογίσιο κρέας σε λαζάνια σε αντικατάσταση βόειου, fipronil σε αυγά, μη-βιολογικά ως δήθεν βιολογικά προϊόντα, νοθευμένα έλαια, ημερομηνίες λήξεως, και άλλα πολλά, έχουν αυξήσει την ανησυχία τη δυσπιστία των καταναλωτών σχετικά με το τι καταναλώνουν (Pavlidis et al., 2019). Παράλληλα έχουν θέσει σε επαγρύπνηση τις Αρχές Ελέγχου να εντείνουν τις επισκοπήσεις, και τους επιτόπιους ελέγχους τόσο στην αγορά, όσο και στα σημεία εισόδου από χώρες εκτός Ε.Ε.

### **1.1.1. Ακεραιότητα των τροφίμων - Αλλοίωση**

Εξαιτίας της αλλοίωσης ή/και ποιοτικής υποβάθμισης, ετησίως διάφορες πρώτες ύλες και τελικά προϊόντα απορρίπτονται από την αγορά. Συγκεκριμένα εκτιμάται ότι περίπου 25% της παγκόσμιας παραγωγής αποσύρεται λόγω μικροβιακής αλλοίωσης (Bondi et al., 2014). Επιπλέον, σήμερα, η απόδοση της ημερομηνίας λήξης (ΗΛ) των νωπών και ιδίως του κρέατος, είναι συντηρητική. Η πρακτική αυτή επιβαρύνει με επιπλέον αποσύρσεις από το ράφι, δεδομένου ότι το προϊόν είναι πολλές φορές κατάλληλο προς κατανάλωση ακόμα και μετά το πέρας αυτής (Van Boxstael, Devlieghere, Berkvens, Vermeulen, & Uyttendaele, 2014). Συνεπώς, δεν αποτελεί μόνο τεράστια οικονομική επιβάρυνση ετησίως, αλλά επιφέρει δυσπιστία του καταναλωτή και προσθέτει ζητήματα βιωσιμότητας.

#### **1.1.1.1. Αλλοίωση στο κρέας και παράγοντες που την επηρεάζουν**

Το κρέας εξαιτίας της διαθεσιμότητας σε θρεπτικά συστατικά και της υψηλής ενεργότητας ύδατος ( $a_w > 0,98$ ) ευνοεί την ανάπτυξη των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (spoilers) (Ercolini, Russo, Torrieri, Masi, & Villani, 2006). Η υποβάθμιση του στα αρχικά στάδια αφορά συγκεκριμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, π.χ. υφή, εμφάνιση και γεύση, τα οποία είναι συχνά υποκειμενικά (Nychas et al., 2007; Paramithiotis et al., 2009). Είναι αποδεκτό πως για συντηρημένα τεμάχια κρέατος η σχέση αλλοίωσης και μικροβιακού πληθυσμού εκφράζεται αριθμητικά και ισχύει το “κατώφλι” των  $10^7$ -  $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup> ή g όπου αρχίζουν να εμφανίζονται τα τυπικά χαρακτηριστικά της αλλοίωσης (Gill, 1983; Koutsoumanis, Stamatiou, Skandamis, & Nychas, 2006). Ενδεικτικά αναφέρονται, η αλλαγή αρώματος από το ιδιαίτερο της φρεσκάδας (νωπότητος), στο ταγγισμένο-βουτυρώδες, η αλλαγή χρώματος από το έντονο ζωντανό κόκκινο σε σκοτεινόχρωμο. Μπορούν να εμφανιστούν πιο σοβαρά χαρακτηριστικά

παρατεταμένης σήψης όπως π.χ. εμφάνιση γλοιώδους υφής (από δεξτράνη) στην επιφάνεια του κρέατος, δυσάρεστη οσμή και γεύση. Ουσιαστικά, αυτές οι οργανοληπτικές μεταβολές, δεν είναι άλλο παρά προϊόντα μεταβολισμού και ενζυμικής δράσης των μικροοργανισμών (Casaburi, Piombino, Nychas, Villani, & Ercolini, 2015).

Βιβλιογραφικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση, αναφέρονται σαν “ενδογενείς, εξωγενείς, συνδυαστικοί παράγοντες και αναδυόμενες επιδράσεις” (Nychas & Skandamis, 2005; Nychas, Skandamis, Tassou, & Koutsoumanis, 2008). Σε πρώτη φάση, τη μικροβιακή συσχέτιση, δηλαδή το ποιο μικροοργανισμοί θα επικρατήσουν στο υπόστρωμα, διαμορφώνουν παράγοντες όπως: ο τρόπος θανάτωσης και εκσπλαχνισμού των σφάγιων, οι συνθήκες υγιεινής προ-, κατά-, και μετά τη σφαγή, οι διαθέσιμοι μηχανισμοί επεξεργασίας (αερισμός, υγρασία) (Brown & Baird-Parker, 1982). Σε επίπεδο “λιανοπώλησης”, η περίοδος έως τη λήξη (time to expiration) θεωρείται η εμπορική διάρκεια ζωής του προϊόντος στο ράφι (Dalgaard, 1995). Αυτό πρακτικά μεταφράζεται σε «χρόνο που το τρόφιμο παραμένει αποθηκευμένο, έως την αλλοίωσή του». Οι βακτηριακοί πληθυσμοί σε αυτό το σημείο εξαρτώνται από τα αρχικά τους επίπεδα, το παρελθόν (ιστορία) του τροφίμου και κυρίως την έκταση και ένταση της ανάπτυξής τους, που επηρεάζεται από τον τύπο του προϊόντος, τις συνθήκες συντήρησης και διανομής (Borch, Kant-Muermans, & Blixt, 1996; Nychas et al., 2008). Εδώ εντάσσονται οι χειρισμοί από τους καταναλωτές καθώς επίσης και κοινωνικό-οικονομικοί παράγοντες, όπως η ζήτηση αγαθών, δεδομένου ότι η χαμηλή ζήτηση επιφέρει παράταση της παραμονής του προϊόντος στο ράφι.

Με στόχο την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, διαμορφώνουμε κατάλληλα τις περιβαλλοντικές συνθήκες επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών εγείροντας «εμπόδια» (“hurdles theory”) καθ’ όλη την τροφική αλυσίδα (Leistner, 2000; Leistner & Gorris, 1995). Για παράδειγμα, η θερμοκρασία έχει αποδειχτεί ως ο σημαντικότερος εξωτερικός (extrinsic) παράγοντας που επηρεάζει άμεσα την αλλοίωση κι ασφάλεια του κρέατος (Nychas et al., 2008; Valdramidis, 2016). Οι χαμηλές θερμοκρασίες (ψύξη), σαν πρωταρχικό εμπόδιο, μπορούν να τροποποιήσουν το ρυθμό και τη φύση της αλλοίωσης. Όμως η έκταση του “shock” που υποβάλλονται οι μικροοργανισμοί λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως είδος μικροοργανισμών, φάση ανάπτυξης των κυττάρων, διαφορά θερμοκρασίας και ρυθμός ψύξης (Adams & Moss, 2000). Συνεπώς η διαδικασία της αλλοίωσης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες συνεχίζει να προωθείται, αλλά με εμφανώς χαμηλότερους ρυθμούς και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Argyri, Panagou, Tarantilis, Polysiou, & Nychas, 2010). Γενικά είναι αποδεχτό ότι σε θερμοκρασίες ψύξης ευνοείται η κυριαρχία των ψυχρότροφων μικροοργανισμών και εμποδίζεται αυτή των μεσόφιλων. Δεδομένου των

παραπάνω, είναι απαραίτητο να εξασφαλίσουμε την ακεραιότητα της ψυκτικής αλυσίδας από την παραγωγή, έως την τελική κατανάλωση. Ένα συνεργιατικό μέσο προς διασφάλιση σταθερής χαμηλής θερμοκρασίας είναι η βελτίωση των συνθηκών συντήρησης σε οικιακό επίπεδο (Holsteijn & Kemna, 2018).

#### 1.1.1.2. Δημιουργία πτητικού προφίλ στο κρέας

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος λαμβάνουν χώρα διάφορες βιοχημικές διεργασίες, οι οποίες οδηγούν στην ποιοτική υποβάθμιση. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η οξείδωση των λιπών, η δράση των ενδογενών ενζύμων και η μικροβιακή δραστηριότητα είναι οι σημαντικότερες εξ' αυτών (Casaburi et al., 2015a; El-Din A. Bekhit, Holman, Giteru, & Hopkins, 2021; Resconi et al., 2018; Sabow et al., 2016). Αναφορικά με την δράση των ενζύμων έχει αποδειχθεί ότι η συμβολή τους είναι αμελητέα σε σχέση με τη δράση της μικροβιακής χλωρίδας (Nychas & Tassou, 1997). Όσον αφορά το μικροβίωμα (Microbiome), αυτό κατά τη μικροβιακή συσχέτιση θα παράξει διάφορους μεταβολίτες – κυρίως πτητικούς - οι οποίοι οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Wang, Wang, Liu, & Liu, 2012). Αξιοποιώντας την πληροφορία του μεταβολικού προφίλ με όρους ποσοτικούς, μπορούμε να αποφανθούμε για τη μικροβιακή επιβάρυνση κατά την εκάστοτε χρονική στιγμή, να ανατρέξουμε (trace-back) στην προ-ιστορία του προϊόντος και να εκτιμήσουμε μια μελλοντική εξέλιξη (trace-forward) της αλλοίωσης κατά τη διάρκεια ζωής του.

Για παράδειγμα κατά τη συντήρηση μοσχαρίσιου κιμά σε παραδοσιακή και ενεργό συσκευασία αναδείχτηκαν ως δείκτες αλλοίωσης οι ουσίες πεντάν-2-όνη, εννεαάν-2-όνη, οκτάν-3-όνη, διακετύλιο, ακετοΐνη, 3-&2-μέθυλο-1-βουτανόλη, γαλακτικός, προπανοϊκός, οξικός, και εξανοϊκός αιθυλεστέρας (Argyri, Mallouchos, Panagou, & Nychas, 2015). Σε παρόμοια μελέτη σε μοσχαρίσιο κρέας συντηρημένο σε ενεργό συσκευασία και κενό αναδείχτηκαν οι 3-&2-μέθυλο-1-βουτανόλη, 3-&2-μέθυλο-βουτανάλη, πεντανόλη, εξανόλη, 2,3-οκτανοδιόνη, 3,5-οκτανοδιόνη, οκτανάλη και εννεανάλη (Saraiwa et al., 2015). Πρόσφατα, οι Mansur et al (Mansur, Seo, et al., 2019) αναφέρουν πως το οξικό οξύ, αιθανόλη, 3-&2-μέθυλο-1-βουτανόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, βουτάν-2-όνη, διακετύλιο, ακετοΐνη, επτάν-2-όνη, και οκτάν-3-όνη συσχετίστηκαν θετικά με αλλοιωμένες μπιριζόλες, οι οποίες είχαν συντηρηθεί αερόβια. Από τις διάφορες μελέτες παρατηρείται πως οι περισσότερες εκ των ουσιών που προκύπτουν ως δυνητικοί μεταβολίτες είναι κοινές. Όμως απαιτείται διερεύνηση της προέλευσης τους ούτως ώστε να αναδειχτούν τυχόν μικροβιακοί βιοδείκτες.



Επιπλέον, σε επίπεδο προρρηξης, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας σαν μεταβλητές εισόδου τους πτητικούς μεταβολίτες και εξόδου τη μικροβιολογική κατάσταση του κρέατος (Argyri et al., 2015; Estelles-Lopez et al., 2017; Saraiva et al., 2015).

### 1.1.1.3. Κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στο κρέας

Ο μυϊκός ιστός υγιών ζώων, μετά τη σφαγή θεωρείται στείρος. Το μικροβιολογικό φορτίο κατά την επεξεργασία των σφάγιων εξαρτάται ισχυρά από τη διασπορά των μικροοργανισμών στα σφαγεία (Sheridan, 1998). Η αρχική επιφανειακή μικροχλωρίδα διαμορφώνεται από τη φυσική μικροχλωρίδα και τυχόν περιβαλλοντικές επιμολύνσεις κατά το χειρισμό και συντήρηση μετά τη σφαγή (Ercolini et al., 2006; Skandamis & Nychas, 2002). Γενικά, τα Gram<sup>-</sup> αερόβια ψυχρότροφα γένη *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* και *Aeromonas*, το προαιρετικά αναερόβιο είδος *Shewanella putrefaciens*, αλλά και Gram<sup>+</sup> βακτήρια, όπως *Lactobacillus* spp., *Brochothrix (B.) thermosphacta*, αποτελούν την αρχική μικροχλωρίδα στο κρέας (Adams & Moss, 2000; Borch et al., 1996; Dainty & Mackey, 1992; Doulgeraki, Ercolini, Villani, & Nychas, 2012; Doulgeraki, Paramithiotis, Kagkli, & Nychas, 2010; Drosinos & Board, 1995; Ercolini et al., 2006; Lambert, Smith, & Dodds, 1991; Li et al., 2019; Mann et al., 2016; Nychas et al., 2007; Papadopoulou, Doulgeraki, Botta, Cocolin, & Nychas, 2012). Τα περισσότερα εξ αυτών, μαζί με *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., και *Vibrio* spp., απομονώνονται από δέρματα ζώων, επιφάνειες εργασίας μέσα στα σφαγεία, μεταλλικά πλεκτά γάντια, σφάγια, τεμαχισμένα κρέατα, καθώς επίσης από περιβαλλοντικά δείγματα απο βιομηχανίες επεξεργασίας κρέατος (Borch et al., 1996; Gill, Deslandes, Rahn, Houde, & Bryant, 1998; Gill & Jones, 1995; Gustavsson & Borch, 1993; Mann et al., 2016; Nychas et al., 2008). Με στόχο την αναχαίτιση και επιβράδυνση αυτού του μικροβιακού κλάσματος, ένα από τα αποτελεσματικότερα μέσα, είναι η συσκευασία (Leistner, 2000).

Ο περιέκτης (συσκευασία), περιβάλλει το προϊόν και το προστατεύει από επιμολύνσεις (Doulgeraki et al., 2010), μηχανικές βλάβες και τραυματισμούς. Παράλληλα φέρνει το προϊόν σε επικοινωνία με τους καταναλωτές, ως εργαλείο marketing (McMillin, 2008; Yam, Takhistov, & Miltz, 2005) και συμμετέχει στην ευκολότερη διακίνηση του. Προστατεύει το κρέας από την απώλεια υγρασίας γεγονός που συμβάλει στην τήρηση της νομοθεσίας (διατήρηση βάρους). Προωθεί την επιλεκτική ανάπτυξη μικροοργανισμών, μέσω της διαμόρφωσης του περιβάλλοντος που τους περιβάλλει, και συνεπώς αυξάνει τη διάρκεια διατήρησης του προϊόντος στο ράφι. Σαν αποτέλεσμα των παραπάνω αποδίδεται προστιθέμενη αξία στο τελικό

προϊόν και αυξάνεται το κέρδος, λόγω μη-απωλειών κόστους. Ανάλογα με τον αερισμό, όπως αυτός δημιουργείται από την εκάστοτε συσκευασία ευνοούνται κατά περίπτωση οι (α) αερόβιοι, (β) προαιρετικά αναερόβιοι και (γ) αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Οι σπουδαιότεροι και πλέον συχνοί εξ' αυτών περιγράφονται παρακάτω.

### **Κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στο κρέας – Παραδοσιακή συσκευασία**

Οι κυριότεροι ειδικοί αλλοιωγόνοι (Specific Spoilage, SSOs) μικροοργανισμοί κατά την παραδοσιακή (αερόβια) συσκευασία ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* spp, κοινώς ψευδομονάδες. Πρόκειται για ψυχρότροφα, μη-σπορογόνα, Gram<sup>-</sup> βακτήρια με μεγάλο εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης (Borch et al., 1996; Nychas, Drosinos, & Board, 1998). Τα είδη που μετά από φαινοτυπικό και μοριακό προσδιορισμό απομονώνονται σε φρέσκο, αλλά και αλλοιωμένο κρέας είναι τα *Pseudomonas (Ps.) fragi*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens*, *Ps. ludensis*, *Ps. taetrolens* (Dainty, 1996; Doulgeraki & Nychas, 2013; Ercolini et al., 2010; Mansur, Seo, et al., 2019; Nychas et al., 2008). Τα ίδια απαντώνται και σε άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το γάλα (Stanborough et al., 2018). Η δυναμική αλλοιωγόνος δράση τους έχει αποδοθεί στον μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης ή/και τη μεγαλύτερη συγγένεια τους με το οξυγόνο (Gill & Newton, 1977). Αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η εμφάνιση γλοιώδους υφής (slime) και δυσσομίας (off-odours). Εκτός από τα παραπάνω είδη, στους λεμφαδένες των χοίρων ανιχνεύεται το παθογόνο για τον άνθρωπο και τα ζώα (ζωνόσος) *Ps. aeruginosa* (Mann et al., 2014). Τέλος, στο μυϊκό ιστό των σφάγιων οι *Ps. syringae* και *Ps. marginalis* (Mann et al., 2016).

Ο *Brochothrix (B.) thermosphacta* ένα ψυχρότροφο, Gram<sup>+</sup>, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, διεκδικεί αξιόλογη συμμετοχή στην αλλοιωγόνο χλωρίδα του κρέατος κατά την αερόβια συντήρηση. Έχει διαπιστωθεί πως μετέχει στην αλλοίωση του χοιρινού και πρόβειου κρέατος σε ποσοστό 26 και 22% αντίστοιχα (Dainty & Hibbard, 1983). Ευθύνεται για την παραγωγή δυσάρεστων οσμών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Casaburi et al., 2014; Casaburi, Piombino, Nychas, Villani, & Ercolini, 2015; Kilcher, Loessner, & Klumpp, 2010; Papadopoulou et al., 2012; Pennacchia, Ercolini, & Villani, 2009). Σε σύγκριση με τις ψευδομονάδες εμφανίζει μικρότερο δυναμικό αλλοίωσης, δεδομένου ότι η κύρια πηγή άνθρακα του κρέατος, δηλαδή η γλυκόζη, μεταβολίζεται ταχύτερα από τα υποχρεωτικά αερόβια στελέχη των ψευδομονάδων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), αν και ανιχνεύονται, εμφανίζουν μικρή συμμετοχή κατά την αλλοίωση του κρέατος υπό αερόβιες συνθήκες, με εξαίρεση το αρνί (Stiles & Holzapfel, 1997). Επιπρόσθετα τα ψυχρότροφα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae (*Hafnia (H.) alvei*, *Serratia (S.) liquefaciens*, *S. proteamaculans*, *Enterobacter (Ent.)*

*agglomerans*, *Citrobacter freundii*) αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του κρέατος (Doulgeraki, Paramithiotis, & Nychas, 2011). Η παρουσία των τελευταίων αποτελεί δείκτη υγιεινής, ενώ έχει αναφερθεί ότι προέρχονται από εντερικές επιμολύνσεις (Brown & Baird-Parker, 1982). Τέλος, ενώ έχει αναφερθεί ότι οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταβολή της γεύσης (Margalith, 1981; Pérez Chabela, Rodríguez Serrano, LaraCalderón, & Guerrero, 1999), έως σήμερα υπάρχουν ελάχιστες αναφορές σχετικά με τη δυναμική της αλλοίωσης των ζυμών στο κρέας.

Δεδομένου ότι οι παραπάνω μικροοργανισμοί έχουν ισχυρό δυναμικό αλλοίωσης και προσδίδουν ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά προκύπτει η αναγκαιότητα τροποποίησης των συνθηκών συντήρησης του κρέατος. Η ενεργός συσκευασία, μεταβάλλει το περιβάλλον μέσα στο οποίο τα αλλοιωγόνα βακτήρια επικρατούν ώστε να επιομηκυνθεί η διάρκεια συντήρησης.

#### ***Κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στο κρέας – Ενεργός συσκευασία***

Ενεργός συσκευασία (Modified Atmosphere Packaging - MAP), καλείται εκείνη κατά την οποία το προϊόν τοποθετείται σε κλειστούς περιέκτες, αφαιρείται ο ήδη υπάρχων (ατμοσφαιρικός) αέρας, εισάγεται αδρανές αέριο κατάλληλης σύστασης (gas-flush packaging) και τέλος σφραγίζεται με κατάλληλο υλικό φιλμ (McMillin, 2008). Η αέρια σύσταση στους περιέκτες τροποποιείται με σκοπό τη μείωση της αναπνοής, την ελάττωση της μικροβιακής ανάπτυξης αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών και την επιβράδυνση της ενζυμικής δράσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος (McMillin, 2008; Young, Reviere, & Cole, 1988).

Τα κυριότερα αέρια που χρησιμοποιούνται είναι το οξυγόνο (O<sub>2</sub>), διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>), και άζωτο (N<sub>2</sub>). Το πρώτο παρεμποδίζει την ανάπτυξη των αυστηρά αναερόβιων παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. *Clostridium (Cl.) botulinum*, *Cl. perfringens*) και διατηρεί την φυσική ερυθρή χροιά του μυϊκού ιστού λόγω οξυγόνωσης της μυοσφαιρίνης σε οξυμυοσφαιρίνη. Το CO<sub>2</sub> επιλέγεται εξαιτίας της βακτηριοστατικής του δράσης, η οποία παρατείνει τη φάση προσαρμογής και αυξάνει το χρόνο διπλασιασμού των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού αύξησης. Έχει προταθεί η προσθήκη O<sub>2</sub> σε ποσοστά 25–90% και CO<sub>2</sub> 15–80% (Belcher, 2006). Τέλος, το N<sub>2</sub> αποτρέπει την μηχανική κατάρρευση της συσκευασίας όταν ένα μεγάλο μέρος του CO<sub>2</sub> χρησιμοποιείται στο μείγμα. Αυτό διότι το CO<sub>2</sub> απορροφάται από το νερό και το λίπος του κρέατος μέχρι να επέλθει εξισορρόπηση ή κορεσμός (Jakobsen & Bertelsen, 2007). Ο πλέον επικρατέστερος συνδυασμός είναι O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> σε αναλογία 80/20-70/30,

ο οποίος αποτελεί τη «χρυσή τομή» ποιότητας (επιμήκυνση της διάρκειας ζωής και διατήρηση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (ερυθρή χροιά). Σαν αποτέλεσμα το κρέας καθίσταται περισσότερο ελκυστικό στον καταναλωτή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Όμως, πάρα την επίδραση του CO<sub>2</sub>, η εμπορική διάρκεια ζωής του νωπού χοιρινού σε MAP είναι μικρή λόγω βακτηριακής αλλοίωσης (Nieminen, Dalgaard, & Björkroth, 2016).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τελικά περιορίζεται η ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp., ενώ τα προαιρετικά αναερόβια *B. thermosphacta* και οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τους πιο σημαντικούς μικροοργανισμούς που ανιχνεύονται (Adams & Moss, 2000; Pothakos, Devlieghere, Villani, Björkroth, & Ercolini, 2015). Όσον αφορά το *B. thermosphacta* αναγνωρίζεται ως ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος στο κρέας, αλλά και στα θαλασσινά συντηρημένα σε ενεργό συσκευασία (Papadopoulou et al., 2012; Remenant, Jaffrès, Dousset, Pilet, & Zagorec, 2015). Η ανάπτυξη του ευνοείται από χαμηλά ποσοστά CO<sub>2</sub>, ενώ εμφανίζει μεγάλο επιπολασμό σε όλο το μήκος της τροφικής αλυσίδας, από τις πρώτες ύλες μέχρι το τελικό προϊόν, αλλά και το περιβάλλον της βιομηχανίας (Illikoud et al., 2019; Nychas et al., 2008; Pothakos et al., 2015). Τα οξυγαλακτικά ευθύνονται για την αλλοίωση του κρέατος (χοιρινό, βόειο) σε συνθήκες MAP υψηλού O<sub>2</sub> (Doulgeraki et al., 2011; Nieminen et al., 2016). Αυτά Gram<sup>+</sup> προαιρετικά αναερόβια, διακρίνονται σε είδη ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά. Σε δεδομένες περιβαλλοντικές συνθήκες ο ομοζυμωτικός μεταβολισμός μετατρέπεται σε ετεροζυμωτικό, με αντίστοιχα αποτελέσματα αλλοίωσης (Doulgeraki et al., 2011). Κατά τη δράση τους παράγουν δύσοσμες ουσίες σήψης και όξινο άρωμα (Nychas et al., 2008). Τα πιο συχνά είδη που απαντώνται με ισχυρό δυναμικό αλλοίωσης ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* (*L. gasicomitatum*), *Weissela* (Doulgeraki et al., 2010; Paramithiotis et al., 2009; Pothakos et al., 2015; Pothakos, Snauwaert, De Vos, Huys, & Devlieghere, 2014). Ακόμη, είδη της οικογένειας *Carnobacterium* (*C. divergens*, *C. maltaromaticum*) παρουσιάζουν υψηλό επιπολασμό σε βόειο, χοιρινό, κοτόπουλο, ακόμα και ιστούς ιχθύων συσκευασμένα σε χαμηλά ποσοστά % O<sub>2</sub> προκαλώντας ποικιλία αλλοιώσεων (Afzal et al., 2010; Casaburi et al., 2011; Ercolini et al., 2010; Iulietto, Sechi, Borgogni, & Cenci-Goga, 2015; Laursen, Sørensen, Mortensen, & Sperling-Petersen, 2005; Paludan-Müller, Henrik Huss, & Gram, 1999; Pothakos et al., 2015; Rahkila, Nieminen, Johansson, Säde, & Björkroth, 2012). Τελευταία αναφέρθηκε η παρουσία του *Photobacterium phosphoreum* σε ωμό χοιρινό συντηρημένο σε MAP (Nieminen et al., 2016).

***Κυριότεροι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί στο κρέας – Συσκευασία υπό κενό***

Η συσκευασία υπό κενό (vacuum packaging) αποτελεί βασική προσέγγιση κατά τη μεταφορά και διακίνηση μεγάλων ταμαχίων σφάγιων (bulk). Αντίθετα με την αερόβια συντήρηση, στη συσκευασία υπό κενό αρχικά επικρατούν βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactobacillaceae* και *Pseudomonadaceae* μέχρι τις πρώτες ημέρες της συντήρησης (~4<sup>η</sup>), και όσο αυξάνεται η διάρκεια της επικρατούν τα *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus (Lb.) sakei*, *Lb. fuchuensis* και *Lactobacillus* spp. (Mansur et al., 2019a; Sakala et al., 2002). Όσο παρατείνεται η συντήρηση από τις 7 στις 21 ημέρες αλλάζει η μικροβιακή ποικιλομορφία με την επικράτηση των *Lactococcus (Lc)* sp., *Lc. piscium*, *Lc. raffinolactis*, *Carnobacterium* spp., και *Enterobacteriaceae* (Mansur et al., 2019a; Pothakos et al., 2015; Rahkila et al., 2012; Sakala et al., 2002). Άλλα είδη που απαντώνται συχνά σε κρέας συσκευασμένο υπό κενό ανήκουν στα γένη *Leuconostoc (L.)* και *Weissela* (Doulgeraki et al., 2010; Paramithiotis et al., 2009; Pothakos et al., 2014). Ίσως το σημαντικότερο αλλοιωγόνο είδος στη συσκευασία αυτή είναι ο *L. gasicomitatum* (Bjorkroth et al., 2000) το οποίο ταξινομήθηκε εκ νέου ως *L. gelidum subsp. gasicomitatum*. Τυπικά σημάδια αλλοίωσης από τα *Leuconostoc* spp. είναι ο σχηματισμός δεξτράνης (γλοιώδης ουσία), διόγκωση συσκευασίας (φούσκωμα πακέτων) λόγω παραγωγής CO<sub>2</sub>, όξινες ή/και βουτυρώδεις κακοσμίες, υποπράσινες αποχρώσεις στο ωμό μοσχαρίσιο κρέας, αλλά και υποκίτρινες κηλίδες (κιτρίνισμα) σε Γερμανικά λουκάνικα (Säde, 2011). Τέλος, με χαμηλότερο επιπολασμό, αλλά εξίσου ισχυρό δυναμικό αλλοίωσης απομονώνεται και ο *B. thermosphacta*.

Νεότερες εξελίξεις στον τομέα της συσκευασίας, αποτελούν αντιμικροβιακές εφαρμογές με EDTA (Ferrocino et al., 2013) και συσκευασίες MAP με εκχυλίσματα από πτητικά αλκοολικά διαλύματα (Karpetanakou, Agathaggelou, & Skandamis, 2014) με σκοπό την αναχαίτιση της αλλοιωγόνου χλωρίδας και συνεπώς την απελευθέρωση πτητικών.

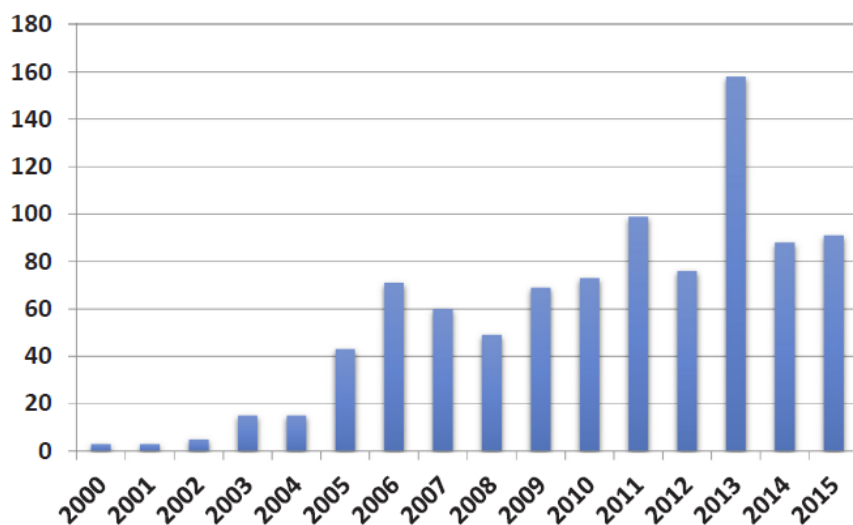
### 1.1.2. Ακεραιότητα των τροφίμων - Αυθεντικότητα

Η υποδομή του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Ασφαλείας των Τροφίμων - EFSA (European Food Safety Authority) με βάση την υπάρχουσα γνώση για τους αναδυόμενους κινδύνους έχει ταξινομήσει την αυθεντικότητα (food authenticity) και νοθεία (food fraud) των τροφίμων ως μεσοπρόθεσμα ζητήματα (“medium-term issues”) λόγω μεσαίων επιπέδων αβεβαιότητας (uncertainty) (EFSA, 2018). Ο όρος «γνησιότητα/αυθεντικότητα» περιγράφει αν τα τρόφιμα που διακινούνται ταιριάζουν με την περιγραφή τους π.χ. επισήμανση, προέλευση (γεωγραφική, βοτανική, μέθοδος παραγωγής, βιολογικά τρόφιμα), επεξεργασίες (π.χ. ακτινοβολία,

κατάψυξη), πιστοποίηση και συμμόρφωση με τα πρότυπα. Εκ των πραγμάτων, συνδέεται με την απάτη/νοθεία, όπου σύμφωνα με τον Elliott, (2014) θεωρείται «έγκλημα», κατά συνέπεια, παραβίαση του γενικού νόμου των τροφίμων (EC 178/2002). Αυτό διότι, δεν αφορά τυχαίες ενέργειες στο πλαίσιο της βιομηχανίας τροφίμων, αλλά συνιστά οργανωμένη κι εσκεμμένη δραστηριότητα που διεξάγεται με σκοπό να εξαπατηθούν οι καταναλωτές (Elliott, 2014).

Παράλληλα υπάρχει ένδειξη για τέτοιες πρακτικές, μιας και μια από τις σημαντικότερες περιπτώσεις που αναφέρονται στο σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης RASSF (Rapid Alert System for Food and Feed; [https://ec.europa.eu/food/safety/rasff\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en)) αφορούν περιστατικά σχετιζόμενα με την απάτη στα τρόφιμα. Οι καταγραφές αυξάνονται σταθερά ετησίως, ενώ εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα κατά τους ελέγχους στα σημεία εισόδου από χώρες εκτός Ε.Ε. (Εικόνα 1.1). Συγκεκριμένα παραδείγματα που καταγράφηκαν τα τελευταία χρόνια συνοψίζονται στο άρθρο-ανασκόπηση των Ellis, Muhamadali, Allen, Elliott, & Goodacre, (2016). Όσον αφορά τον αντίκτυπο τους, εμπίπτουν σε οικονομικά, ποιοτικά, και ζητήματα ασφάλειας (Alamprese, Casale, Sinelli, Lanteri, & Casiraghi, 2013), ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις με άμεση εμπλοκή της δημόσιας υγείας με νοσοκομειακά περιστατικά, ακόμα και θανάτους. Για παράδειγμα στη Νορβηγία μεταξύ 2002–2004, νόθευση οινοπνευματωδών ποτών με μεθανόλη οδήγησε στο θάνατο 9 πολίτες, ενώ 51 οδηγήθηκαν στο νοσοκομείο με δηλητηρίαση από μεθανόλη (Bouzembrak et al., 2018).

Κατά το παρελθόν, το κρέας και προϊόντα του έχουν αποτελέσει πόλο έλξης δόλιων πρακτικών όπου εσκεμμένα είτε “τυχαία”, παρατηρήθηκαν αδήλωτες προσμίξεις άγνωστων και απρόβλεπτων ουσιών (Ruiz Orduna, Husby, Yang, Ghosh, & Beaudry, 2017). Συγκεκριμένα υπολογίζεται ότι το 17.1% των περιπτώσεων νοθείας στα τρόφιμα σχετίζονται με αυτή τη κατηγορία προϊόντων (Bouzembrak et al., 2018). Μια από τις κοινές πρακτικές σε επίπεδο βιομηχανίας είναι η μερική ή/και ολική αντικατάσταση υψηλής εμπορικής αξίας κρεάτων με ύλες μη-ζωικής προέλευσης (π.χ. πρωτεΐνες σόγιας) ή φθηνότερα είδη κρεάτων όπως χοιρινό, άλογο και εντόσθια (Kamruzzaman, Barbin, Elmasry, Sun, & Allen, 2012; Tian, Wang, & Cui, 2013). Συνεπώς η νοθεία στο κρέας μπορεί να προκαλέσει υγειονομικές εκτροπές με δυνητικές αλλεργικές αντιδράσεις σε ορισμένα άτομα (Ballin, 2010). Μπορεί να επιφέρει επίσης κοινωνικά προβλήματα, όπως εθιμικές και θρησκευτικές παραβάσεις ειδικά για τους Εβραίους και τους Μουσουλμάνους οι οποίοι απέχουν της κατανάλωσης χοιρινού (Sakr, 1971 απο (Giaretta, Di Giuseppe, Lippert, Parente, & Di Maro, 2013). Δεδομένου της φύσης τους, οι νοθείες αυτές είναι δύσκολο να αναγνωριστούν από τους καταναλωτές (Cubero-Leon, Peñalver, & Maquet, 2014).



**Εικόνα 1.1:** Ειδοποιήσεις RASSF (άξονας y) κατά τα έτη 2000-2015 σχετικά με την απάτη των τροφίμων (υιοθετήθηκε από Bouzembrak et al., 2018)

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, προσεγγίσεις όπως η πρόληψη ή/και η επιτόπια ανίχνευση τέτοιων περιστατικών θα μπορούσε να διασφαλίσει πιο αυθεντικά τρόφιμα. Όσον αφορά την πρόληψη, μία από τις προτεινόμενες ενέργειες είναι η εξόρυξη τάσεων ή προτύπων από τα δεδομένα, με σκοπό να προσδιοριστούν οι «οδηγοί ασφάλειας τροφίμων» και να χαρακτηρίσουν δυνητικούς ανδυόμενους κινδύνους (emerging risks) (EFSA, 2018). Αναφορικά με τη δεύτερη περίπτωση, εργαλεία που μπορούν να υποστηρίξουν την ανίχνευση και προσδιορισμό της αυθεντικότητας/νοθείας μέσω μοντέλων πρόβλεψης, θα μπορούσαν να αποδειχθούν χρήσιμα στις εκάστοτε Αρχές Ασφάλειας Τροφίμων. Νεότερες προσεγγίσεις βασιζόμενες σε αισθητήρες ή/και ενόργανες αναλυτικές τεχνικές, θα μπορούσαν να αποδώσουν προκαταρκτικά αποτελέσματα σε εύλογο χρονικό διάστημα, ούτως ώστε να στηριχτεί η λήψη αποφάσεων.

### 1.1.3. Βιωσιμότητα πρωτογενούς παραγωγής & Κατανάλωση κρέατος αλόγου

Η επιστημονική κοινότητα έχει διαπίστωσει πως το κρέας ιπποειδών δεν επιφέρει κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή, με την προϋπόθεση ότι τα σφάγια υφίστανται ίδια μεταχείριση με τα υπόλοιπα κόκκινα είδη κρέατος. Τούτο αποτελεί προϋποθέσει πως η αυξανόμενη διατροφική κρίση σε όρους βιωσιμότητας της πρωτογενούς παραγωγής, σε συνδυασμό με την παγκοσμιοποίηση θα επιφέρει αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες και πιθανώς άλλα –όχι τόσο

διαδεδομένα- είδη κρεάτων, θα εισέλθουν δυναμικά στην αγορά. Η εικόνα S1.1. απεικονίζει την κατά κεφαλήν κατανάλωση κρέατος αλόγου.

Θεωρείται εξαιρετικής διατροφικής αξίας (π.χ. χαμηλό ποσοστό λίπους, χοληστερόλη και trans-λιπαρά οξέα, αυξημένα omega-3 λιπαρά οξέα, σίδηρο, και πρωτεΐνες) και διαθέτει μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (π.χ. γλυκειά γεύση) (Belaunzaran et al., 2015; Lorenzo et al., 2017). Περιέχει επίσης υψηλά % σε παλμιτολεϊκό, λινολεϊκό και α-λινολενικό (Lee et al., 2007). Συνεπώς έχει προταθεί πως η κατανάλωση του μπορεί να είναι πιο ευεργετική για την υγεία σε σύγκριση με το μοσχαρίσιο (Badiani, Nanni, Gatta, Tolomelli, & Manfredini, 1997).

Όσον αφορά το κρέας αλόγου καταναλώνεται κυρίως επεξεργασμένο υπό μορφή αλλαντικών και λουκάνικων (Coloretti et al., 2019; Geeraerts, De Vuyst, & Leroy, 2019; Lorenzo et al., 2017), αλλά και ψημένο ή ωμό (“tatar”). Βιβλιογραφικά, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τη δημιουργία της μικροβιακής συσχέτισης, καθώς και τον τύπο αλλοίωσης και την πραγματική εμπορική διάρκεια συντήρησης νωπού κρέατος αλόγου υπό αερόβιες συνθήκες. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως εμπορική διάρκεια ζωής ενός προϊόντος είναι η περίοδος πριν το προϊόν γίνει μη-αποδεκτό προς κατανάλωση από πλευράς ασφάλειας, οργανοληπτικών και διατροφικών χαρακτηριστικών (Labuza & Fu, 1993).

Βιβλιογραφικά, ως τώρα, μόνο η μελέτη των Malti & Amarouch, (2008) παρέχει μικροβιολογικά δεδομένα σχετικά με το κρέας αλόγου, τα οποία είναι μεταξύ του εύρους που ορίζεται από τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό για τα Μικροβιολογικά Κριτήρια (2073/2005 ΕΚ). Ακόμη, η αναφερθείσα μικροβιακή συσχέτιση, είχε παρόμοια σειρά και μέγεθος με εκείνη που βρέθηκε σε αερόβια συντηρημένο μοσχαρί, χοιρινό, αρνί, και κοτόπουλο (Koutsoumanis, Stamatiou, Drosinos, & Nychas, 2008; Nychas et al., 2008). Παράλληλα, οι νέες προσεγγίσεις για τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων και των συστημάτων διαχείρισης ποιότητας προτείνουν μεταβολικές προσεγγίσεις (Nychas, Panagou, & Mohareb, 2016). Πράγματι, η GC/MS και HPLC θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως εργαλεία ανίχνευσης για το ιστορικό (προς τα πίσω ιχνηλάτηση) ή/και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής (προς τα εμπρός ιχνηλάτηση) των τροφίμων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και μπορεί να είναι χρήσιμη ώστε να μειωθούν τα αποβλήτων τροφίμων. Επί του παρόντος, αυτές οι πληροφορίες δεν είναι διαθέσιμες για αερόβια συντηρημένο κρέας αλόγου. Συνεπώς απαιτείται στοχευμένη μελέτη συνδυάζοντας μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις.



## 1.2. Αξιολόγηση της ποιότητας- Συμβατικές Vs “Ταχείες Αναλυτικές Μέθοδοι”

Μια μεγάλη πρόκληση που αντιμετωπίζει η βιομηχανία κρέατος σήμερα, είναι η απόκτηση αξιόπιστων πληροφοριών σχετικά με την ποιότητα των προϊόντων σε ολόκληρη την αλυσίδα των τροφίμων (παραγωγή, διανομή και αποθήκευση) και η μετατροπή αυτών σε συστήματα υποστήριξης αποφάσεων (Damez & Clerjon, 2008). Ως “αξιολόγηση της ποιότητας” του κρέατος περιγράφεται ο «προσδιορισμός των διαφόρων μετρήσιμων χαρακτηριστικών προκειμένου να εκτιμηθεί η καταλληλότητά του προς κατανάλωση και συντήρηση για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα» (Elmasry, Barbin, Sun, & Allen, 2012).

### 1.2.1. Συμβατικές μέθοδοι

Με τον όρο «Συμβατικές Μέθοδοι», αναφερόμαστε σε κλασσικές μεθόδους, κατά κύριο λόγο ISO τεχνικές, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στην ανάλυση της μικροβιολογικής κατάστασης του κρέατος. Μέχρι στιγμής, ο ποιοτικός έλεγχος επισήμως, βασίζεται στην καταμέτρηση ζώντων βακτηρίων της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας, ικανών να αναπτυχθούν σε γενικά υποστρώματα όπως το Plate Count Agar (PCA). Μικροβιολογικά όρια για την πρότυπη αυτή μέθοδο περιγράφονται μόνο για τον κιμά (Πίνακας 1.1) και ολόκληρα σφάγια στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό EC 2073/2005. Στη δεύτερη περίπτωση ορίζεται παράλληλη καταμέτρηση των εντεροβακτηρίων σε πιο εξειδικευμένα υποστρώματα.

**Πίνακας 1.1.:** Μικροβιολογικά Κριτήρια για τον κιμά σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005

Food category	Micro-organisms	Sampling plan (°)		Limits (°)	
		n	c	m	M
2.1.6. Minced meat	Aerobic colony count (°)	5	2	$5 \times 10^5$ cfu/g	$5 \times 10^6$ cfu/g

Όμως, η πολυπλοκότητα των μεθόδων, η ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό και η καθυστέρηση λήψης των αποτελεσμάτων (ετεροχρονισμένα αποτελέσματα μετά από επώαση τρυβλίων για 48-72 ώρες) προς επιστημονική στήριξη αποφάσεων, τις καθιστούν απαρχαιωμένες και δύσχρηστες (Klein, Breuch, von der Mark, Wickleder, & Kaul, 2019; Mohareb, Papadopoulou, Panagou, Nychas, & Bessant, 2016; George John E. Nychas, Panagou, & Mohareb, 2016; Pothakos et al., 2015). Αυτό διότι, η καταμέτρηση αποικιών δεν

αντικατοπτρίζει πάντα την πραγματικότητα, διότι τα επίπεδα των βακτηρίων μπορούν να παραμένουν στα μέγιστα επίπεδα τους για ακανόνιστες χρονικές περιόδους πριν την μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Dainty, 1996; Leistner & Gorris, 1995; Pothakos, Samarundo, & Devlieghere, 2012; Skandamis & Nychas, 2002). Ακόμη, τα αποτελέσματα μπορεί να υποεκτιμούν την μικροβιακή συμμετοχή στην ποιότητα του κρέατος, επειδή δεν λαμβάνεται υπόψιν η συμβολή ορισμένων μικροβιακών ειδών/γενών, τα οποία μέσω της ανάπτυξης τους παράγουν βιοδείκτες-κλειδιά, δηλαδή ουσίες σχετιζόμενες με την αλλοίωση.

Εξέλιξη της κλασικής μικροβιολογίας αποτελούν οι μοριακές μέθοδοι, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε μεγάλη κλίμακα κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς. Τα τελευταία χρόνια αιχμή του δόρατος σε αυτές αποτελεί η ομική γονιδιωματική (Genomics) μέθοδος της “αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος” (Whole Genome Sequencing-WGS) που συνδέεται με την κλιμακούμενη και ευέλικτη τεχνολογία NGS. Η τεχνολογία αυτή κατάφερε να ξεπεράσει ορισμένες αδυναμίες στις τρέχουσες μεθόδους, όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (PFGE), επιτρέποντας τη βελτίωση της ανίχνευσης εστιασμένων βακτηρίων (Xu, 2017). Όμως τα αποτελέσματα μπορεί να είναι παραπλανητικά, καθώς οι τεχνικές αυτές επικεντρώνονται μέχρι στιγμής περισσότερο στους παθογόνους (Pothakos et al., 2015). Η οργανοληπτική αξιολόγηση μέσω ειδικών panel (sensory panels) έχει επίσης προταθεί ως μέθοδος ποιοτικού ελέγχου. Όμως και αυτή υστερεί, διότι μπορεί να είναι υποκειμενική καθώς είναι δύσκολο να αποδοθούν ουσιαστικά οργανοληπτικά κριτήρια που διαφοροποιούν το αποδεκτό από μη αποδεκτό κρέας (Nieminen et al., 2016).

### 1.2.2. Νεότερες εξελίξεις

Οι ανάγκες της βιομηχανίας τροφίμων και οι ευθύνες των Αρχών να παρακολουθούν και ελέγχουν πρώτες ύλες και τελικά προϊόντα σε εύλογο χρονικό διάστημα είναι αναγκαίες υψηλής προτεραιότητας (Tamplin, 2018). Ταχείες ανοσολογικές μέθοδοι, ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων, βιοαισθητήρες, βακτηριοφάγοι, ανοσομαγνητικός διαχωρισμός ακολουθούμενος από ανίχνευση βιοφωταύγειας, αυτοματοποιημένα βιοχημικά kits αποτελούν αναδυόμενες εφαρμογές αξιολόγησης της ποιότητας και ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών (Doulgeraki, Panagou, & Nychas, 2016). Ήδη για την υποστήριξη του HACCP εφαρμόζονται μικροσκοπία, βιοφωταύγεια της ATP (Champiat, Matas, Monfort, & Fraass, 2001). Τέλος νεότερες εφαρμογές της ψηφιακής τεχνολογίας (π.χ. barcodes, ετικέτες ραδιοσυχνότητας (RFID), ασύρματα δίκτυα) χρησιμοποιούνται με σκοπό να αναπτύξουν

εξειδικευμένα συστήματα ιχνηλασιμότητας (Regattieri, Gamberi, & Manzini, 2007). Πρόσφατα έχει αναφερθεί η εισαγωγή των αισθητήρων (χρόνο-Θερμοκρασιακοί δείκτες-TTI, καταγραφείς δεδομένων-data loggers) επί της αλυσίδας τροφίμων με σκοπό τον έλεγχο της ακεραιότητας της (Tamplin, 2018).

### **1.2.3. Προρρητική μικροβιολογία (Predictive Microbiology)**

Παρακλάδι της κλασσικής μικροβιολογίας αποτελεί η προρρητική, κατά την οποία περιγράφεται συγκεντρωτικά (ποσοτικοποίηση και πρόβλεψη) η μικροβιακή συμπεριφορά (McMeekin, 1993; McMeekin et al., 1997; Oscar, 2005; Tamplin, 2018). Η διαδικασία υποστηρίζεται στον Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1999) παροτρύνοντας προσεγγίσεις βασισμένες στο ρίσκο (risk-based) ή/και σε μετρήσιμες τιμές (“metrics”) αντικαθιστώντας εμμέσως την προσέγγιση του HACCP. Βασίζεται στο γεγονός ότι οι αποκρίσεις των μικροοργανισμών σε διαφόρους περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι αναπαραγώγιμες, και επιτρέπουν ακολουθώντας αυτούς τους περιορισμούς, να προβλέψουμε τη συμπεριφορά τους βάσει προηγούμενων παρατηρήσεων σε παρόμοιες συνθήκες (Ross & McMeekin, 1994) και συνεπώς την εμπορική διάρκεια ζωής των υπό έλεγχο τροφίμων (shelf-life) (Dalgaard, 1995).

Τα μοντέλα μπορεί να είναι πρωτογενή (primary), δευτερογενή (secondary), ή ακόμα και τριτογενή (tertiary). Τα πρώτα εκφράζουν τη μικροβιακή εξέλιξη συναρτήσει του χρόνου, τα δεύτερα τις κινητικές παραμέτρους των μικροοργανισμών συναρτήσει περιβαλλοντικών παραγόντων, και τέλος τα τριτογενή ολοκληρώνουν τα πρωτογενή και τα δευτερογενή μέσω λογισμικών προγραμμάτων. Η εφαρμογή τους είναι χρήσιμη ώστε να υποστηριχτεί επιστημονικά η λήψη της απόφασης, να βελτιωθεί η δημόσια υγεία, να μειωθούν τα απόβλητα τροφίμων αλλά και να μετριαστούν οι οικονομικές απώλειες (Tamplin, 2018).

### **1.2.4. Ταχείες αναλυτικές μέθοδοι**

Η νέα εποπτεία και μέθοδοι ποιοτικού ελέγχου απαιτούν «ταχείες» μεθόδους, οι οποίες εναλλακτικά και σε εύλογο χρονικό διάστημα μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το ιστορικό των τροφίμων. Η προσέγγιση τους (παρεμβατικές ή μη-) στηρίζεται στη θεωρία ότι κάθε προϊόν σε δεδομένη χρονική στιγμή έχει ένα μοναδικό «αποτύπωμα». Οι μεθοδολογίες αυτές βασίζονται σε σήματα ή αποκρίσεις αισθητήρων (Adebo, Njobeh, Adebisi, Gbashi, &

Kayitesi, 2017; Ghasemi-Varnamkhasti, Apetrei, Lozano, & Anyogu, 2018; George John E. Nychas et al., 2016). Το αποτύπωμα διαμορφώνεται κατά κύριο λόγο είτε από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών κατά τη συντήρηση, είτε λόγω άλλων συνδυαστικών παραγόντων, όπως π.χ. οξείδωση. Παρ' όλο που τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες σύνδεσης των μεταβολιτών και σημάτων με την (μικροβιακή) αλλοίωση του κρέατος, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα μία ενιαία μέθοδος για την αξιολόγηση της ποιότητας του (Nychas, Panagou, Mohareb, 2016). Αυτό οφείλεται στην έλλειψη καθολικής συμφωνίας σχετικά με τη μεταβολή της ποιότητας του κρέατος και των προϊόντων του. Επιπλέον, οι περισσότερες από τις προτεινόμενες μεθόδους είναι πολύπλοκες, ενώ οι αλλαγές στον τρόπο της συντήρησης (π.χ. συσκευασία κενού, ενεργός συσκευασία κλπ.) επηρεάζουν την εφαρμογή της επιλεγμένης μεθοδολογίας.

Κατά το παρελθόν έχουν προταθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι οι οποίες συσχετίζουν τις χημικές αλλαγές με τη μικροβιακή ανάπτυξη. Οι κυριότερες ταχείες μέθοδοι για τη μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων συνοψίζονται στο πρόσφατο άρθρο-ανασκόπηση (Doulgeraki et al., 2016). Συγκεκριμένα παραδείγματα αφορούν η μικροσκοπία επιφθορισμού, ηλεκτρική αντίσταση (Dainty, 1996; Dunstall, Rowe, Wisdom, & Kilpatrick, 2005), σπεκτροφωτομετρικές μετρήσεις (Seymour et al., 1993). Έχει προταθεί επίσης σύστημα ηλεκτροδίων οξυγόνου χωρίς κάλυψη μεμβράνης (Dainty, 1996), το Malthus και το RABIT αξιοποιώντας την αγωγιμότητα ή/και αντίσταση ηλεκτροδίων πλατίνας (Nychas et al., 2009).

Με την είσοδο στο νέο αιώνα εντείνονται οι προσπάθειες αξιολόγησης της ποιότητας του κρέατος, με μεθόδους βασισμένες στη φασματοσκοπία δόνησης (vibrational spectroscopy) (FTIR, RAMAN) (Argyri et al., 2010; Ellis, Broadhurst, Kell, Rowland, & Goodacre, 2002; Estelles-Lopez et al., 2017; Fengou et al., 2019; Klein et al., 2019; Panagou, Mohareb, Argyri, Bessant, & Nychas, 2011), οι οποίες υποστηρίζονται από στοχευμένες και μη- τεχνικές ανάλυσης των δεδομένων. Τελευταίες εξελίξεις αποτελούν, οι οπτικές μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στην εξόρυξη της επιφανειακής χημείας, όπως η υπερφασματική (Hyperspectral) (Kamruzzaman et al., 2012) και πολυφασματική (multispectral) (Dissing et al., 2013; Estelles-Lopez et al., 2017; Fengou et al., 2019; Panagou, Papadopoulou, Carstensen, & Nychas, 2014; Tsakanikas, Pavlidis, Panagou, & Nychas, 2016) ανάλυση της εικόνας. Τέλος, έχουν προταθεί μεταβολομικές προσεγγίσεις, οι οποίες θα περιγραφούν στις επόμενες ενότητες. Στον Πίνακα 1.2 συνοψίζονται οι κυριότερες εκ των “ταχέων” μεθόδων οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στον τομέα του κρέατος, καθώς επίσης τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τους.

Μεταξύ των ταχέων μεθόδων οι μεταβολομικές έχουν κερδίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον και αναγνωρισιμότητα (Adebo et al., 2017; Xu, 2017). Για παράδειγμα οι μεθοδολογίες HS/SPME-GC/MS και HPLC, έχουν αποδειχτεί κατάλληλες για τον έλεγχο της μικροβιολογικής κατάσταση του κρέατος. Παρ' όλα αυτά είναι δύσκολο να εισαχθούν στη βιομηχανία κρέατος λόγω του υψηλού κόστους, συντήρησης και μεγέθους (Estelles-Lopez et al., 2017).

Ωστόσο, ζητήματα όπως η συμβολή των μικροοργανισμών στη δημιουργία του πτητικού προφίλ καθώς επίσης η αξιολόγηση της δυναμική της αλλοίωσης διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών σε διαφορετικές μήτρες τροφίμων και περιβαλλοντικές συνθήκες πρέπει ακόμη να διερευνηθούν. Αυτή η πληροφορία μπορεί να είναι απαραίτητη για τον χειρισμό της μόλυνσης από τέτοια είδη ούτως ώστε να αποτρέψουμε την ανάπτυξη τους καθώς επίσης και τη μεταβολική τους δραστηριότητα χρησιμοποιώντας τις πιο κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης. Εκτός αυτού, μαθηματικά μοντέλα τα οποία προέρχονται από υπολογιστικό νέφος (clouds), και βασίζονται σε ενημερωτικές πτητικές ενώσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη αισθητήρων βασισμένα σε αυτά, οι οποίοι θα μπορούσαν να είναι πιο ευέλικτοι και εύκολοι στη λειτουργία. Θα πρέπει να διερευνηθούν επίσης τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούνται κατά τη συντήρηση, ούτως ώστε να μπορέσουμε να ελέγξουμε. Η ανάλυση της μεταβολικής οδού (pathway analysis) είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ των μεταβολιτών καθώς επίσης ο ρόλος αυτών στο κρέας κατά τη συντήρηση και διανομή (Huang et al., 2020)

**Πίνακας 1.2.:** Συγκριτική απεικόνιση μεθόδων που εφαρμόζονται στην ανάλυση των τροφίμων

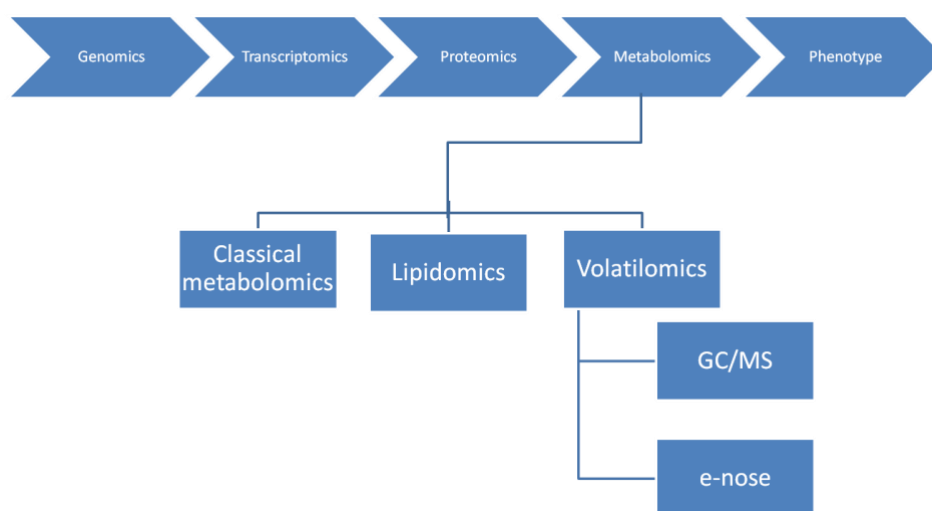
Μέθοδος	Αποτελέσματα Ανάλυσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογή
Μικροβιολογική Ανάλυση	48-72 hrs	ISO, Χαμηλό κόστος	Ετεροχρονισμένα αποτελέσματα	ISO, τήρηση νομοθεσίας
Βιοφωταύγεια ATP	<2 λεπτά	Επιφάνειες, χαμηλό κόστος	Επιφάνειες	Επιφάνειες
TTI	Ανάλογα το προϊόν	Real-time, πολύ χαμηλό κόστος	Σύνδεση μόνο με τη θερμοκρασία	Real-time
FT-IR	30 min	Εύκολο στη χρήση	Υψηλό κόστος εγκατάστασης, Συνήθως τα λογισμικά δε συνοδεύονται από μοντέλα που να ταξινομούν αυτόματα το δείγμα.	Εργαστηριακό επίπεδο, στο πεδίο
Hyperspectral imaging	~5 min	Υψηλή συσχέτιση	Επιφανειακή χημεία, υψηλό κόστος εγκατάστασης, άδεια/έτος, μη-διαθέσιμα δεδομένα και μοντέλα	On-/at-line
Multispectral imaging	~5 min	Υψηλή συσχέτιση	Επιφανειακή χημεία, υψηλό κόστος εγκατάστασης, άδεια/έτος, μη-διαθέσιμα δεδομένα και μοντέλα	On-/at-line
RAMAN	~5 min	Υψηλή συσχέτιση	Επιφανειακή χημεία, μη-διαθέσιμα δεδομένα και μοντέλα πρόβλεψης	On-/at-line
NIR	~5 min	Ταχεία αποτελέσματα, μη-παρεμβατική, φορητό	Επιφανειακή χημεία	On-/at-line
HPLC	~2 hrs	Πολλαπλά δείγματα, σχετικά χαμηλό	Όγκος	Off-line,
GC/MS	~2 hrs	Ταχεία αποτελέσματα, Στοχευμένη και μη-ανάλυση	Όγκος, Υψηλό κόστος εγκατάστασης, μη-διαθέσιμα μοντέλα	Off-line, in-/at-line, Sensor-based
Ηλεκτρονική μύτη	30 min	Εύκολη στη χρήση, γρήγορα αποτελέσματα, cloud	Υψηλό κόστος εγκατάστασης, αναλώσιμα	Off-line, in-/at-line, Sensor-based

### 1.2.5. Μεταβολομικές μέθοδοι

Αδιαμφισβήτητα τα τελευταία χρόνια, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν η εποχή των “*omics*”, δηλαδή των τεχνολογιών μεγάλης κλίμακας, οι οποίες παράγουν μεγάλο όγκο δεδομένων.

Ανάλογα με το πεδίο που εφαρμόζονται έχουν και την αντίστοιχη ονομασία, με τον “*foodomics*” να αναφέρεται στην γενική προσέγγιση στα τρόφιμα (Cifuentes, 2009). Αντίστοιχα η εφαρμογή σε τρόφιμα υψηλής γαστρονομίας θα μπορούσε να περιγραφεί ως “*gastronomics*”.

Η αλληλουχία και συσχέτιση τους απεικονίζεται στην Εικόνα 1.2. Ο όρος *genomics* χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει το γονιδίωμα (*genome*), *transcriptomics* το σύνολο των μεταγραφών σε ένα στάδιο (*transcriptome*), *proteomics* για τη μελέτη μεγάλης κλίμακας πρωτεϊνών (*proteome*). Η ανάλυση των πολλαπλών εξωγενών, και ενδογενών μεταβολιτών (*metabolome*) σε ένα βιολογικό σύστημα (π.χ. κρέας) ή σε ένα κύτταρο και η διερεύνηση των μεταβολικών οδών τους χαρακτηρίζεται πλέον ως μεταβολομική (*metabolomics*) (Cubero-Leon et al., 2014; Newsholme, 2016). Ανάλογα με τη φύση των μεταβολιτών διακλαδίζονται οι επιμέρους τεχνικές (Εικόνα 1.2). Παραδείγματος χάριν, κλασσικές μεταβολομικές (*classical metabolomics*) προσεγγίσεις αφορούν εκχυλίσεις ανόργανου κλάσματος από τη μήτρα του τροφίμου, ενώ η μελέτη μεγάλης κλίμακας μεταβολικών οδών και δικτύων των κυτταρικών λιπιδίων σε βιολογικά συστήματα, καλείται *lipidomics* (Wenk, 2005). Πρόσφατα εισήχθηκε ο όρος “*volatilome*” για να περιγράψει την ανάλυση του πτητικού προφίλ ενός δείγματος. Συνεπώς, με βάση τα προηγούμενα, χρησιμοποιήθηκε η ορολογία “*volatilomics*” με σκοπό να περιγράψει τη μεγάλης-κλίμακας διερεύνηση και ερμηνεία πτητικών μεταβολιτών και βιοχημικών μονοπατιών σε βιολογικά συστήματα.



**Εικόνα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση των omics τεχνολογιών στον τομέα των τροφίμων (“*Foodomics*”)

Μια ερευνητική ματιά στο μεταβολικό προφίλ των τροφίμων θα μπορούσε να αποδώσει τη μικροβιολογική κατάσταση σε σήματα ή/και πρότυπα/μοτίβα τα οποία σχετίζονται με την προέλευση του προϊόντος (Nychas et al., 2008). Παράλληλα, η περαιτέρω ανάλυση του προφίλ και η στοχευμένη συσχέτιση μεταβολιτών με διαφορετικές κλάσεις ποιότητας, οδηγεί στην απόδοση βιοδεικτών (Ellis et al., 2002). Τα ακόλουθα κριτήρια (Jay, 1986) προσδιορίζουν μια δυνητική ουσία ως τον πλέον ιδανικό βιο-δείκτη (μικροβιακό στην περίπτωση της αλλοίωσης): (i) να είναι απών ή τουλάχιστον να ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα στο κρέας, (ii) να αυξάνεται κατά την αποθήκευση, (iii) να παράγεται από την κυρίαρχη μικροχλωρίδα και να έχει άμεση και ικανή συσχέτιση με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αντίστοιχα, βιοδείκτες αυθεντικότητας, θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι μοναδικές σε ένα συγκεκριμένο είδος ή/και εκείνες των οποίων ο συνδυασμός (γραμμικός ή μη-) οδηγεί σε μια συγκεκριμένη κατηγορία προϊόντος.

Πληθώρα μεταβολομικών αναλυτικών τεχνικών αναδύεται από τη βιβλιογραφία. Η NMR φασματοσκοπία (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός) λειτουργεί καλά στην ποσοτική ανάλυση και δεν απαιτεί επιπλέον βήματα για την προετοιμασία του δείγματος (π.χ. διαχωρισμός, παραγωγοποίηση). Πιθανότατα λόγω της χαμηλής ευαισθησίας απαντάται σε μία μόνο μελέτη αξιολόγησης της αλλοίωσης του κρέατος (Ercolini et al., 2011). Όμως, χρησιμοποιείται κατά κόρον ως μέθοδος ελέγχου της αυθεντικότητας, επειδή παρουσιάζει αναλυτική σταθερότητα και διότι σε αυτό το ερευνητικό ερώτημα δεν ενδιαφέρουν οι στοχευμένοι μεταβολίτες, αλλά το σύνολο του προφίλ μέσω μη-στοχευμένων τεχνικών ανάλυσης δεδομένων (untargeted analysis). Αντίθετα η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) παρέχει υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα. Ευρύ φάσμα μεθοδολογιών συνδεδεμένες σε MS (Purge and Trap, PTR-MS, δευτερογενής ηλεκτροψεκασμός, SIFT-MS, GC-MS, GC-TOF/MS, SPME-GC/MS) (Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2018). Άλλες εφαρμογές αφορούν χρήση LC-MS (υγρή χρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας) για ανίχνευση δευτερογενών μεταβολιτών (π.χ. μυκοτοξίνες) ή/και τοξινών οι οποίες έχουν απελευθερωθεί στο εξωκυτταρικό περιβάλλον μικροοργανισμών (Xu, 2017).

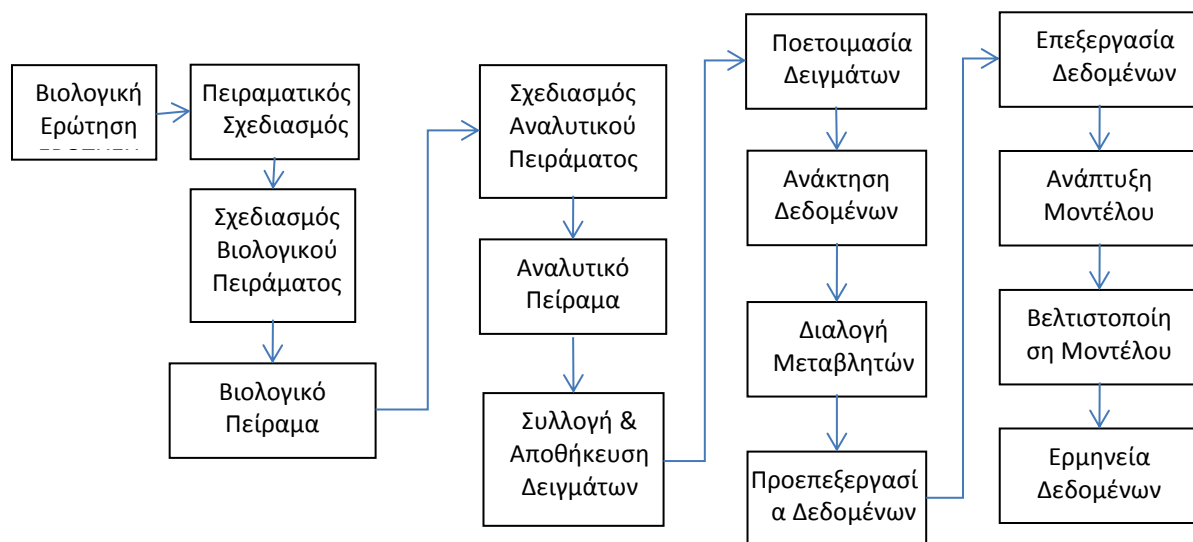
#### **1.2.3.2.1. Αέρια Χρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή Φασματομετρίας Μάζας (GC/MS)**

Η GC/MS αποτελούν δυο επιμέρους αναλυτικές τεχνικές συζευγμένες. Μέσω της ανάλυσης του πτητικού και ημι-πτητικού κλάσματος του βιολογικού δείγματος επιτρέπει τη λήψη ενός



χαρακτηριστικού φάσματος που ονομάζεται "υπογραφή" ή "φασματικό αποτύπωμα" (Cubero-Leon et al., 2014). Παράλληλα η μικροεκχύλιση στερεής φάσης αέριου υπερκεείμενου χώρου (HS-SPME) έχει αποδειχτεί σχετικά φθηνή, γρήγορη, απλή και βολική μέθοδος απομόνωσης αναλυτών πτητικών (Bueno, Resconi, Campo, Ferreira, & Escudero, 2019; Lin et al., 2013; Zini, Augusto, Christensen, Caramão, & Pawliszyn, 2002). Συνεπώς ο συνδυασμός GC/MS με HS/SPME αποτελεί μια διαχειρίσιμη, βιώσιμη, και αποτελεσματική μέθοδο αξιολόγησης του πτητικού προφίλ των τροφίμων. Στην Εικόνα 1.3 περιγράφεται η ροή εργασιών για τα μεταβολομικά πειράματα, στα οποία είναι καίριας σημασίας το ερώτημα που θέτουμε, όπως και ένας καλά ορισμένος σκοπός της μελέτης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε σε αυτή τη διατριβή είναι τυπική μεταβολομικών πειραμάτων (Εικόνα 1.3).

Κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής διαπιστώνεται πως έχει χρησιμοποιηθεί για διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ σε προϊόντα φυτικής (Cubero-Leon et al., 2014; Lin et al., 2013; Olegário et al., 2019; Soncin, Chiesa, Cantoni, & Biondi, 2007a) και ζωικής προέλευσης (Argyri et al., 2015; Casaburi et al., 2015; Insausti, Beriain, Gorraiz, & Purroy, 2002; Insausti, Goñi, Petri, Gorraiz, & Beriain, 2005; Nychas et al., 2008; Parlapani, Mallouchos, Haroutounian, & Boziaris, 2014; Q. Wang et al., 2019).



**Εικόνα 1.3:** Ροή εργασιών που ακολουθήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή

Δεδομένης της μικροβιολογικής σπουδαιότητας, σε συνδυασμό με την οργανοληπτική απόρριψη, εκπτύσσεται στη βιβλιογραφία ένα ευρύ φάσμα μελετών σχετικά με τη διερεύνηση της συμμετοχής της αλλοιωγόνου χλωρίδας στη δημιουργία του πτητικού προφίλ, αλλά και στην εξόρυξη δεικτών αλλοίωσης (Πίνακας 1.3). Η συνήθης προσέγγιση είναι η ανάλυση του τροφίμου λαμβάνοντας υπόψιν την προυπάρχουσα μικροχλωρίδα ή η χρήση EAM (Ειδικών

Αλλοιωγόνων Μικροοργανισμών) μέσω εμβολιασμών σε μυϊκό ιστό απαλαγμένο βακτηρίων (“στείρος”). Όπως προκύπτει, οι περισσότερες εξ’ αυτών είναι ποιοτικές έρευνες, λαμβάνοντας υπόψιν το αρχικό και το τελικό σημείο της συντήρησης με ένδειξη παρουσίας/απουσίας (+/-) των ουσιών με βιολογική σημασία. Εκτός αυτού, οι κυριότεροι μεταβολίτες που ανιχνεύονται, παράγονται όταν οι μικροοργανισμοί είναι ήδη σε υψηλά επίπεδα και υπάρχουν ορατά σημάδια αλλοίωσης. Συνεπώς υπάρχει βιβλιογραφικό κενό για τα ενδιάμεσα στάδια, δηλαδή μια ποσοτική αξιολόγηση της χρονικής εξέλιξης του πτητικού προφίλ. Οι δυο περιπτώσεις υστερούν, διότι η πρώτη λαμβάνει υπόψιν και άλλες φυσικοχημικές διεργασίες (π.χ. οξείδωση) που συμβαίνουν ταυτόχρονα στο κρέας κατά τη συντήρηση, ενώ η δεύτερη διότι χρησιμοποιεί ποιοτικά μεγέθη και παραλείπει την πληροφορία του ενδιαμέσου. Εξαίρεση στην παραπάνω προσέγγιση αποτελεί η πρόσφατη μελέτη από τους Papadopoulou et al., (2020) στην οποία αξιολογήθηκε η δυναμική της αλλοίωσης στελεχών ψευδομονάδων και *Lb. sakei* σε στείρα χοιρινά φιλέτα.

Επιπλέον, η GC/MS έχει εφαρμοστεί για την αξιολόγηση της ποιότητας σε διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας στο βόειο κρέας (Dainty et al., 1988, Ercolini, et al., 2006; 2009; 2010, Argyri et al., 2015; Lyte et al, 2016; Mansur et al., 2019; Pavlidis et al., 2019), χοιρινό (Xu, Cheung, Winder, & Goodacre, 2010; Xu et al., 2013), κοτόπουλο (Lytou et al., 2018 ), αρνί (Reis, Reis, Mills, Ross, & Brightwell, 2016), ψάρια (Parlapani et al., 2014; Parlapani, Haroutounian, Nychas, Boziaris, 2015), και ποικιλία βατόμουρων (Cappellin et al., 2013).

**Πίνακας 1.3:** Διερεύνηση της συμμετοχής ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στην αλλοίωση ζωικών τροφίμων

Μικροβιακή ομάδα	Υπόστρωμα	Σκοπός	Αναφορά
<i>Ps. perolens</i>	Sterile Fish, rockfish	Ποιοτική, +/-	Miller et al., 1979
<i>Br. Thermosphacta</i>	NC beef		Dainty et al., 1980
<i>Ps. fragi a</i>	Sterile beef	Ποιοτική, +/-	Edwards et al., 1987
<i>Ps. fluorescens biotype 1</i>	Sterile beef	Ποιοτική, +/-	Edwards et al., 1987
<i>Pseudomonas sp.</i>	Beef & Pork slices	Ποιοτική, κινητικές	de Castro et al., 1988
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989
<i>Alteromonas putrefaciens</i>	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989
<i>Br. Thermosphacta</i>	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989
<i>Hafnia alvei</i>	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989

<i>Pseudomonas fragi</i>	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989
<i>Serratia liquefaciens</i>	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989
TVC	Beef sterile (low&high pH)	Ποιοτική, +/-	Dainty et al., 1989
<i>Lactobacillus sp.</i>	Beef fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Tsigarida & Nychas, 2001
<i>Pseudomonas sp.</i>	Beef fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Tsigarida & Nychas, 2001
<i>S. proteamaculans</i>	Beef chops, sterile	Ποιοτική, +/-	Ercolini et al., 2009
<i>C. divergens</i>	Beef chops, sterile	Ποιοτική, +/-	Ercolini et al., 2009
<i>P. fragi</i>	Beef chops, sterile	Ποιοτική, +/-	Ercolini et al., 2009
<i>S. proteamaculans</i> & <i>C. divergens</i> & <i>Ps. fragi</i>	Beef chops, sterile	Ποιοτική, +/-	Ercolini et al., 2009
<i>Pseudomonas fragi</i>	Beef, sterile	Ποιοτική, +/-	Ercolini et al., 2010
TVC	Beef chops, nc	Ποιοτική, Ποσοτική	Ercolini et al., 2011
<i>Ps. fragi</i>	Pork fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Papadopoulou et al., 2020
<i>Ps. putida</i>	Pork fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Papadopoulou et al., 2020
<i>Ps. fragi</i> & <i>Ps. putida</i>	Pork fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Papadopoulou et al., 2020
<i>Lb. sakei</i>	Pork fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Papadopoulou et al., 2020
<i>Leuconostoc (Lc.) mesenteroides</i>	Pork fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Papadopoulou et al., 2020
<i>Lb. sakei</i> & <i>Lc. Mesenteroides</i>	Pork fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Papadopoulou et al., 2020
<i>Ps. fragi</i> & <i>Ps. putida</i> & & <i>Lb. sakei</i> & <i>Lc. Mesenteroides</i>	Pork fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	Papadopoulou et al., 2020
<i>Pseudomonas sp.</i>	Fish, gutted sea bream	Ποιοτική, κινητικές	Parlapani, et al., 2015
TVC, Spoilers	Beef minced, nc	Ποιοτική, κινητικές & Ποσοτική	Argyri et al., 2011; 2015
Photobacterium phosphoreum	Pork (loin, colar)	Ποιοτική & Ποσοτική	Nieminen et al., 2016
<i>Pseudomonas</i>	Fish, model	Ποιοτική, κινητικές	Parlapani, et al., 2017
<i>Shewanella</i>	Fish, model	Ποιοτική, κινητικές	Parlapani, et al., 2017
<i>Carnobacterium</i>	Fish, model	Ποιοτική, κινητικές	Parlapani, et al., 2017
<i>Lactobacillus</i>	Fish, model	Ποιοτική, κινητικές	Parlapani, et al., 2017
TVC	Chicken breast, nc	Ποιοτική, κινητικές	Kein et a., 2018
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Chicken breast, nc	Ποιοτική, κινητικές	Kein et a., 2018
<i>Escherichia coli</i>	Chicken breast, nc	Ποιοτική, κινητικές	Kein et a., 2018
TVC	Chicken breast, nc	Ποιοτική, Ποσοτική & Quantitative	Lytou et al., 2018
TVC	Beef fillets, nc & s	Ποιοτική, Ποσοτική, Κινητικές	PhD
TVC, Spoilers	Beef minced, nc	Ποιοτική, Ποσοτική & Quantitative	PhD

<i>Hafnia alvei</i>	Beef, fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	PhD
<i>Serratia proteomaculans</i>	Beef, fillets, sterile	Ποιοτική, κινητικές	PhD

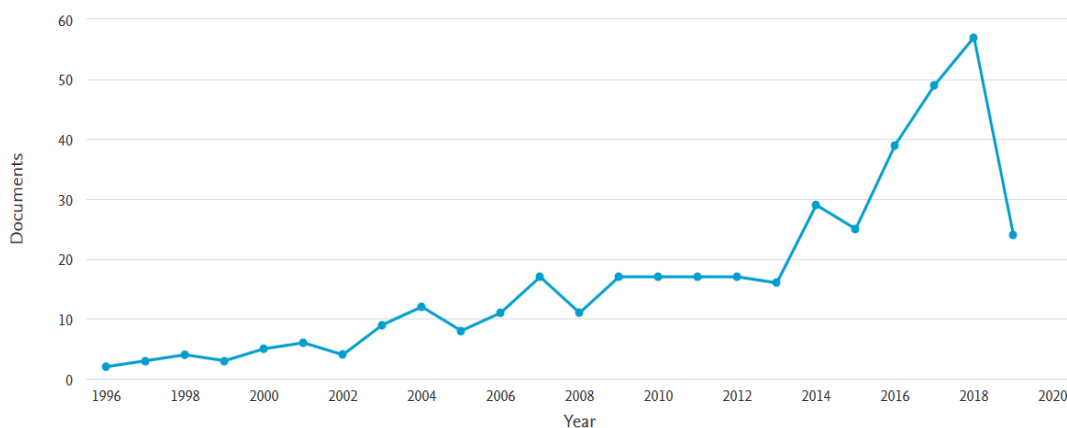
#### 1.2.3.2.2. Ηλεκτρονική μύτη (Electronic nose - enose)

Προσφάτως έχουν προταθεί μεταβολομικές μέθοδοι βασισμένες σε αισθητήρες, όπως η ηλεκτρονική μύτη (electronic nose, EN) και «γλώσσα» (electronic tongue). Αυτές προσομοιάζουν τα χαρακτηριστικά της μύτης και γλώσσας των θηλαστικών αντίστοιχα, οι οποίες είναι παραπλήσιες με των ανθρώπων (Peris & Escuder-Gilabert, 2009). Κατά τη διαδικασία της όσφρησης, οι διάφορες οσμές αλληλεπιδρούν με τους κατάλληλους χημειοαισθητήριους υποδοχείς και παράγουν ηλεκτρικά ερεθίσματα τα οποία μεταδίδονται στον εγκέφαλο (Ampuero & Bosset, 2003). Κατά τον ίδιο τρόπο, η ανάλυση του πτητικού προφίλ μέσω της EN βασίζεται στην διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross-reactivity) μιας σειράς ημι-επιλεκτικών αισθητήρων.

Οι πλέον διαδεδομένοι αισθητήρες ημιαγωγής M.O.S. αποτελούνται από ένα ημιαγωγικό φιλμ μεταλλικών οξειδίων (π.χ. SnO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, ZrO<sub>2</sub>, βολφράμιο) επικαλυμμένο σε ένα κεραμικό υπόστρωμα (πχ. Αλουμίνα). Τα οξειδωτικά υλικά του αισθητήρα απορροφούν το οξυγόνο, του οποίου η αντίδραση με τα πτητικά μόρια μεταβάλλει την αγωγιμότητα του οξειδίου (Peris & Escuder-Gilabert, 2009). Σε αυτή την ιδιότητα βασίζεται και η ανάλυση των δειγμάτων, με μετρήσεις της αντίστασης κάθε αισθητήρα στο χρόνο. Άλλα συστήματα, μετρούν τη τάση ως μετασχηματισμό εισόδου, μετρώντας την αγωγιμότητα της αέριας φάσης όταν αυτή διέρχεται από κάθε αισθητήρα ανά δευτερόλεπτο της μέτρησης. Οι M.O.S. παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, καλή εκλεκτικότητα, ενώ είναι σχετικά ανθεκτικοί στην υγρασία και την «γήρανση», διότι κατασκευάζονται από ιδιαίτερα ανθεκτικά μέταλλα. Κατά συνέπεια μακροπρόθεσμα παρέχουν σταθερότητα της βάσης δεδομένων.

Η διαδικασία ανάλυσης με EN, είναι σχετικά απλή και περιλαμβάνει το στάδιο προεργασίας, ανάλυσης του δείγματος με λήψη πρωτογενών δεδομένων του τροφίμου και τέλος την επεξεργασία του σήματος. Οι αποκρίσεις των αισθητήρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πτητικά μοτίβα μίας ομάδας βιολογικών ουσιών, τα οποία μεταφέρουν πληροφορίες για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Τέλος, η ανάλυση των αποτελεσμάτων περιλαμβάνει την περαιτέρω αξιολόγηση του δείγματος μέσω πολυμεταβλητής στατιστικής. Συγκριτικά με τα πάνελ οργανοληπτικής αξιολόγησης το βασικό τους πλεονέκτημα είναι πως μετά την αρχική τους βαθμονόμηση μπορούν να πραγματοποιήσουν αξιολόγηση του πτητικού προφίλ σε συνεχή

βάση και με ελάχιστο κόστος (Ampuero & Bosset, 2003). Δεδομένου ότι η χρήση τους παρέχει υψηλής συσχέτισης αποτελέσματα, σε σύντομο χρονικό διάστημα (<1ώρα), έχουν προταθεί ως μέθοδος μικροβιακής ανίχνευσης στα τρόφιμα, περιβαλλοντικά δείγματα, και κλινικές διαγνώσεις (Wang et al., 2012). Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις είναι σε θέση να ανιχνεύουν και να διακρίνουν με ακρίβεια οσμές από πολύπλοκα δείγματα αλλά και να ελέγχουν on-line τη γραμμή παραγωγής (Ghasemi-Varnamkhashtiet al., 2018; Peris & Escuder-Gilabert, 2016). Η θεαματική άνθηση της χρήσης της τα τελευταία χρόνια έχει, με περισσότερες από 120 επιστημονικές αναφορές το προηγούμενο έτος (Εικόνα S1.2).



**Εικόνα 1.3:** Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης στον τομέα του κρέατος τα τελευταία 30 χρόνια. (Πηγή: <https://www.scopus.com/>)

Αναλογική αύξηση της μεταβολομικής αυτής πλατφόρμας βρίσκει εφαρμογή στον τομέα του κρέατος, ως απλή, ταχεία και εύχρηστη μέθοδος ποιοτικής εκτίμησης (Εικόνα 1.4). Συγκεκριμένα παραδείγματα περιγράφονται στον Πίνακα 1.4 και αφορούν κυρίως την αξιολόγηση του μικροβιακού πληθυσμού και της ποιότητας βάσει του χρόνου συντήρησης. Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν την αξιολόγηση αυθεντικότητας και δυναμικής νοθείας (Tian et al., 2013; Wang et al., 2019).

**Πίνακας 1.4:** Κυριότερες εφαρμογές της ηλεκτρονικής μύτης στον τομέα της «Επιστήμης Κρέατος»

Ηλεκτρονική Μύτη	Σκοπός	Μοντέλο	Αναφορά
In-house 10 MOSFET & 4 TGS SnO <sub>2</sub> & 1 CO αισθητήρας	Συσχέτιση με οργανοληπτικά σε φέτες βόειου φιλέτου σε κενό (vac)	PLS bw; pearson correlation	Blixt & Borch, 1999
In-house 6 MOS	Συσχέτιση GC/MS με οργανοληπτικά σε ρολό κιμά	ANOVA PCA; APLS-R, GPA	Hansen et al., 2005

NST 3320 10 MOSFET & 12 MOS & IR αισθητήρας CO & humidity sensor (70°C)	Παλινδρόμηση, Συσχέτιση με GC/MS δεδομένα σε πουλερικά, (map)	Memory effects σε πολύ αλλοιωμένα δείγματα PCA, PLS-R, ANN	Rajamäki et al., 2006
In-house 9 sensors (8 MOS & 1 ηλεκτροχημικός)	Ταξινόμηση σε βόειο φιλέτο	Binomial smoothing, μέσοι όροι, κανονικοποίηση	Panigrahi et al., 2006
MGD-1 7 IMS αισθητήρες	Συσχέτιση με οργανοληπτικά σε pizza topping (map) προϊόν κρέατος	Άθροισμα σήματος από 0- 60s & baseline correction	Vestergaard et al., 2007
In-house 8 sensors τάσης (7 MOS & 1 αισθητήρας RH and T)	Πρόβλεψη <i>Salmonella typhimurium</i> σε βόειο φιλέτο, vac	binomial smoothing και μέσοι όροι PCA; ICA; stepwise linear regression	Balasubramanian et al., 2004
In-house 6 TIN (Taguchi) 1 αισθητήρας T 1 αισθητήρας υγρασίας	Διαχωρισμός κόκκινων κρεάτων (βοδινό-πρόβατο), Αλλοίωση βάσει του χρόνου συντήρησης	ΔG PCA; PLS-R; SVM ταξινόμηση	El Barbri et al., 2008
KAMINA 38-element sensor array chip with parallel electrodes	Ταξινόμηση, Φρεσκότητα, σε χοιρινό κιμά βάσει ημερών συντήρησης	Διάμεσος LDA (LOO)	Musatov et al., 2010
FOX 4000 (Alpha-MOS; 18 MOS)	: <i>M. longissimus dorsi</i> Αλλοίωση, Συντήρηση χοιρινού, Ημέρες συντήρησης	ΔR/R <sub>0</sub> PCA, PLS-SVM-R	Wang et al., 2012a
FOX 4000 (Alpha-MOS; 18 MOS)	Διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων χοιρινού κρέατος (φιλέτο, λαιμός, σπάλα, εξωτερικός & εσωτερικός μηρός), Συσχέτιση με τα οργανοληπτικά, Οσμή κάπρου	ΔR/R <sub>0</sub> MGLH; DA; PLS-R	Kirsching et al., 2012
FOX 4000 (Alpha-MOS; 18 MOS)	Συσχέτιση με GC/MS σε κοτόπουλο, λιπαρά οξέα, οξειδωμένο λίπος, λίπος	b <sub>w</sub> APLSR	Song et al., 2013
LibraNose, portable Technobiochip, 8 QMB	Παλινδρόμηση & Ταξινόμηση μικροβιακής χλωρίδας σε βόεια, φιλέτα	-PCA, DFA, SVM	Mohareb et al., 2016; Papadopoulou, et al., 2013
In-house 11 TGS MOS sensors	Συσχέτιση με TVB-N σε χοιρινό, <i>M. longissimus</i> Σύζευξη με NIR-imaging	Pearson correlation analysis PCA; BP-ANN	Huang et al., 2014
In-house 6 MOS Figaro TGS (conductivity)	Αυθεντικότητα, σε κόκκινα κρέατα (μοσχάρι, κατσικά, πρόβατο) Ταξινόμηση βάσει χρόνου συντήρησης, Παράλληλα με e-tongue	autoscale PCA, SVM	Haddi et al., 2015
In-house briefcase 8 MOS	Συσχέτιση με φρεσκότητα σε κοτόπουλο, GC/MS	R <sub>G</sub> PCA, BP-ANN	Timsorn et al., 2016

FOX 3200 (Alpha-MOS; 12 MOS)	Συσχέτιση με φρεσκότητα σε μοσχαρίσιο κιμά., GC/MS, HPLC, FTIR, πολυφασματική εικόνα	ΔR/R <sub>0</sub>	Estelles-Lopez et al., 2017
In-house	Φρεσκότητα σε μοσχάρι, χοιρινό, αρνί, οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	nad PCA, DFA	Chen et al., 2019
PEN3	Αυθεντικότητα /Νοθεία Αρνιού με πάπια, Σύγκριση με GC/MS	MCT FLDA, MLPN, PLS	Wang et al., 2019a

**MOS:** Μεταλλικοί αισθητήρες οξειδίων ημιαγωγής; **MOSFET:** MOS Field-Effect Transistors; **QMB:** Quartz Crystal Microbalance; **IMS:** Ion Mobility Spectroscopy; **PCA:** Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών; **ICA:** Ανάλυση Ανεξάρτητων Συνιστωσών; **APLSR:** ANOVA-Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων; **DA:** Διακριτική Ανάλυση; **DFA:** Discriminant Function Analysis; **LDA:** Γραμμική Διακριτική Ανάλυση; **SVM:** Μηχανές διανυσμάτων Υποστήριξης; **MLPN:** Πολυστρωματικά Νευρωνικά Δίκτυα perceptron; **BP-ANN:** Νευρωνικά Δίκτυα με δομή back propagation; **GPA:** Γενικευμένη ανάλυση procrustes; **MGLH:** Multivariate General Linear Hypothesis; **bw:** Beta-σταθμισμένοι συντελεστές παλινδρόμησης, **TVB-N:** Ολικό πτητικό βασικό άζωτο, **MCT:** Δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων

### 1.1.3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης/Απόδοσης (HPLC)

Η HPLC είναι μια από τις παλαιότερες χρωματογραφικές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται στον τομέα των τροφίμων. Παραδοσιακά χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την ανίχνευση ουσιών, οι οποίες είτε δημιουργούνται, είτε μεταβολίζονται. Συγκεκριμένα η δυναμική της έχει ερευνηθεί σε φυτικά, αλλά και ζωικά προϊόντα, όπως ψάρια (Koutsoumanis & Nychas, 1999), γαλακτοκομικά (Zeppa, Conterno, & Gerbi, 2001), προϊόντα κρέατος από τη Δανία με την ονομασία ‘rullepølse’ (Stolzenbach, Leisner, & Byrne, 2009), χοιρινό κιμά (Papadopoulou PhD thesis 2014), χοιρινές μπριζόλες (Kapetanakou et al., 2014), μοσχαρίσιο κιμά (Argyri, Doulgeraki, Blana, Panagou, & Nychas, 2011; Estelles-Lopez et al., 2017; Skandamis & Nychas, 2001) και κοτόπουλο (Lytou et al., 2018). Σε επίπεδο μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης, έχει προταθεί στο παρελθόν η εφαρμογή της σαν απλή τεχνική για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης σε βόειο κιμά συντηρημένο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας (Argyri et al., 2011). Η πρόταση υποστηρίζεται από τους Estelles-Lopez et al., (2017), αναδεικνύοντας επίσης τα αρνητικά της μεθόδου όπως είναι ο όγκος του οργάνου, η πολυπλοκότητα και τα αναλώσιμα (Πίνακας 1.2.). Η ίδια λογική εφαρμόστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή για πρώτη φορά σε αλογίσιο κρέας, και σε βόεια φιλέτα με και χωρίς μικροοργανισμούς συντηρημένα σε παραδοσιακή συσκευασία.

### 1.2.3.2. Αξιολόγηση της αυθεντικότητας και ανίχνευση δυνητικής νοθείας με μεταβολομικές μεθόδους

Παρόμοιες μεθοδολογίες και πρωτόκολλα που συζητήθηκαν παραπάνω έχουν προταθεί σαν εργαλεία αξιολόγησης της αυθεντικότητας των τροφίμων. Οι κυριότερες εξ' αυτών βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), τεχνική που μεταξύ των DNAs/RNAs διαφόρων ειδών, αξιολογεί την παρουσία DNA/RNA-συγκεκριμένου του είδους (ref specie) με ικανοποιητικά αποτελέσματα μέσα σε λίγες ώρες (Ballin, 2010; Cheng, Chou, Lee, & Sheu, 2016; Druml, Hochegger, & Cichna-Markl, 2015). Εξίσου αποτελεσματικές έχουν αποδειχτεί ανοσολογικές και ενζυματικές τεχνικές, δοκιμασίες βασισμένες στις πρωτεΐνες και ανάλυση της τριακυλγλυκερόλης (Al-Kahtani, Ismail, & Asif Ahmed, 2017; Cheng et al., 2016; Ren, Deng, Huang, Chen, & Ge, 2017; Soares, Amaral, Mafra, & Oliveira, 2010; H. Wu et al., 2020). Πρόσφατα, η μέθοδος «Meat LCD Array», έχει επιφέρει αποτελεσματική και αξιόπιστη αναγνώριση του κρέατος, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανίχνευση 32 ειδών (Cavin et al., 2016; Cottenet et al., 2016). Τέλος, προτάθηκε η αναγνώριση χοιρινού κρέατος σε ωμά ή μαγειρεμένα κεφτεδάκια εντός 20 λεπτού με συνδυασμό PCR και οπτική ανίχνευση (H. Wu et al., 2020).

Φασματοσκοπικές (UV-Vis, IR, MIR, NIR, φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, RAMAN) μη-παρεμβατικές αναλυτικές τεχνικές έχουν επίσης προταθεί για τον προσδιορισμό της γνησιότητας και ανίχνευση δυνητικής νοθείας στα τρόφιμα (Abbas et al., 2018; Alamprese et al., 2013; Boyaci et al., 2014; Kamruzzaman et al., 2012; Meza-Márquez, Gallardo-Velázquez, & Osorio-Revilla, 2010; Rohman, Sisindari, Erwanto, & Che Man, 2011; Zhao, Downey, & O'Donnell, 2014). Τελευταία, αξιολογήθηκε η επιφανειακή χημεία όπως προκύπτει από πολυφασματική (A.I. Ropodi, Pavlidis, Mohareb, Panagou, & Nychas, 2015; Athina I. Ropodi, Panagou, & Nychas, 2017) και υπερφασματική (Kamruzzaman et al., 2012; Kamruzzaman, Sun, Elmasry, & Allen, 2013; Orrillo et al., 2019; Wu, Shi, He, Yu, & Bao, 2013; Zheng, Li, Wei, & Peng, 2019) ανάλυση εικόνας.

Η ολοκληρωμένη και συστηματική μελέτη ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (μεταβολιτών) ως εργαλείο για τον εντοπισμό περιστατικών νοθείας και εγκληματικής παρέμβασης σε τρόφιμα βρίσκεται σε άνθηση τα τελευταία χρόνια (Cuadros-Rodríguez, Ruiz-Samblás, Valverde-Som, Pérez-Castaño, & González-Casado, 2016; Ellis et al., 2016). Όσον αφορά την ανάλυση του πτητικού προφίλ μεθοδολογίες όπως η ηλεκτρονική μύτη (Haddi et al., 2015; Nurjuliana, Che Man, Mat Hashim, & Mohamed, 2011; Peris & Escuder-Gilabert, 2016; Rocchi et al., 2019; Tian et al., 2013; Q. Wang et al., 2019) και αέρια χρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή Φασματομετρίας Μάζας (Nurjuliana, Che Man, Mat Hashim, & Mohamed, 2011; Pavlidis et



al., 2019; Rocchi et al., 2019; Springer et al., 2014) έχουν εφαρμοστεί. Ακόμα, η χρήση NMR (Bergana, Adams, Harnly, Moore, & Xie, 2019; Jakes et al., 2015), ισοτοπικές (Hao Wu et al., 2019) και αναλύσεις Στοιχείων Σπάνιων Γαιών (Rare Earth Elements, REEs) (Danezis et al., 2017) έχουν δείξει μεγάλη δυναμική. Αναδυόμενες τεχνικές αφορούν λιπιδομικές προσεγγίσεις (lipidomics-approach) με χρήση NMR (Jakes et al., 2015), αλλά και LC/MS/MS σε συνδυασμό με GC/MS (Trivedi et al., 2016). Έχει αξιοποιηθεί η μυογλοβίνη σα δείκτης αυθεντικότητας και νοθείας με LC/MS/MS (Watson, Gunning, Rigby, Philo, & Kemsley, 2015) και Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Πίεσης UPLC (Giaretta et al., 2013). Τέλος, παρόλο που η HPLC έχει αναφερθεί σαν μια πολύτιμη μεθοδολογία για την αυθεντικότητα των τροφίμων (Esteki, Shahsavari, & Simal-Gandara, 2019), δεν έχει εφαρμοστεί στην περίπτωση του κρέατος ως τώρα.

Κατά την προσωπική πληροφόρηση, η ανάλυση του πτητικού μεταβολικού προφίλ (metabolic profile-volatilomics) μέσω της HS-SPME/GC-MS για την αξιολόγηση της αυθεντικότητας των ειδών κρέατος, ειδικά στην περίπτωση του βόειου και χοιρινού κιμά αλλά και αλόγου, δεν έχει αναφερθεί έως τώρα. Τέλος, παρά την πληθώρα αναλυτικών τεχνικών που έχουν προταθεί σε διάφορες επιστημονικές εργασίες, οι περισσότερες εξ' αυτών ελέγχουν την επίδοση της κάθε μεθοδολογίας μεμονωμένα ή/και συγκριτικά (Argyri et al., 2011; 2015; Estelles-Lopez et al., 2017; Fengou et al., 2019; Lytjou et al., 2018). Ως τώρα δεν υπάρχουν μελέτες που να συγχωνεύουν και συνδυάζουν τα δεδομένα πολλαπλών αισθητήρων για αυτό το σκοπό.

### 1.3. Σκοπός της Διδακτορικής διατριβής

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής είναι η αξιολόγηση της ποιότητας, ασφάλειας και αυθεντικότητας του κρέατος σε αποτελεσματικό χρόνο. Προς επίτευξη αυτού του σκοπού έλαβε χώρα κλασική μικροβιολογία, και παράλληλα συλλέχθηκαν δεδομένα από πολυαισθητήρες. Η συλλογή αυτή έλαβε χώρα με ενόργανες αναλυτικές τεχνικές όπως GC/MS, HPLC και e-nose, και πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, είτε χρησιμοποιώντας την παραδοσιακή προρρητική μικροβιολογία, είτε την ενόργανη προρρητική, τα μαθηματικά μοντέλα που προκύπτουν θα είναι ικανά να προβλέψουν άγνωστα δείγματα και να δώσουν αποτελέσματα σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Οι επιμέρους στόχοι της Διδακτορικής Διατριβής ήταν:

**Στόχος 1:** Αξιολόγηση της μικροβιακής σύστασης και αλληλουχίας κατά την παραγωγή, αποθήκευση και διανομή του κρέατος σε παραδοσιακή

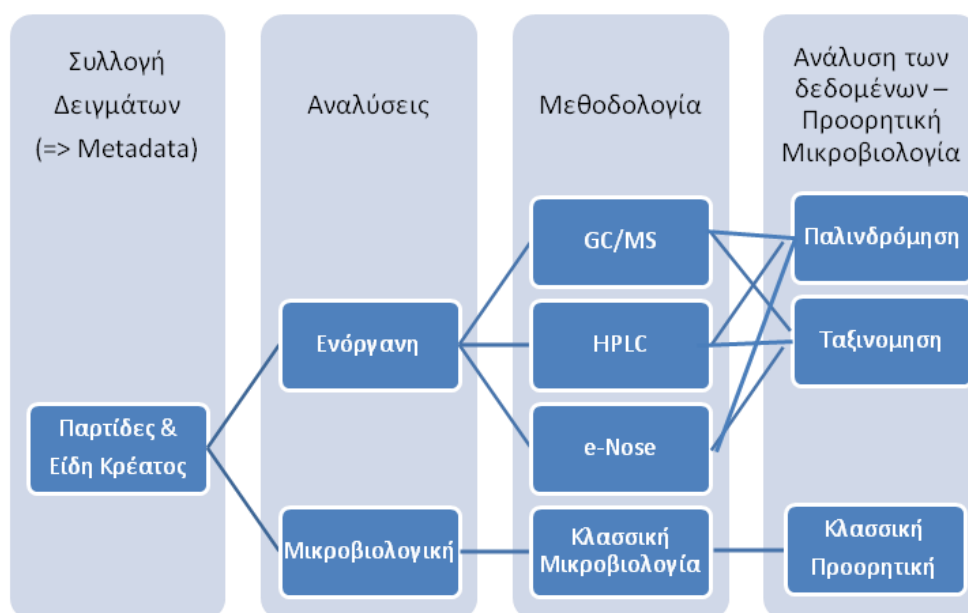
**Στόχος 2:** Μεταβολομική & βιοπληροφορική: Ανάκτηση δεδομένων για την πρόβλεψη της ποιότητας, και αυθεντικότητας νωπού κρέατος

**Στόχος 3:** Βιοδείκτες: Απλουστευμένοι δείκτες ποιότητας ή αυθεντικότητας

**Στόχος 4:** Σύγκριση επιμέρους αναλυτικών τεχνικών ως προς την απόδοσή τους για την πρόβλεψη της αλλοίωσης ή/και της νοθείας/γνησιότητας

**Στόχος 5:** Μεταβολομική στην υπηρεσία της βιομηχανίας κρέατος

Αρχικά, συμβατικές μικροβιολογικές μέθοδοι έλαβαν χώρα καταμετρώντας την OMX και ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (*Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp, οξυγαλακτικά, Enterobacteriaceae, ζύμες και μύκητες). Παράλληλα τα ίδια δείγματα υπεβλήθησαν σε διαδικασίες ελέγχου με τις ανωτέρω αναφερόμενες πλατφόρμες και τέλος συσχετίστηκαν τα δεδομένα. Η προσέγγιση που εφαρμόστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή απεικονίζεται στην παρακάτω ροή εργασιών (Εικόνα 1.4).



**Εικόνα 1.4.:** Ροή εργασιών της προσέγγισης που ακολουθήθηκε κατά τη διδακτορική διατριβή

Πραγματοποιήθηκε επικύρωση των μεθοδολογιών με απώτερο στόχο τη δυνατότητα εφαρμογής στη βιομηχανία κρέατος. Τα ερωτήματα που διερευνήθηκαν προς επίτευξη των στόχων ήταν: επίδραση της δειγματοληψίας σε διαφορετικές εποχές του χρόνου στη δημιουργία του πτητικού προφίλ και τα μικροβιολογικά δεδομένα (α), επίδραση της παραγωγής κιμά σε διαφορετικές ημέρες από τη σφαγή του ζώου στη δημιουργία πτητικού προφίλ στο κρέας (β), αξιολόγηση της αυθεντικότητας σε κρέατα κοντινής απόχρωσης με GC/MS (γ), δυνατότητα

εφαρμογής της GC/MS σαν εργαλείο ελέγχου εκτός-γραμμής παραγωγής (δ), δυνατότητα ολιστικής προσέγγισης ποιότητας και αυθεντικότητας (ε). Έτσι λοιπόν στο Κεφάλαιο 2 συλλέχθηκαν δείγματα κιμά από μεγάλη βιομηχανία επεξεργασίας κρέατος. Αυτά ήταν ισάριθμα και ομοιόμορφα κατανεμημένα ετησίως και ανα εποχή, και μετά τη μικροβιολογική ανάλυση υπεβλήθησαν σε GC/MS ανάλυση. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της αυθεντικότητας, καθώς επίσης αξιολογήθηκαν οι παράγοντες παραλλακτικότητας εποχή δειγματοληψίας και ημέρες παρασκευής κιμά από τη σφαγή του ζώου.

Περαιτέρω, λόγω του ότι το κρέας αλόγου είναι σχετικά ανεξερεύνητο από μικροβιολογικής και μεταβολομικής άποψης, προέκυψαν ερωτήματα προς διερεύνηση: ποια η μικροβιακή συσχέτιση (α), εμπορική διάρκεια ζωής (β) εξέλιξη των μεταβολιτών σε κρέας ιπποειδών (αλόγου) υπό αερόβια συντήρηση (γ), αξιολόγηση της μικροβιακής κατάστασης με μεταβολομική προσέγγιση (δ), συσχέτιση μεταβολιτών με «κλάσεις» ποιότητας (ε), και ομοιότητες μικροβιακού και μεταβολομικού προφίλ με άλλα “κόκκινα κρέατα” (στ). Επομένως, στο Κεφάλαιο 3, έλαβε χώρα στοχευμένη μελέτη σε αερόβια συντηρημένο αλογίσιο κρέας, που συνδυάζει μικροβιολογικές και χημικές (μεταβολικά προϊόντα) αναλύσεις.

Με νεότερη πειραματική διαδικασία αναδείχτηκαν μεταβολίτες, που δυνητικά προέρχονται από τη δράση των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε: διερεύνηση (screening) του μεταβολικού προφίλ μοσχαρίσιων φιλέτων με και χωρίς την αυτόχθονη χλωρίδα υπό αερόβια συντήρηση στους 2, 8, 15°C (1), ανάλυση βιοχημικού μονοπατιού (2), αξιολόγηση της αλλοίωσης/εκτίμηση της μικροβιακής ποιότητας με HPLC, GC/MS, και σύζευξη των δύο οργάνων (3), συσχέτιση των μεταβολιτών (πτητικές ουσίες, οργανικά οξέα και της γλυκόζης με προκαθορισμένες κλάσεις φρεσκότητας (4). Επιπλέον ερωτήματα όπως η επίδραση της θερμοκρασίας στη δημιουργία πτητικού προφίλ τέθηκαν προς αξιολόγηση. Ακόμη αναζητήθηκαν οι ουσίες που μεταβολίζονται κατά τη συντήρηση, όμως η παρουσία τους οφείλεται σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. οξείδωση). Τέλος αξιολογήθηκε η δυναμική της αλλοίωσης δυο στελεχών εντεροβακτηρίων από είδη με υψηλό επιπολασμό στο κρέας. Πραγματοποιήθηκε in-situ επιμόλυνση σε μοσχαρίσια φιλέτα χωρίς αυτόχθονη χλωρίδα με μονοκαλλιέργειες *Hafnia alvei* B295 και *Serratia liquefaciens* B293 και τα δείγματα αναλύθηκαν με HPLC και GC/MS, ενώ πραγματοποιήθηκε ανάλυση του βιοχημικού μονοπατιού.

Ο απώτερος στόχος της προσέγγισης είναι η εφαρμογή «μεταβολικών μεθόδων» ως εργαλείων για ολοκληρωμένη διαχείριση της ποιότητας, έτσι ώστε οι εμπλεκόμενοι (π.χ. επιθεωρητές,

ποιοτικός έλεγχος βιομηχανίας) στην τροφική αλυσίδα να μπορούν να προβλέψουν την ασφάλεια και την ποιότητά τους (McMeekin et al., 2008; Tamplin, 2018). Με αυτή την προσέγγιση θα αναβαθμιστούν τα εσωτερικά συστήματα των διαδικασιών παραγωγής, και τα Συστήματα Διασφάλισης Ποιότητας θα βελτιωθούν αξιοσημείωτα.

**Chapter II: A volatilomics approach for off-line authenticity assessment of raw minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis**

## 2.1. Materials and Methods

### 2.1.1. Meat sample collection

Over a two-year period, 204 beef and 198 minced pork samples, as well as 55 mixed (70/30 beef – pork) minced meat samples were collected from a large Athenian meat processing plant using raw materials from different European and third countries. They were analyzed microbiologically and physicochemically in terms of pH and volatile compounds measurement. These samples were factory sealed in polystyrene trays under Modified Atmosphere (MA) in an O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ratio of 80-20%. Meat mincing and sample packaging took place by the manufacturer in the first, third and fifth day after animal slaughtering and transfer to our laboratory within 30 min of their production. Beef samples will be referred to as “B”, pork as “P” and mixed as “M”.

### 2.1.2. Microbiological analysis

For microbiological analysis, 25 g of meat sample were added to 225 mL of sterile quarter strength Ringer's solution (LAB 100Z, LAB M, Bury, UK) and homogenized in a stomacher (Lab Blender) for 60 s at room temperature. Serial decimal dilutions in the same medium were prepared and 1 or 0.1 mL samples of appropriate dilutions were poured or spread in triplicate on non-selective and selective agar plates. Total viable counts (TVC) were determined on Tryptic Glucose Yeast Agar (402145, Biolife, Milan, Italy), incubated at 25 °C for 48 h; lactic acid bacteria on de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar 401728, Biolife, Milan, Italy) (pH=5.7) overlaid with the same medium and incubated at 30 °C for 72 h; *Brochothrix thermosphacta* on Streptomycin Thallous Acetate Agar Base (STAA; 402079 supplemented with selective supplement 4240052, Biolife, Milan, Italy), incubated at 25 °C for 48 h; Enterobacteriaceae on Violet Red Bile Glucose Agar (402188, Biolife, Milan, Italy) overlaid with the same medium and incubated at 37 °C for 18-24 h; and *Pseudomonas* spp. on Pseudomonas Agar Base (LABM LAB 108 supplemented with CFC X108), incubated at 25 °C for 48 h. After microbiological analysis and pH measurement in the homogenate, all samples were maintained at -80°C until HS-SPME/GC-MS analysis.

### 2.1.3. Analysis of volatile compounds

The volatile compounds were determined in two separate steps: (a) micro-extraction from the headspace and absorption onto the fiber; and (b) analysis by gas chromatography coupled to a mass spectrometer to separate and identify the individual compounds.

### 2.1.3.1. Headspace Solid Phase Microextraction (SPME)

The volatile compounds of minced meat samples were isolated by the headspace solid-phase microextraction method (HS-SPME) according to Argyri et al. (2015) and Estelles-Lopez et al. (2017) with minor modifications. Briefly, the fiber used for the absorption of the volatiles was a DVB/CAR/PDMS - 50/30  $\mu\text{m}$  (length 1 cm, needle size 24 ga) (Sigma Aldrich, Germany). The conditions of HS-SPME sampling used were as follows: 2.5 g of minced meat and 5 mL of 25 % (w/v) NaCl solution were added into a 20 mL glass vial (Supelco) and homogenized with a glass rod for 2 min. Then 50  $\mu\text{L}$  of internal standard (4-methyl-1-pentanol, final concentration 170  $\mu\text{g} / \text{L}$ ; Internal Standard) were added. The internal standard is an alcohol, which is not detected in meat. Its application is intended for semi-quantification, the annotation of the chromatogram, as well as in the control of the absorption capacity of the fiber during the analysis period. The vial was closed hermetically using a mininert valve (Sigma Aldrich, Germany) and the contents were magnetically stirred for 15 min at 40 °C. Then, the fiber was exposed to the headspace for another 30 min, under the same conditions. Desorption of volatiles took place in the injection port of GC-MS for 5 min. Before each analysis, the fiber was exposed to the injection port of another GC for 5 min to remove any volatile contaminants. Prior to sampling, new fibers were conditioned according to the manufacturer.

### 2.1.3.2. Gas Chromatography - Mass Spectrometry

GC-MS analyses were performed on an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to an Agilent 5973C mass spectrometer (Fig. 2.1). Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. The injection port was equipped with a liner (0.75 mm i.d, Agilent) suitable for SPME analysis. It was operated in split mode (split ratio 1:2) at 250°C. Separation of compounds was performed on an HP-5MS capillary column (30 m X 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, Agilent). Oven temperature was maintained at 40 °C for 5 min, programmed at 4 °C/min to 150 °C and then it was raised to 250 °C with a rate of 30 °C/min and held for 5 min. The interface temperature was set at 280 °C. The mass spectrometer was operated in electron ionization mode with the electron energy set at 70 eV and a scan range of 29–350 m/z (scan rate: 4.37 scans/s, gain factor: 1). The temperature of MS source and quadrupole was set at 230 and 150 °C, respectively.



**Fig 2.1.:** GC/MS instrument utilized in the PhD thesis

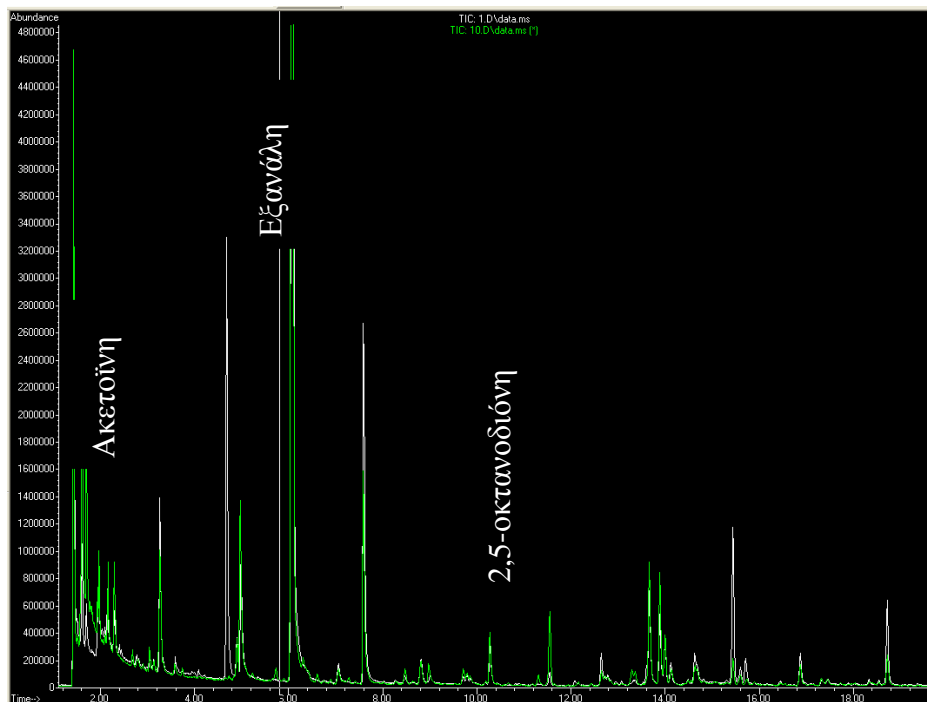
### **2.1.3.3. Identification of volatile compounds and data pretreatment**

Typical GC/MS Chromatograms are presented in Fig. 2.2. Firstly, a pre-treatment step was undertaken in order to go from raw instrumental data to clean data for data processing (Goodacre et al., 2007). The raw agilent files (.d) were converted into network Common Data Form (.netCDF) and subsequently processed with the Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS, version 2.71; <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>) for spectral deconvolution (Stein, 1999) and identification of volatile components. Compound identification was effected by comparing: (i) the retention indices (RI) based on an homologous series of even numbered n-alkanes (C6–C24, Polyscience, Illinois, USA) with those of reference compounds and those provided in NIST v.14 mass spectral library (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program), and (ii) MS data with those of reference compounds and by MS data obtained from NIST library. Unless confirmed by comparison to authentic standards, compounds were considered as tentatively identified (putative identification).

From the results of AMDIS, a list of unique ion-retention time pairs (IRt) was generated (Chen, Rao, Zhang, Zhong, & Thelen, 2014). Then, the .netCDF files and the IRt data were imported into METabolomics Ion-based Data Extraction Algorithm (MET-IDEA, (Broeckling, Reddy, Duran, Zhao, & Sumner, 2006; Lei, Li, Chang, Zhao, & Sumner, 2012) for automatic peak alignment, annotation, and integration of target ion peak area. Then the dataset was interrogated manually to remove artifacts and correct annotations if necessary. Peaks that had more than 50% missing values as well as those with more than 30% RSD (Relative Standard Deviation) within the whole dataset and relative peak area < 0.1% (Chen et al., 2014; Lin et al., 2013; Xu, Correa,



& Goodacre, 2013) were excluded from further analysis. The parameter %RSD ( $100 \cdot \text{std} / \text{average}$ ) for each metabolite has been considered as a measure of interpretation of variability (Chen et al., 2014; Parsons, Ekman, Collette, & Viant, 2009; Shurubor, Paolucci, Krasnikov, Matson, & Kristal, 2005).



**Fig. 2.2.:** Typical GC/MS chromatogram during meat analysis; Green: Pork meat, White: beef

Metabolites were initially screened in order to remove potential contaminants: e.g. ethers, aromatic hydrocarbons, chlorine (Cl-) containing substances with a possible origin the water or the environment during analysis, such trichloroethylene, tetrachloroethylene. Data transformation by centering and scaling (autoscale) as a column-wise normalization step was selected to make each variable comparable to each other (Bro & Smilde, 2003). The final output from the above procedure was a data matrix with 457 rows (meat samples) and 53 columns (area of volatile compounds), which was used, in subsequent statistical analysis.

#### 2.1.4. Descriptive analysis

The dataset was initially subjected to descriptive statistical analysis for the comparison of medians of each volatile compound using the Kruskal-Wallis test. On the other hand, a comparison of mean populations of the microbial groups was undertaken by Tukey's HSD

(Honestly Significant Differences) test. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to determine the effect of sampling at different periods of the year (autumn, summer, spring, winter) and the preparation of minced meat samples the first, third and fifth day after slaughtering on microbiological loads and volatile compounds. The statistical significance was set at  $P < 0.05$ . ANOVA was conducted using Statgraphics Centurion XVII (version 17.2.00).

Concerning multivariate analysis, the whole dataset (457 samples) was divided into training and testing sub-datasets at a ratio of 70/30 (317 calibration samples /140 prediction samples). For dataset division, the intra-seasoning (monthly batch collection) and inter-seasoning (two-year period) variabilities of the tested meat samples were taken into account in order to build more robust classification models (Capellin et al., 2013).

### **2.1.5. Unsupervised data analysis**

Principal Component Analysis (PCA) (Bro & Smilde, 2014) was employed in the training dataset (70% of the whole dataset) to reduce the dimensionality of the data, visualize the samples and examine for potential grouping according to volatile compounds. Sample grouping using the first three principal components (PCs) explaining 52% of data variability is appeared in the results section. PCA was applied with Statistica software (version 8, StatSoft).

### **2.1.6. Supervised data analysis**

#### **2.1.6.1. Model calibration**

In order to discriminate between meat samples belonging to different meat species and classify them into predefined known classes (Beef, Pork, Mixed), a calibration model was developed based on partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) using the training dataset previously defined. This approach is a common multivariate technique for supervised classification of GC/MS data (Gromski et al., 2015).

A target matrix (Y) was constructed using the PLS2 algorithm of the Unscrambler version 9.7 software (Camo Software AS, Oslo, Norway), where each row corresponded to a three-element vector as reported by Kamruzzaman et al., (2012). The class membership was coded in a numerical format by assigning 1 to the belonging class and -1 to the out-of-class category. Thus beef samples were coded as (1, -1, -1), pork samples as (-1, 1, -1) and mixed samples as (-1, -1,

1). The membership was assigned to the class with the greatest net output using '0' as a cut-off value among the classes. In the PLS2 model, the input variables (X) were the volatile compounds previously isolated and identified. The important volatile compounds used in the estimation of the corresponding meat category were obtained based on the weighted regression coefficients (Bw). For the Y-variables, the weight of mixed samples was set to x3, because its size was the 1/3 of beef and pork.

#### **2.1.6.2. Model optimization and validation.**

The popular leave-one-out cross validation (LOOCV) procedure was used for model optimization. According to this, at each iteration, a sample is left out as a test sample, while the remaining samples are used for model training (Cappelin et al., 2013). Finally, the developed model was further validated using the prediction dataset. The purpose was to determine whether the calibrated and optimized model could predict the meat category of unknown samples that were not introduced during the training process.

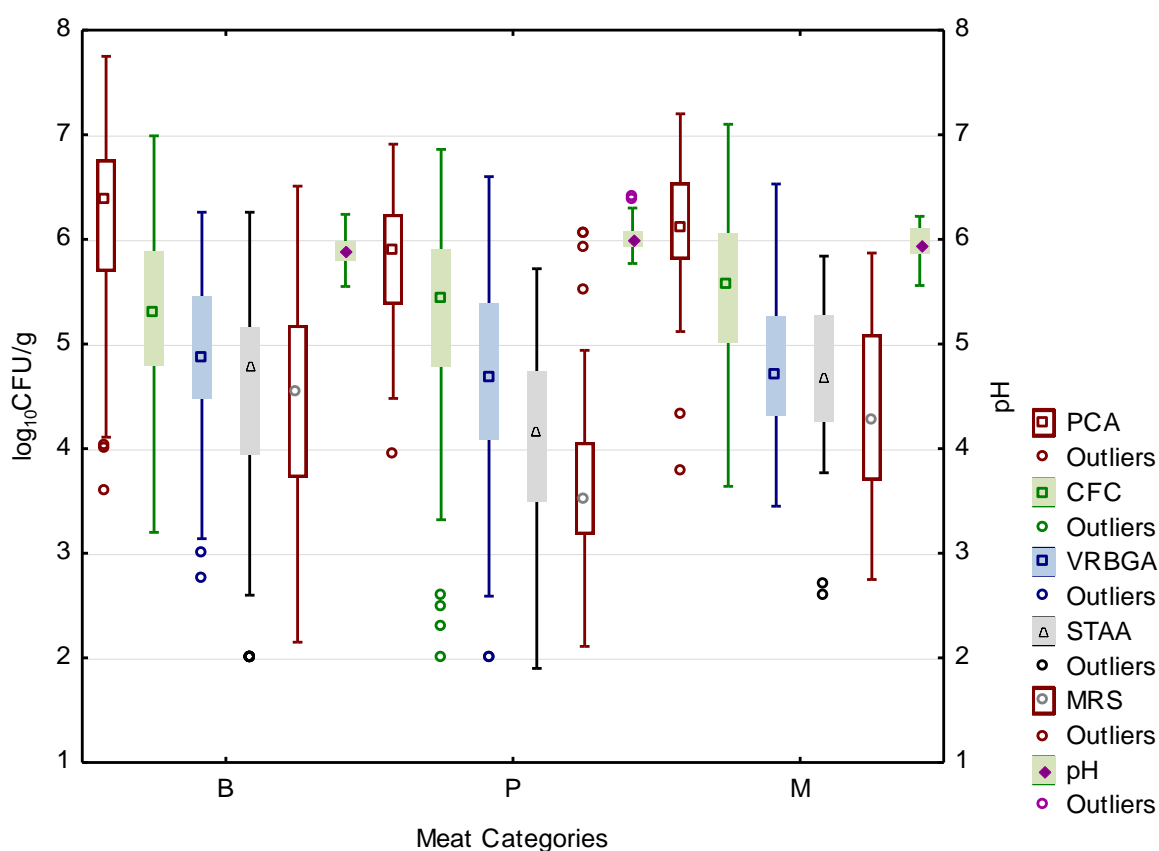
The per class classification accuracy (%) was determined by the number of correctly classified samples in each class divided by the total number of samples in the class. The overall correct classification (%) of the model was determined as the number of correctly classified samples in all classes divided by the total number of samples analyzed (Argyri et al., 2015; Panagou et al., 2014; Sokolova & Lapalme, 2009).

## 2.2. Results and discussion

### 2.2.1. Microbiological and pH measurement

In this Chapter metabolomics were evaluated in the service of the Meat industry. An Integrated Quality Management System (IQMS) was developed providing information regarding the origin, as well as the microbiological quality of meat. The levels of Total Viable Counts (TVC) across all 457 industrial meat samples, either beef, pork or mixed, ranged from 3.60 to 7.75  $\log_{10}\text{CFU/g}$ , with a mean value of 6.26  $\log_{10}\text{CFU/g}$ , followed by *Pseudomonas* spp. ranging from 3.20 to 6.99  $\log_{10}\text{CFU/g}$  with average of 5.29  $\log_{10}\text{CFU/g}$  (Fig. 2.2.1). The members of the remaining microbial association were *Brochothrix thermosphacta* and lactic acid bacteria ranging from 2.0 to 6.5  $\log_{10}\text{CFU/g}$ , while Enterobacteriaceae ranged from 2.70 to 6.26  $\log_{10}\text{CFU/g}$  with a mean value of 4.87  $\log_{10}\text{CFU/g}$ .

The pH values in the homogenate ranged from 5.80 to 5.98 in ca. 75% of samples with a mean of 5.88 for beef, 5.93 to 6.08 with a median of 6.00 for pork and 5.87-6.10 with a median of 5.96 for mixed samples.



**Fig. 2.2.1:** Box-plot for the microbiological and pH range of the collected meat samples, which were analyzed with HS/SPME-GC/MS (PCA: TVC; CFC: *Pseudomonas* spp., VRBGA: Enterobacteriaceae,

STAA: *B. thermosphacta*, MRS: lactic acid bacteria). B: beef; P: pork; M: mixed minced meat (70/30% w/w beef/pork)

The microbiological as well as the pH values found in this study are in agreement with the majority of survey works available in the scientific literature on minced meat samples from retailers (Andritsos, Mataragas, Mavrou, Stamatiou, & Drosinos, 2012; Kammenou, Metaxopoulos, & Drosinos, 2003; Nychas & Board, 1991) and supermarkets (Nychas et al., 1991; (Kammenou et al., 2003; Nychas et al., 1991). Regarding the process hygiene criteria for foodstuffs set by the EC regulation (EFSA 2073/2005 the 32% of the minced samples were classified as satisfactory ( $<5.69 \log_{10}\text{cfu/g}$ ), 53% as acceptable ( $>5.69 \ \& \ <6.69 \log_{10}\text{cfu/g}$ ), while the remaining 15% as unacceptable ( $>6.7 \log_{10}\text{cfu/g}$ ) (Table 2.1). In studies conducted in meat processing plants (Hinton et al., 1998; Manios et al., 2015), similar findings have reported.

**Table 2.1:** Compliance of TVC<sup>a</sup> of individual packing units according to directive 2073/2005 (EC).

Meat category κρέατος	n	$\leq m^b$	$m < \times \leq M^c$	$> M^d$
Beef	204	25%	47%	28%
Pork	198	41%	55%	4%
Mixed (70%beef-30% pork)	55	11%	78%	11%

<sup>a</sup>TVC: Total Viable Counts

<sup>b</sup> $m \leq 5.7 \log_{10}\text{CFU/g}$ : Satisfactory;

<sup>c</sup> $5.7m < \times \leq 6.7 \log_{10}\text{CFU/g}$ : Acceptable;

<sup>d</sup> $M > 6.7 \log_{10}\text{CFU/g}$ : Unsatisfactory;

### 2.2.2. Volatile compounds identification

Metabolomics is the comprehensive and systematic study of low molecular weight compounds (metabolites), as a whole in a given sample. To our knowledge, metabolic profiling has been applied to assess meat spoilage (Argyri et al., 2011, 2015; Nychas et al., 2008; Xu et al., 2013) and authentication of game meat (Danezis et al., 2017). With regard to the implementation of metabolomics in assessing food adulteration / authentication, although this approach has been considered as an alternative research tool to identify Economically Motivated Adulteration incidents and to study food crime problems (Cuadros-Rodríguez et al., 2016; Ellis et al., 2016; Rield et al., 2015), metabolic profiling has not been applied so far in meat adulteration. Thus, in this study the progress and application of metabolomics in identifying meat species was tested.

Fifty-three (53) volatile compounds were determined in meat samples regardless of their category (B, P, M) (Table 2.2 and S2.2). It needs to be stress however that a great number of

compounds were either detected in small quantities (relative peak area < 0.1%) or not detected at all in some samples (Table S2.1). These compounds were kept out of the analysis to create global models that were not biased from the presence/absence of a given metabolite due to uncertainty.

**Table 2.2:** Common Volatile compounds identified in Beef, Pork and Mixed samples that were further used in statistical analysis and association to the discrimination process

Volatile compound	Group <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Reliability of Identification <sup>c</sup>	(m/z) <sup>d</sup>	Correlation according to classification <sup>e</sup>		
					Beef	Pork	Mixed
<i>Alcohols</i>							
Ethanol	Alc1	515	A	31	no	no	no
Propanol	Alc2	568	A	31	no	no	no
2-Butanol	Alc3	605	A	45	no	-	+
Butanol	Alc4	660	A	56	+	-	no
1-Penten-3-ol	Alc5	680	A	57	+	-	-
3-Methyl-1-butanol	Alc6	730	A	55	no	no	no
Pentanol	Alc7	762	A	42	+	-	-
Hexanol	Alc8	871	A	56	+	-	no
1-Octen-3-ol	Alc9	981	A	57	no	-	+
2-Octen-1-ol	Alc10	1070	B	82	+	-	-
1-Octanol	Alc11	1073	A	56	+	-	-
<i>Aldehydes</i>							
Acetaldehyde	Ald1	500	A	43	+	-	no
3-Methylbutanal	Ald2	648	B	58	no	no	no
Pentanal	Ald3	699	A	58	-	+	+
Hexanal	Ald4	802	A	56	-	+	+
(E)-2-Hexenal	Ald5	854	B	69	no	+	-
Heptanal	Ald6	903	B	70	+	-	no
(E)-2-Heptenal	Ald7	954	B	83	-	+	no
Benzaldehyde	Ald8	955	A	106	-	+	no
Octanal	Ald9	1004	A	43	+	-	no
(E)-2-Octenal	Ald10	1060	B	83	-	+	no
Nonanal	Ald11	1105	B	57	-	+	+

Decanal	Ald12	1207	A	57	+	-	-
<i><b>Ketones</b></i>							
Acetone	Ket1	529	A	58	no	no	no
2,3-Butanedione	Ket2	594	A	43	no	no	+
2-Butanone	Ket3	602	B	72	+	-	no
1-Penten-3-one	Ket4	687	C	55	-	no	no
2-Pentanone	Ket5	688	B	43	-	no	+
3-Hydroxy-2-butanone	Ket6	710	A	45	+	-	-
2-Heptanone	Ket7	893	B	58	+	-	-
1-Octen-3-one	Ket8	980	C	70	-	+	no
2,5-Octanedione	Ket9	987	C	43	+	no	+
<i><b>Esters</b></i>							
Methyl acetate	Est1	548	A	74	-	no	+
Ethyl acetate	Est2	614	A	61	+	no	no
Ethyl butanoate	Est3	805	A	88	no	no	no
Ethyl hexanoate	Est4	1002	A	88	no	no	no
<i><b>Hydrocarbons</b></i>							
Cyclopentane	Hyd1	572	A	70	no	no	no
Hexane	Hyd2	600	A	56	no	no	no
Heptane	Hyd3	700	A	100	-	+	-
Nonane	Hyd4	900	A	57	no	no	no
2,2,4,6,6-Pentamethylheptane	Hyd5	989	B	57	no	no	no
Decane	Hyd6	1000	A	57	no	no	no
Undecane	Hyd7	1100	A	85	no	+	-
Dodecane	Hyd8	1200	A	57	-	no	+
<i><b>Miscellaneous</b></i>							
Dimethyl sulfide	Mis1	543	C	62	+	-	+
2-Ethyl-furan	Mis2	702	C	81	+	-	no
2-Pentyl-furan	Mis3	992	C	82	+	-	+
<i><b>Terpenes</b></i>							
$\alpha$ -Pinene	Ter1	932	A	93	-	-	+

Sabinene	Ter2	973	B	93	no	-	+
$\beta$ -Pinene	Ter3	975	A	93	no	no	no
$\delta$ -3-Carene	Ter4	1009	B	93	no	+	-
p-Cymene	Ter5	1024	A	no	no	no	no
Limonene	Ter6	1029	A	93	no	no	no

<sup>a</sup>**group:** volatile group belonging each volatile compound; **alc:** alcohols; **ald:** aldehydes; **ket:** ketones; **est:** esters; **hyd:** hydrocarbons; **mis:** miscellaneous

<sup>b</sup>**RI:** Retention Indices based on n-alkanes

<sup>c</sup>**Reliability of identification:** **A:** MS data and RI in agreement with those of authentic compound; **B:** MS data and RI in close agreement with those in literature and NIST14 MS library (peak matching > 95%); **C:** MS data and RI not in close agreement with those in literature and NIST14 MS library (80% < peak matching < 95%)

<sup>d</sup>**m/z:** target ion used for quantification;

<sup>e</sup>**+:** positive, **-:** negative, **no:** not observed correlation with each meat species

The volatilome of meat consisted mainly of alcohols, aldehydes and ketones, as well as esters, hydrocarbons, and miscellaneous compounds (Table 2.2 and Table S.2.1). The majority of identified compounds have been reported either in a review (Nychas et al., 2008) or confirmed in recently published studies (Argyri et al., 2015; Casaburi et al., 2014; Klein, Maurer, Herbert, Kreyenschmidt, & Kaul, 2017). Few of the above mentioned compounds e.g. alcohols, aldehydes, ketones, hydrocarbons, terpenoids, esters and sulphur compounds have been identified during spoilage of meat (beef or pork) regardless of the packaging conditions (Argyri et al., 2015). On the other hand, aromatic compounds such as benzene and toluene, although they do not have a meat-like odor (Min, Ina, Peterson, & Chang, 1979), may contribute in the overall flavor of raw meats (Insausti et al., 2002; King, Hamilton, Matthews, Rule, & Field, 1993). A recent review (Casaburi et al., 2015a) reported that toluene and benzene have been found in meat as a consequence of their presence in animal feedstuffs and diet, while Jackson et al. (Jackson, Acuff, Vanderzant, Sharp, & Savell, 1992) reported toluene's origin from the packaging material. However, as they were both considered contaminants, they were excluded from the first screening of variables.

### 2.2.3. Data analysis

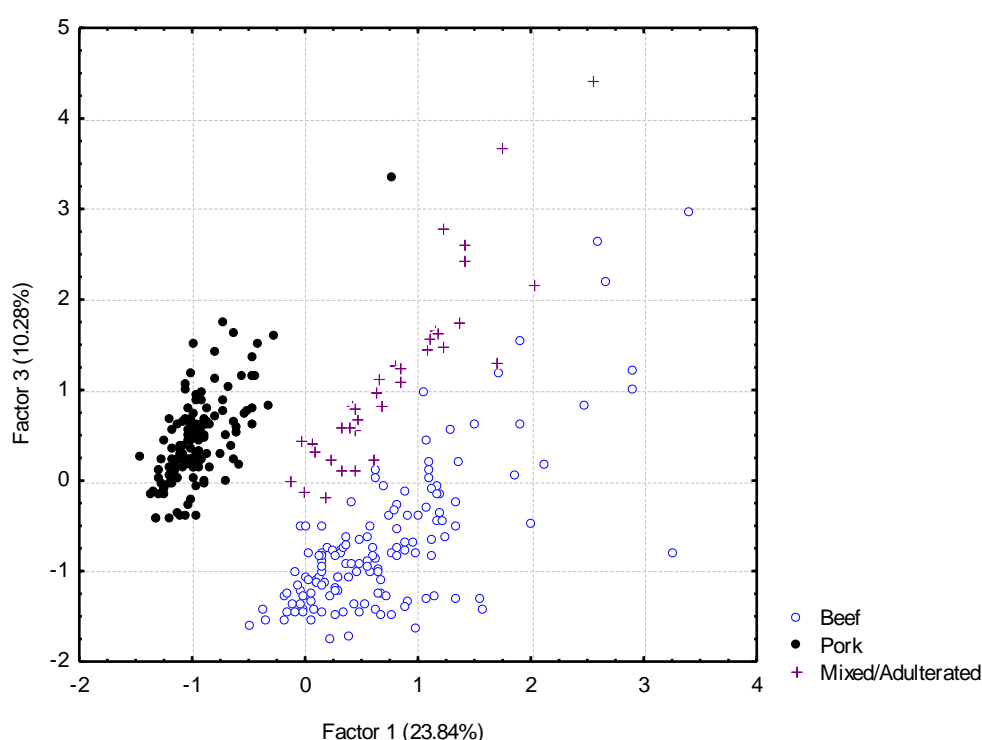
The derived dataset consisted of a table with 457 rows (samples) and 53 columns (volatile compounds). It is thus essential, prior to data analysis, to transform the data by a normalization procedure, so as to be comparable (Bro & Smilde, 2003; van den Berg, Hoefsloot, Westerhuis,



Smilde, & van der Werf, 2006). In particular, the values were transformed per column (column-wise normalization) to the mean and the standard deviation (z-scores) (autoscale).

### 2.2.3.1. A volatilomics approach for the authenticity assessment of raw red meat in tandem with multivariate data analysis

The common variables of the whole dataset (Table 2.2, column 2) were further used in multivariate analysis to allow for the discrimination of meat samples. Principal component analysis (PCA) was applied on the transformed training dataset (n=317) in order to reduce the dimensions (number of variables) and investigate the possibility of clustering meat samples.

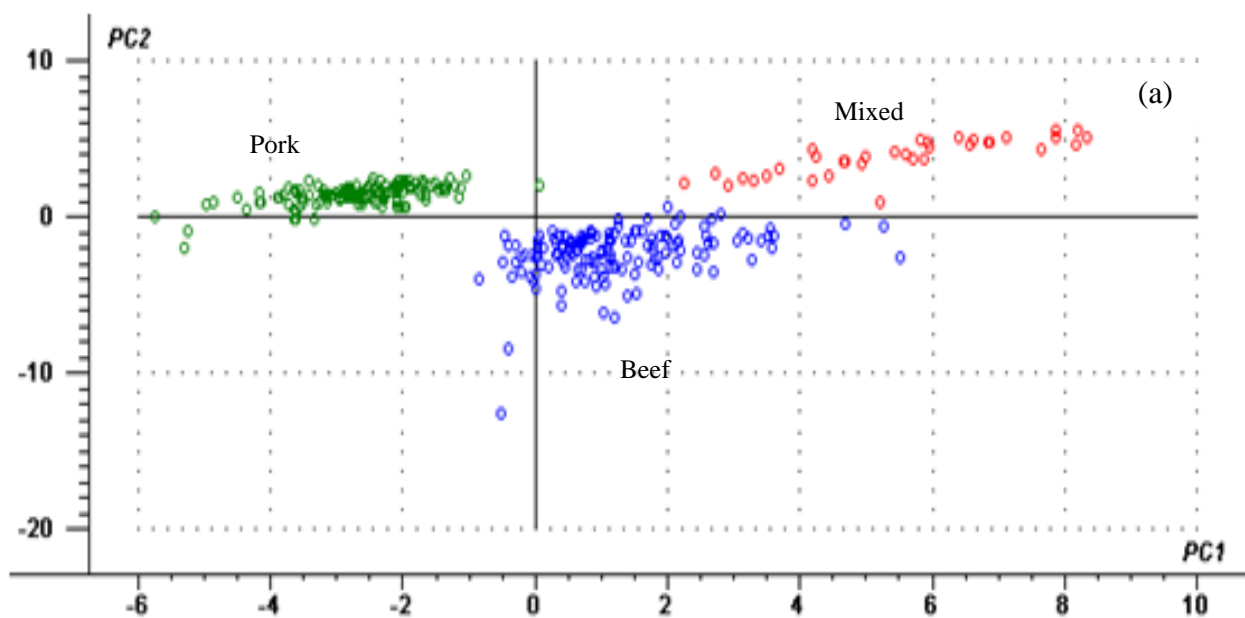


**Fig. 2.2.2:** Two-dimensional Principal Component Analysis (PCA) plot of the transformed (z-score) calibration dataset for PC<sub>1</sub> and PC<sub>3</sub>

The first three principal components (PCs) (explaining 50.68% of the variance of the dataset) with eigenvalues > 1.0 presenting the best grouping were chosen. Fig. 2.2.2 illustrates the PCA plot of PC<sub>1</sub> vs. PC<sub>3</sub>, where the separation of beef and pork samples is apparent. Also, the mixed samples are closer to beef than to pork samples, probably due to the high percentage of beef meat in the mix.

Further, Partial Least Squares Discriminant analysis (PLS-DA) was employed as a supervised multivariate technique to discriminate between the three meat classes and predict unknown

samples. The method of full cross-validation, following the leave-one-out procedure, was used to determine the optimum number of latent variables (LVs), to ensure the predictive ability and avoid over-fitting of the data. The ideal number of LVs of the PLS-DA model was determined at the lowest value of prediction residual error of sum of squares (PRESS) (Barker & Rayens, 2003). In this study, six (6) latent variables (LVs) were selected as optimum number. From the score plot of the first 2 LVs (Fig. 2.2.3), a satisfactory separation between the three meat classes, especially for beef and pork, was obtained although the mixed samples were closer to “B” class. It is evident that the orientation of the three meat classes has changed in relation to PCA plot (Fig. 2.2.2).



**Fig. 2.2.3:** Partial least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) plot of the different meat samples (scores) (Green: Pork, Blue: beef; Red: Mixed meat samples) (A) and loadings plot of input variables X (B) for the first two latent variables (Ald, Alc, Mis, Hyd, and Est codes are expressed in the Table 2.2)

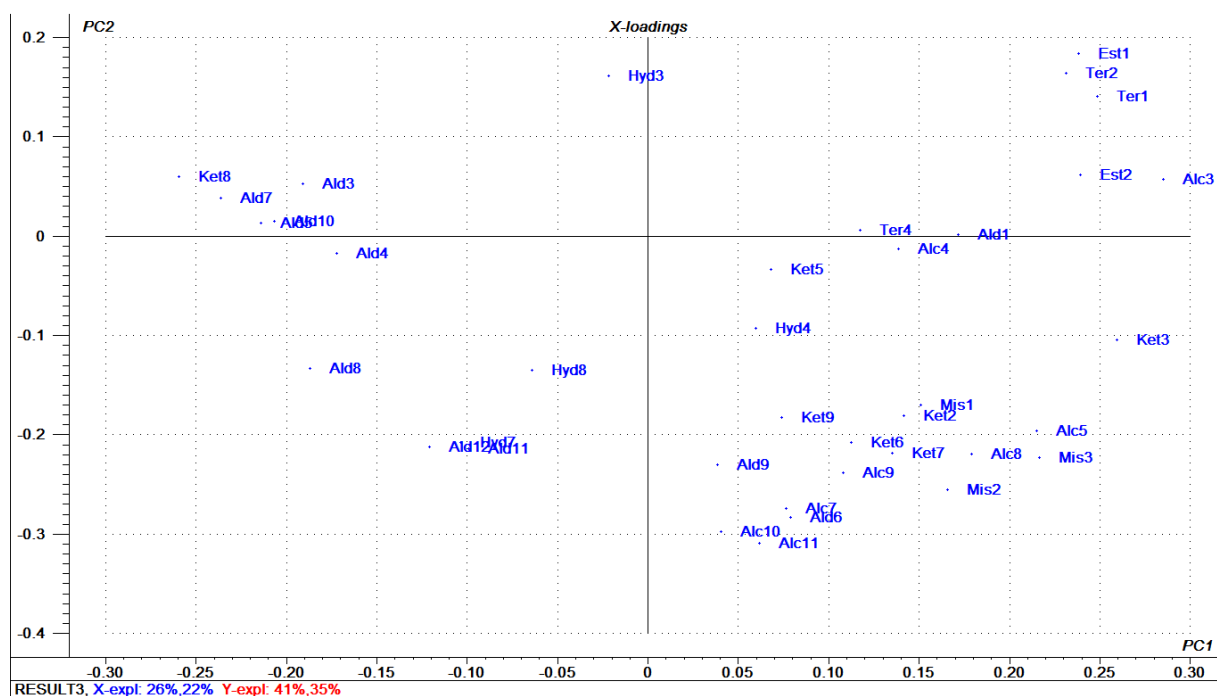
Table 2.3 (A) summarizes the classification results during PLS-DA model calibration. It is observed that 143 out of 144, 138 out of 138 and 35 out of 35 meat samples were correctly classified as beef, pork and mixed, respectively, with an overall correct classification of 99.7%. One of the most important aspects of supervised classification is model validation to avoid overfitting of the classifier to the data. So, validation assures that the performance will be statistically valid and the model will be efficient in the presence of new samples (Cubero-Leon et al., 2014). Similar results were observed during model prediction in Table 2.3 (B), where 100% correct per class (sensitivity) classification was obtained for beef and pork meat samples,

whereas for mixed samples the respective rate was 95%. Finally, the overall correct classification achieved for the test dataset during model validation amounted to 99.3%.

**Table 2.3:** Confusion matrix during PLS-DA utilizing 6 latent variables for the training (n=317) (A), and testing (n=140) (B) respectively

(A)	Beef	Pork	Mixed	Total	Sensitivity (%)
Beef	143	0	1	144	99.3
Pork	0	138	0	138	100.0
Mixed	0	0	35	35	100.0
Overall Correct Classification (%)					99.6
(B)	Beef	Pork	Mixed	Total	Sensitivity (%)
Beef	60	0	0	60	100.0
Pork	0	60	0	60	100.0
Mixed	1	0	19	20	95.0
Overall Correct Classification (%)					99.3

One of the advantages of PLS-DA analysis is not only the ability to discriminate between known classes and predict unknown samples, but also to associate metabolite data with each class (Cubero-Leon et al., 2014). The loadings plot (Fig. 2.2.4) shows the correlation of variables (volatiles) with each meat class. Variables on the left side of the plot are correlated with pork meat category, while these on the down-right quadrant with beef. Based on the regression coefficients (Fig. 2.2.5) from PLS-DA in the case of whole volatilome, 40 out of 53 variables (volatile compounds) were selected as important and were kept for the final discrimination. The grey and blue bars represent variables of high and low significance, respectively. The regression coefficients are the numerical coefficients that express the link between variation in the predictors and variation in the response. For this reason, the bw-coefficients (regression coefficients) provide the accumulated picture of the most important volatile compounds which contribute to discrimination.



**Fig. 2.2.4:** Loadings plot of input variables X for the first two latent variables (Ald, Alc, Mis, Hyd, and Est codes are expressed in the Table 2.2)

### 2.2.3.2. Correlation of volatile compounds with each meat class

The common compounds for the three meat classes that were further used in multivariate analysis and were considered significant during meat species discrimination were summarized in Table 2.2. Columns 6-9 represents the kind of correlation of each compound with each meat specie. Contradictory results can be found in the literature for the origin of many volatiles identified in meat species. It has been reported that they can be directly transferred from ingested feeds into animal tissue or from transformation of feed molecules by the action of ruminal microorganisms (Suzuki & Bailey, 1985; Vasta & Priolo, 2006). Apart from that, the contribution of the microbial activity to the metabolome formation is undeniable (Casaburi et al., 2015).

From the 14 aldehydes identified in the whole dataset, 12 were common in all meat species and were further selected for multivariate statistical analysis. It was shown before (correlation bi-plot; Fig. 2.2.3&4) that acetaldehyde (Ald1), heptanal (Ald6), octanal (Ald9) and decanal (Ald12), were positively correlated with beef samples and negative with pork and played an important role in the discrimination process. On the other hand, pentanal (Ald3), hexanal (ald4), nonanal (Ald11), benzaldehyde (Ald8) and the unsaturated aldehydes (E)-2-hexenal (Ald5), (E)-

2-heptenal (Ald7), and (E)-2-octenal (Ald10), showed positive correlation (positive values of bw coefficients) with pork species (Fig. 2.2.5b), while they were negatively correlated with beef. Finally, according to the bw regression coefficients, pentanal, hexanal and nonanal were also positively correlated with mixed meat samples, while (E)-2-hexenal and decanal presented a negative correlation.

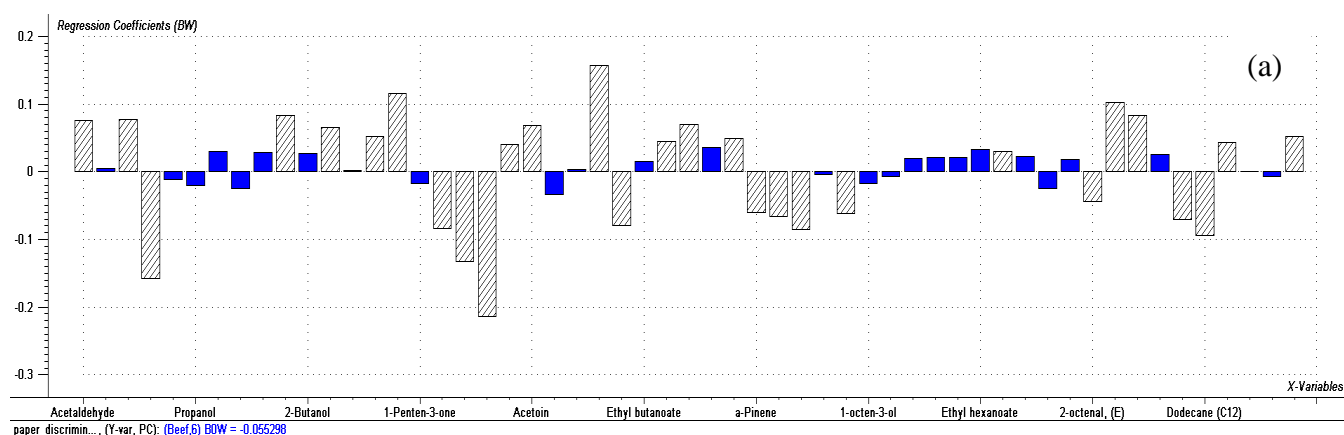
The presence of alcohols may be ascribed to glucose and amino acid metabolism from microbial activity (Dainty, 1996; Dainty, Edwards, Hibbard, & Marnewick, 1989) or to lipid oxidation (Park, Yoon, Schilling, & Chin, 2009). Among the 11 common alcohols (Table 2.2) that were used in further statistical analysis, as derived from the bw-coefficients plot (Fig. 2.2.5), butanol (Alc4), 1-penten-3-ol (Alc5), pentanol (Alc7), hexanol (Alc8), 2-octen-1-ol (Alc10) and octanol (Alc11), were positively correlated with beef samples, whereas 2-butanol (Alc3) and 1-octen-3-ol (Alc9) with mixed meat samples. All the above-mentioned compounds plus ethanol (Alc1) were negatively correlated with pork meat category. Although 3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol) is the most frequently detected alcohol in raw meat (Casaburi et al., 2014, 2015a) with 1-octen-3-ol, it did not appear to be significant during classification (Fig. 2.2.5).

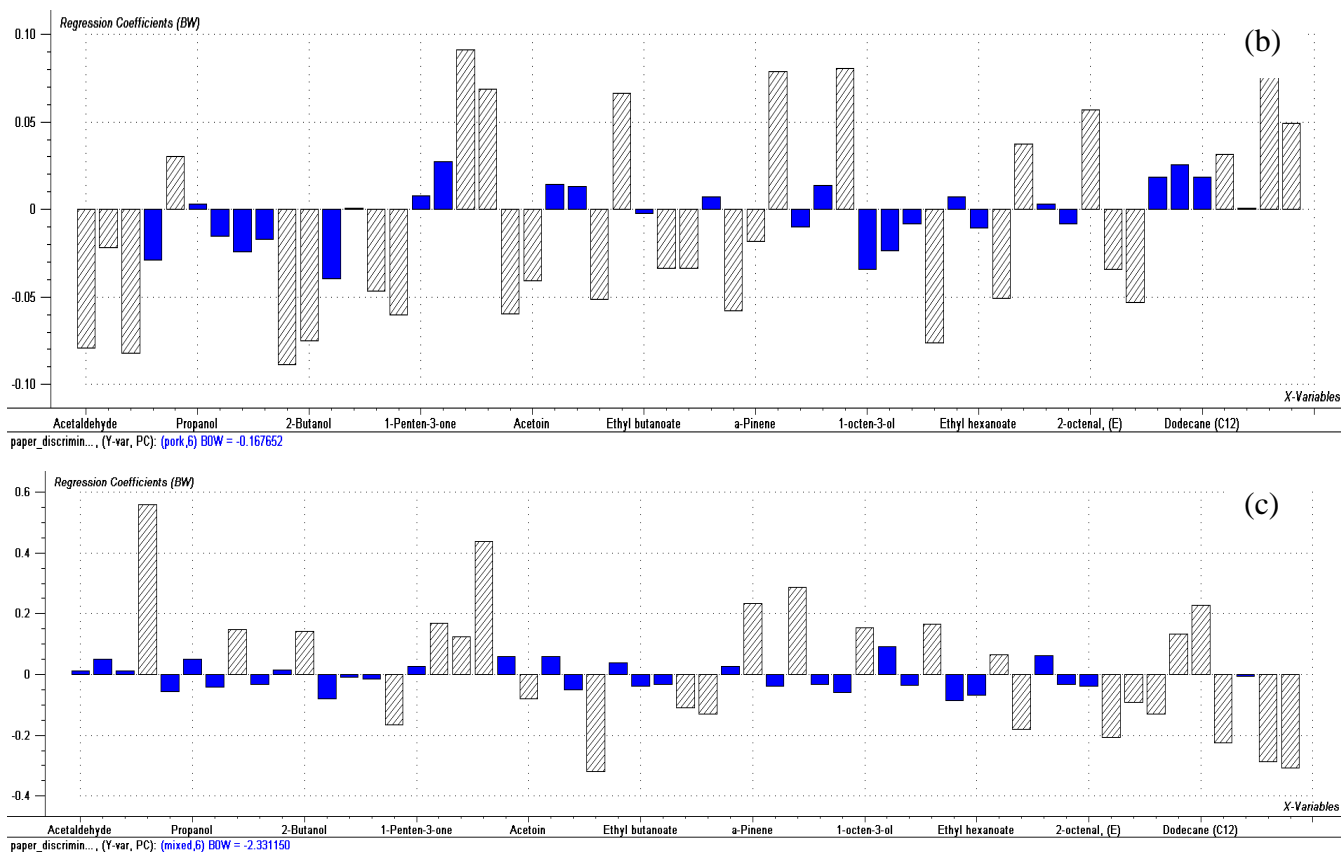
Nine (9) common linear and branched chain ketones (Table 2.2) were further used in multivariate statistical analysis. Among them, 3-hydroxy-2-butanone (ket6), 2-butanone (ket3), 2-heptanone (ket7) and 2,5-octanedione (ket9) were positively correlated (Figs. 2.2.3&2.2.4) with beef and negatively with pork as indicated by the bw-regression coefficients plot (Fig. 2.2.5b). On the other hand, 1-octen-3-one (ket8) was found to be correlated positively with pork and negatively with beef samples, but it did not affect the mixed meat samples. Considering mixed meat samples 2,3-butanedione (ket2), 2-pentanone (ket5) and 2,5-octanedione (ket9) were positively correlated with this class (Fig. 2.2.5c). The results are in agreement with Lyte et al., (2016) who reported the ket 6 (acetoin) a product deriving from glucose catabolism or as an oleic acid oxidation product. Similarly, the branched chain acetone (ket1) and 1-penten-3-one (ket4) were not found to be significant for meat species discrimination. Most of the ketones correlated with beef category could be attributed to the increased and more diverse microbial density of beef samples (Casaburi et al., 2014) ascribing creamy, dairy, and cheesy odors (Dainty et al., 1989). This is in agreement with other authors (Argyri et al., 2015; Insausti et al., 2002; Resconi, Escudero, & Campo, 2013), who reported the correlation of these ketones in beef with high microbiological load.

Among the esters used in multivariate analysis (Table 2.2), ethyl acetate (est2) was positively correlated with beef samples, and methyl acetate (est1) was positively correlated with mixed and negatively with beef meat samples (Fig. 2.2.5c), while did not affected pork. Further, ethyl butyrate (est3) and hexanoate (est4) did not appear to have any significant contribution in the PLS-DA model. It is well established that esters are formed through transamination and decarboxylation reactions mediated mainly by microbial enzymes (Ercolini et al., 2009, 2006; Miller, Scanlan, Lee, Libbey, & Morgan, 1973; Nychas et al., 2007).

Eight of the numerous hydrocarbons detected were common to the three meat categories (Table 2.2). Additional hydrocarbons, not further used for chemometrics are described in supplementary table 2.1. During discrimination, heptane (hyd3) and undecane (hyd11) exhibited a positive correlation with pork samples and negatively with mixed. Although, dodecane (hyd8) was correlated with mixed, it affected negatively the beef meat class. The remaining hydrocarbons did not appear to play an important role in the discrimination of meat species.

As regards terpenes,  $\delta$ -3-carene (ter4) was positively correlated with pork samples, whereas,  $\alpha$ -pinene (ter1) and sabinene (ter2) with mixed meat samples (Fig. 2.2.5), whereas the other compounds of this family group did not appear to be important in meat discrimination. Terpenes are directly transferred from feed (grass) to animal tissue, so these compounds are considered a green forage indicator (Calkins & Hodgen, 2007). Limonene (ter6) the most abundant terpene contributes with “lemon” sensory notes (Acree and Aru, 1997) and it has been associated with the pig diet in hams (Pastorelli et al., 2003). In addition,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene are associated with the degradation of limonene (Acevado et al., 2012).





**Fig. 2.2.5:** Beta-weighted regression coefficient (Bw) values of PLS-DA model for (a) beef, (b) pork and (c) mixed minced meat species (Grey bars represent important compounds, whereas blue non-important

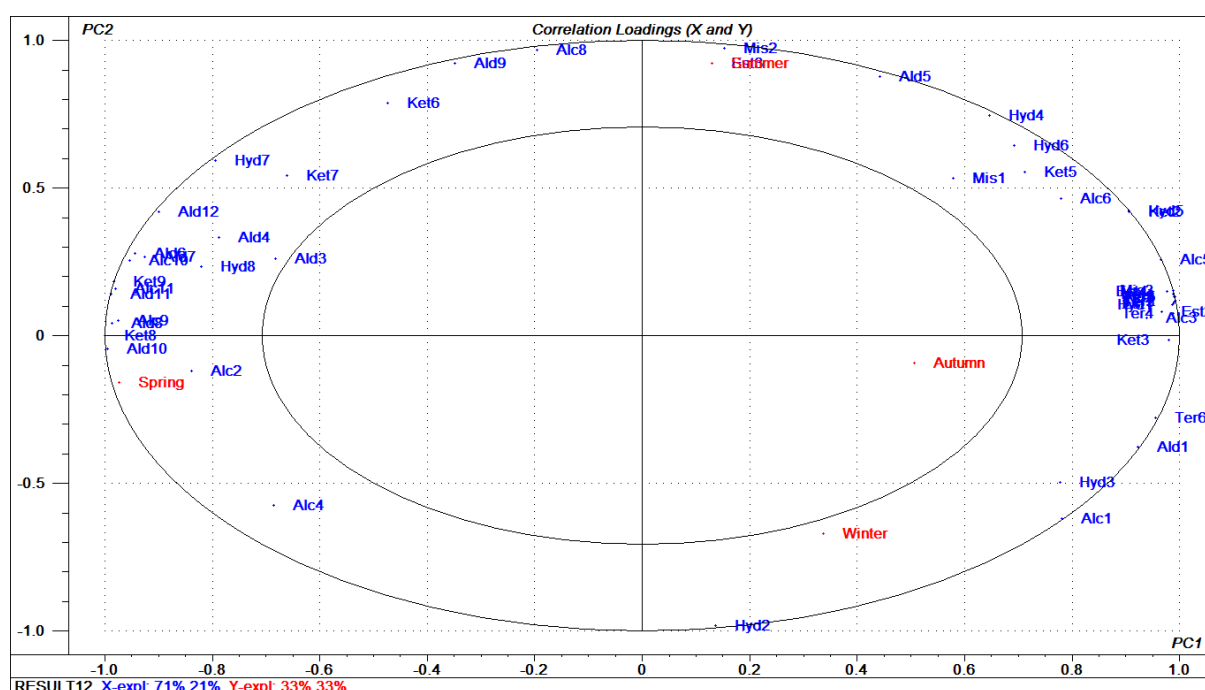
Two furans (2-ethylfuran & 2-pentylfuran) were detected and appeared to be positively correlated with beef samples and negatively with pork (mis2 and mis3). These findings are in agreement with Angelo et al., (1987) and Insausti et al., (2002) who mentioned the presence of 2-ethylfuran in raw beef. Soncin et al. (Soncin, Chiesa, Cantoni, & Biondi, 2007b) reported that 2-pentylfuran is presumably formed by autoxidation of linoleate in pork.

Dimethyl sulfide (mis1) was positively correlated with beef and mixed meat samples and negatively with pork. This is most likely originated from sulfur containing amino acids such as cysteine, methionine (Herbert, Hendrie, Gibson, & Shewan, 1971) by the action of psychrotrophic bacteria that are able to produce proteolytic enzymes in beef (Chung et al., 1994; Insausti, et al., 2005).

### 2.2.3.3. Effect of sampling at different periods of the year and slaughtering to minced meat preparation on the volatilome.

The results of this study demonstrated that sampling at different seasons (autumn, spring, winter, summer) had a significant effect ( $p \leq 0.05$ ) on the majority of volatile compounds (Table S2.1).

However, no significant ( $p > 0.05$ ) changes occurred for propanol, 3-methyl-butanal, 2-butanol, heptane, hexanol, p-cymene and nonanal for beef samples, as well as 2-pentanone, 2-ethyl-furan,  $\delta$ -3-carene, nonanal, dodecane and decanal for pork samples, respectively. Seasonal effects were also evident for hexanal from pork samples, with significantly higher values in spring and winter. Seasonal effects were also reported for the volatile compounds of milk during the entire lactation of cows (O’Callaghan et al., 2016). As regards terpenes, they showed to have higher values during autumn and summer, except for limonene which was significantly higher during spring and winter. The correlation bi-plot of volatile compounds (loadings) and season of the year is presented in Fig. 2.2.6.



**Fig. 2.2.6:** Correlation bi-plot of loadings with seasons of the year that collected the samples. (Ald, Alc, Hyd, Ter, Est codes are explained in Table 2.2)

On the other hand, it was also shown that the day between slaughtering and minced meat preparation (1, 3 and 5) affected the median of the majority of volatile compounds, apart from acetaldehyde, benzaldehyde, pentanal, hexanal, nonanal, decanal, (E)-2-heptenal, (E), (E)-2-octenal, propanol, pentanol, 2-octen-1-ol, 1-octen-3-ol, 2,5-octanedione, 4-hydroxy-2-butanone, hexane, undecane and the two furans. The correlation bi-plot of volatile compounds (loadings) and days of preparation of minced meat samples after slaughtering is shown in Fig. 2.2.7.



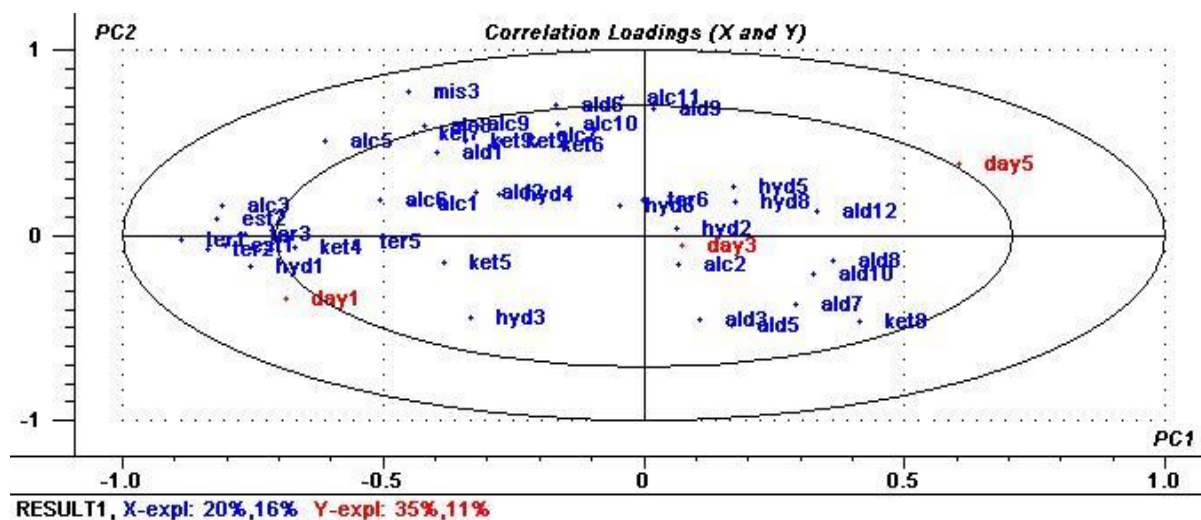


Fig. 2.2.7.: Correlation bi-plot of loadings with preparation of minced samples 1,3 and 5 days after slaughtering (Ald, Alc, Hyd, Ter, Est codes are explained in Table 2.2).

## 2.3. Conclusion

A major issue in metabolomics studies is the number of samples collected and analyzed. In the present work, for the first time, a large dataset of 457 samples obtained directly from a meat processing plant was analyzed with HS-SPME/GC-MS to explore the volatilome of different minced meat species. A wide variety of variability sources, such as: (1) intra- and inter-seasoning phenomena, (2) among- and between- batch variability, (3) feeding, (4) preparation of minced meat samples after slaughtering and (5) microbial consortium for meat were taken at the same time into account in order to developed a classification model.

Results showed that HS-SPME/GC-MS is a promising method for meat species discrimination and classification which can be successfully applied in large datasets in tandem with multivariate data analysis techniques. Additionally, compounds belonging to several chemical groups were identified as discriminating biomarkers. Aldehydes (acetaldehyde, heptanal, octanal and decanal), alcohols (butanol, 1-penten-3-ol, pentanol, hexanol, 2-octen-1-ol and octanol), ketones (3-hydroxy-2-butanone, 2-butanone, 2-heptanone and 2,5-octanedione), esters (ethyl acetate), and furans (2-ethylfuran and 2-pentylfuran) were positively correlated with beef samples and could thus be considered as volatile biomarkers for discrimination between beef and pork minced meat samples. On the other hand, positively correlated biomarkers for pork were 1-octen-3-one,  $\delta$ -3-carene, 1-octen-3-ol, methyl acetate and the aldehydes pentanal, hexanal, nonanal, benzaldehyde as well as the unsaturated aldehydes (E)-2-hexenal, (E)-2-heptenal, and (E)-2-octenal.



## **Chapter III: Microbial and metabolomic succession of aerobically stored horse fillets**

## **3.1 Materials and Methods**

### **3.1.1. Horse meat preparation**

Fresh de-boned horse loin arrived in our laboratory under refrigeration. It was divided into portions of  $35\pm 5$ g, placed onto styrofoam trays and wrapped manually with air-permeable polyethylene plastic film for domestic use. Each package, containing two individual fillets were stored aerobically at 0, 5, 10 and 15°C in high precision ( $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ) incubation chambers (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) for an overall period of 340h, depending on storage temperature. At appropriate time intervals horse fillets were analyzed in duplicate microbiologically, for pH and their corresponding microbial metabolites utilizing HPLC and GC/MS.

### **3.1.2. Microbiological analysis and pH measurement**

Microbiological analysis has been reported elsewhere (Pavlidis et al., 2019). In brief, 25 g of meat sample were added to 225 mL of sterile quarter strength Ringer's solution (LAB 100Z, LAB M, Bury, UK) and homogenized in a stomacher (Lab Blender) for 60 s at room temperature. Serial decimal dilutions in the same medium were prepared and 1 or 0.1 mL samples of appropriate dilutions were poured or spread in triplicate on non-selective and selective media. Total Viable Counts (TVC) were determined on Tryptic Glucose Yeast Agar (402145, Biolife, Milan, Italy), incubated at 30°C for 48-72h; pseudomonads on Pseudomonas Agar Base-PAB (LABM LAB 108 supplemented with CFC X108), Brochothrix thermosphacta on Streptomycin Thallous Acetate Agar Base (STAA; 402079 supplemented with selective supplement 4240052, Biolife, Milan, Italy), incubated at 25°C for 48 h, yeasts and moulds in Dichloran-Rose-Bengal Chloramphenicol agar (DRBC), incubated at 25°C for 72hrs, lactic acid bacteria on de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar 401728, Biolife, Milan, Italy) (pH=5.7) overlaid with the same medium and incubated at 30°C for 72 h; and enterobacteria on Violet Red Bile Glucose Agar (402188, Biolife, Milan, Italy) overlaid with the same medium and incubated at 37°C for 18-24h. At the end of the microbiological analysis, pH measurement was performed in the homogenate, by means of a digital pH meter (Metrohm 691 pH meter, Ion Analysis, Switzerland).

### 3.1.3. Model development and shelf-life estimation

A two-step modelling approach was employed based on primary models to calculate the growth kinetic parameters of microorganisms followed by secondary models to explore the effect of temperature on the growth rate and lag-phase duration. To begin with, microbiological data were initially transformed to  $\log_{10}\text{CFU/g}$  and then processed with the PMM-Lab software v1.06 ([https://foodrisklabs.bfr.bund.de/pmm-lab\\_de/](https://foodrisklabs.bfr.bund.de/pmm-lab_de/)) for predictive microbiology issues. Growth data of all the tested bacteria were fitted using the Baranyi and Roberts (Baranyi & Roberts, 1994), 1994) primary model implemented with nlstools R package (Baty et al., 2015). Curve fitting allowed for the estimation of the kinetic parameters, i.e. the predicted initial and the maximum cell concentration  $N_0$  and  $N_{\max}$  ( $\log_{10}\text{CFU/g}$ ) respectively, the maximum specific growth rate  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) and the duration of the lag phase (h), when applicable.

Towards to the second step, the effect of temperature on the  $\mu_{\max}$  was further modelled with the suboptimal Ratwowski square-root equation (Ratkowsky, Lowry, McMeekin, Stokes, & Chandler, 1983)

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b * (T - T_{\min}) \quad (\text{Eq. 1.}),$$

where  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ );  $b$  is a coefficient;  $T$  is storage temperature;  $T_{\min}$  is the nominal minimum temperature for growth.

Afterwards, the shelf-life was estimated deterministically based on the calculated growth kinetics according to the equation proposed by Dalgaard, (1995):

$$SL = t_{lag} + (\ln 10) * \frac{\log(N_s) - \log(N_0)}{\mu_{\max}} \quad (\text{Eq. 2.})$$

where  $SL$  is the deterministic shelf-life (h),  $t_{lag}$  is the estimated lag-phase duration (h),  $N_s$  is the minimal spoilage level ( $\log_{10}\text{CFU/g}$ ),  $N_0$  is the initial population ( $\log_{10}\text{CFU/g}$ ),  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ ).

Lastly, following again a two-step approach, the T-dependency of shelf life was modeled according to the modified Arrhenius equation (Arrhenius, 1889).

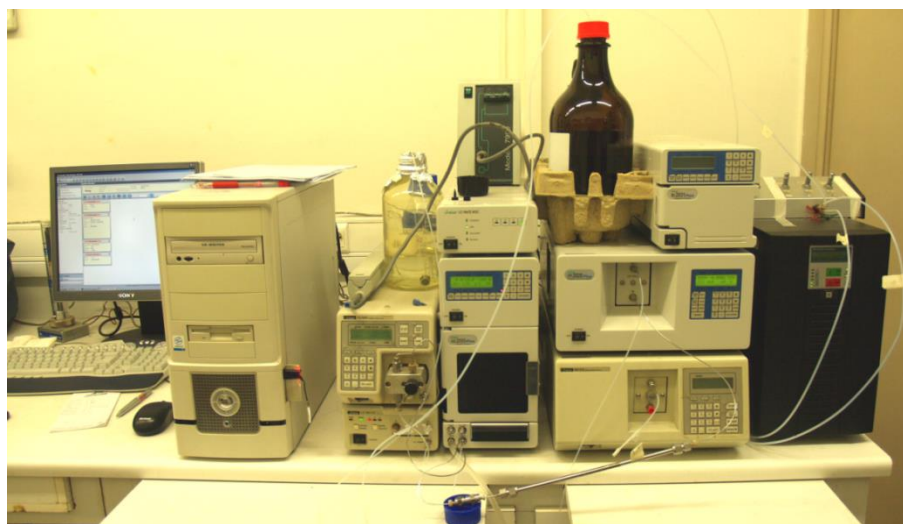
$$\ln(SL) = \ln(SL_{ref}) - \frac{Ea}{R} * \left( \frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \quad (\text{Eq. 3.})$$

where  $T$  is the absolute temperature ( $^{\circ}\text{K}$ ),  $E_a$  ( $\text{kJ/mol}$ ) is the activation energy,  $R$  is the universal gas constant ( $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T_{\text{ref}}$  is the reference temperature ( $273^{\circ}\text{K}$ ) and  $SL_{\text{ref}}$  is the shelf life at  $T_{\text{ref}}$ .

### 3.1.4. HPLC-PDA-RI analysis

The extraction of organic acids, glucose and ethanol from meat took place as follows: 4g of horse fillets were cut into smaller pieces and homogenized with 8 mL of ultrapure water (Sigma-Aldrich) using a glass rod for 2 min. After centrifugation ( $5000g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ), 4 mL of the supernatant was collected in a clean falcon tube, and  $40 \mu\text{L}$  of trifluoroacetic acid solution (1% v/v) was added for protein precipitation. After stirring for 1 min and centrifuging (at the same conditions as those described before), the supernatant was collected, filtered through a filtering paper and  $40 \mu\text{L}$  of 1% (v/v) sodium azide solution were added as a preservative. Before analysis, the final extracts were filtered through  $0.22 \mu\text{m}$  syringe filters (PVDF, Millipore).

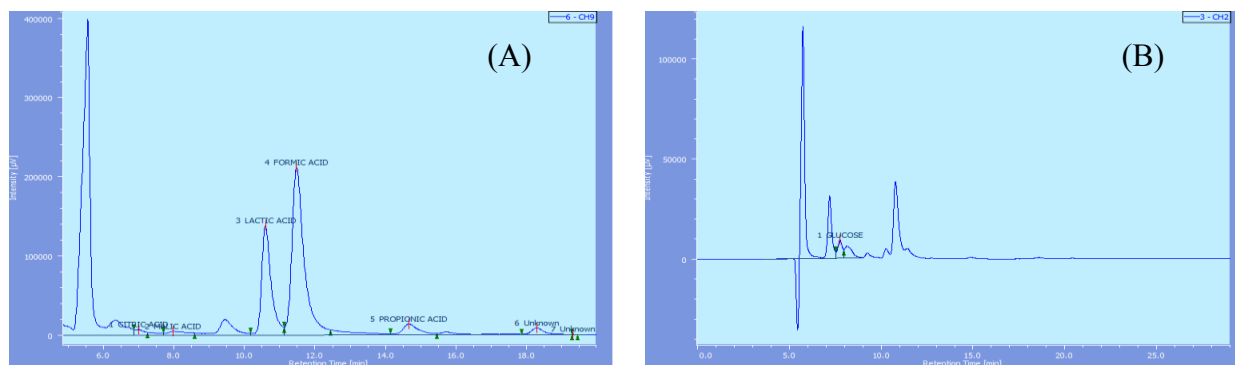
HPLC analysis was conducted on a JASCO system (Tokyo, Japan) which consisted of a degasser (DGU-20As), an autosampler (AS-2055 Plus), a quaternary gradient pump (LG-980-02), and a Photo-Diode Array detector (MD-910) connected in series with a Refractive Index detector (RI-2031) (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1:** JASCO HPLC system with two detectors (PDA & RI) connected in series (HPLC-PDA-RI).

Chromatographic conditions were similar to those describe elsewhere (Estelles-Lopez et al., 2017). In brief, the separation of compounds was performed in an Aminex HPX-87H column ( $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$ , Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at  $65^{\circ}\text{C}$  using  $0.009 \text{ N H}_2\text{SO}_4$  as a

mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min. Injection volume was set to 20  $\mu$ L. Compound identification was effected by comparing the retention time and UV-Vis spectrum (200-650nm) with those of authentic compounds. Samples were analyzed in duplicate and the average of the peak areas of the chromatogram at 210 nm was used for organic acids (citric, pyruvic, succinic, lactic, formic, acetic, propionic, isobutyric, butyric), whereas for glucose and ethanol the peak areas of RI chromatogram were used in subsequent data treatment. Typical HPLC chromatograms in Photo-Diode Array (A) and Refractive Index (B) are presented in Fig. 3.2.



**Fig. 3.2.:** Typical HPLC chromatogram of beef meat through PDA (Photo-Diode Array) (A) and RI (Refractive Index) (B) detector respectively.

### 3.1.5. Headspace Solid Phase Micro-Extraction-GC/MS analysis

The isolation of the volatile components from selected horse samples corresponding to day 0, middle- and end-point of storage was accomplished according to Pavlidis et al. (2019). Briefly, 2.5g of horse fillets were cut in small pieces and homogenized with 5 mL of 25% (w/v) NaCl solution in a 20 mL glass vial (Supelco) using a glass rod for 2 min. The vial was fitted with a screw cap with hole and PTFE/silicone septum (Sigma Aldrich, Germany) and the contents were magnetically stirred for 15 min at 40 °C. A DVB/CAR/PDMS - 50/30  $\mu$ m fiber (length 1 cm, Sigma Aldrich, Germany) was exposed to the headspace for another 30 min under the same conditions, to absorb the volatile compounds. Desorption of volatiles took place in the injection port of GC-MS for 5min. Before each analysis, the fiber was conditioned to the injection port of another GC for 5min.

GC-MS analyses were performed on an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to an Agilent 5973C mass spectrometer. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. The injection port was equipped with a liner (0.75 mm i.d., Agilent) suitable for SPME analysis. It was operated in split mode (split

ratio 1:2) at 250 °C. Separation of compounds was performed on an HP-5MS capillary column (30m×0.25 mm, d.f. 0.25 µm, Agilent). Oven temperature was maintained at 40 °C for 5 min, programmed at 4 °C/min to 150 °C and then it was raised to 250 °C with a rate of 30 °C/min and held for 5 min. The mass spectrometer was operated in electron ionization mode with the electron energy set at 70 eV and a scan range of 29–350 m/z (scan rate: 4.37 scans/s, gain factor: 1). The temperature of interface, MS source and quadrupole was set at 280°, 230° and 150 °C, respectively. Identification of volatile compounds and data pretreatment was conducted according to Pavlidis et al. (2019).

### 3.1.6. Data analysis

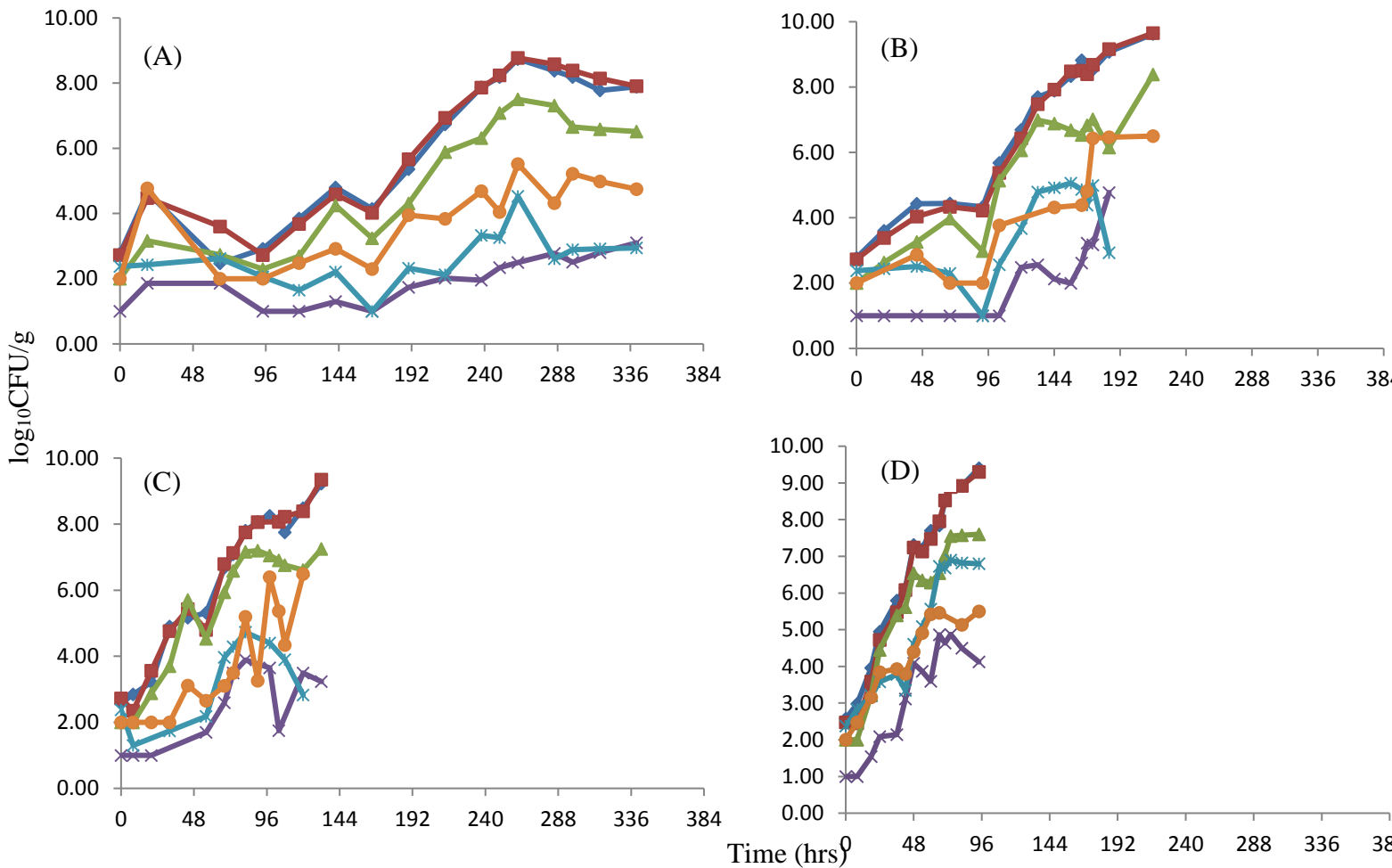
Analysis of variance (ANOVA) was applied in order to illustrate the pH changes with a statistical significance  $P < 0.01$ . The peak area of each metabolite derived from HPLC analysis was plotted against time using Excel (Microsoft Excel, 2010) to investigate the evolution trend during storage. Considering GC/MS dataset, the samples were normalized to constant sum and the volatiles (peak areas) were autoscaled. Hierarchical cluster analysis (HCA) was performed to the pretreated data to explore the relationship between variables (volatile compounds) and meat samples (quality classes). The results are graphically illustrated in the form of a heatmap using the online platform Metaboanalyst 4.0 (Chong, Wishart, & Xia, 2019). The support vector machines regression (SVM-R) model was developed through Statistica (StatSoft Inc. 2011; STATISTICA data analysis software system, version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)). The grid search was set for gamma: 0-0.6, capacity: 1-110, and e: 0.1 to 0.6 with an increment of 0.2, 1, and 0.01, respectively. Based on the four temperature subdatasets, the initial data matrix was partitioned  $\frac{3}{4}$  for training and  $\frac{1}{4}$  for testing purposes. The performance of the regression models was assessed in terms of RMSE (root means square error), the bias ( $B_f$ ) and accuracy factor ( $A_f$ ), the %relative error and the correlation coefficient (Ross, 1996).



## 3.2 Results and discussion

### 3.2.1. Development of the microbial association and pH measurement

Horsemeat consumption is very common in different European (EU) and non-EU countries. However, durability and microbial behavior to the different extrinsic factors (e.g. temperature) under storage and distribution is limited. Such knowledge could be useful to reduce food wastes. The microbial association of aerobically stored horse fillets stored under different isothermal conditions (0-15°C) was explored (Fig. 3.2.1). The microbiota (Total Viable Counts (TVC)  $2.77 \pm 0.10 \log_{10}\text{CFU/g}$ ) consisted of pseudomonads ( $2.72 \pm 0.17 \log_{10}\text{CFU/g}$ ), *B. thermosphacta* ( $2.00 \pm 0.00 \log_{10}\text{CFU/g}$ ), lactic acid bacteria (LAB) ( $1.00 \pm 0.00 \log_{10}\text{CFU/g}$ ), Enterobacteriaceae ( $2.37 \pm 0.10 \log_{10}\text{CFU/g}$ ) and yeasts and moulds ( $2.00 \pm 0.00 \log_{10}\text{CFU/g}$ ).



**Fig. 3.2.1:** Microbial association of aerobically stored horse fillets at 0°C (A), 5°C (B), 10°C (C), και 15°C (D)

◆ TVC ■ pseudomonads ▲ *B. thermosphacta* × lactic acid bacteria \* Enterobacteriaceae ● Y&M

It is evident that the dynamics of the microbial groups (Fig. 3.2.1) and their presence in the final microbiota were influenced by the temperature, observing higher growth rates ( $\mu_{\max}$ ) and lower lag-phase duration in higher storage temperatures (Table S3.1). At all temperatures tested (0-15°C), the dominant microorganism was pseudomonads, followed by *B. thermosphacta* and yeasts and moulds, while Enterobacteriaceae and LAB reached lower levels (Fig. 3.2.1). Regarding the latter, they exhibited differences among the tested temperatures ( $p < 0.05$ ). Except for 0°C (Fig. 3.2.1A), at all conditions tested, the level of TVC and pseudomonads at the end of shelf-life was constantly close to  $9 \log_{10}\text{CFU/g}$ . The level of *B. thermosphacta* was relatively constant as well, but always at least  $1 \log_{10}\text{CFU/g}$  lower than pseudomonads.

As far as the pH is concerned, the performed analysis of variance showed statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) during storage at different temperatures.

The microbial association and the magnitude of microbial groups found in this study, as well as their kinetic parameters (Table S3.1) are close to those found in animal origin products e.g. pork (Bruckner, Albrecht, Petersen, & Kreyenschmidt, 2013), beef (Argyri et al., 2011; Ercolini et al., 2006; Estelles-Lopez et al., 2017; Koutsoumanis, Stamatiou, Skandamis, & Nychas, 2006; Mann et al., 2016; Nychas et al., 2008; Papadopoulou, Panagou, Mohareb, & Nychas, 2013b; Sakala et al., 2002), lamb (Drosinos & Board, 1995), even fish (Zotta, Parente, Ianniello, De Filippis, & Ricciardi, 2019). Different studies related to horse meat referred LAB or yeasts and moulds as dominant bacterial species, instead of pseudomonads (Geeraerts et al., 2019; Pérez Chabela et al., 1999). From a hygiene point of view (EU regulation 2073/2005), attention should be paid on the high levels of enterobacteria found in abuse temperature at the end of the storage period (ca.  $10^5 \text{CFU/g}$ ), most probably due to the broad-spectrum  $\beta$ -lactamase applied on horses due to veterinary practices (Boyen et al., 2013). Considering pH (Table S3.1) is concerned the initial values measured were between with those reported for horse meat (Geeraerts et al., 2019; Malti & Amarouch, 2008; Pérez Chabela et al., 1999); <https://www.combase.cc/index.php/en/>).

Herein, a targeted study combining microbiological, and chemical (metabolic products) analysis took place. In this study the activation energies ( $E_a$ ) for  $\mu_{\max}$  were higher than pork and chicken (Bruckner et al., 2013) and lower than beef (Koutsoumanis et al., 2006). The Arrhenius model used to predict the shelf life (SL) values at each isothermal storage condition, setting  $8.0 \log_{10}\text{CFU/g}$  as safe minimal spoilage level. Pseudomonads could be considered a good index for microbiological assessment of aerobically stored horse fillets, showing the same performance as in beef and pork (Bruckner et al., 2013; Koutsoumanis et al., 2006).

### 3.2.2. Predictive modelling and shelf-life estimation

Estimated model parameters and observed vs. predicted plot for TVC are summarized in Table 3.1 and Fig. S3.1, respectively. The activation energy ( $E_a$ ) for  $\mu_{max}$  (eq. 4) for TVC and the two major spoilers ranged from 36.71 to 48.16 kJ/mol. The applied sub-optimal Ratkowsky square root model, resulted in the secondary equation  $\sqrt{\mu_{max}} = 0.013 * (T + 20.29)$  describing the T-dependency of  $\mu_{max}$  (Fig. 3.2.2A). The delivered coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.99, while  $T_{min}$  was estimated at  $-20.29^\circ\text{C}$  ( $p=0.002$ ). The provided tertiary model from the software (combining the primary and secondary equation discussed) utilized to check whether the TVC kinetics in horse is similar to beef. Therefore, we run simulations using validation data from combase (<https://www.combase.cc/index.php/en/>) for beef with similar initial pH. The results for observed vs. predicted values are visualized in supplementary Fig. S3.2.

**Table 3.1:** Estimated model parameters of the sub-optimal Ratkowsky equation to describe the temperature dependency of  $\mu_{max}$  of TVC

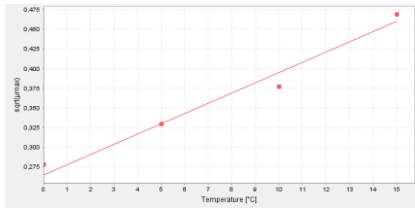
<sup>1</sup> Model parameter	Estimated value	<sup>2</sup> SE	p-value	<sup>3</sup> rmse	<sup>4</sup> R <sup>2</sup>
b	0.013	0.002	0.0155	0.01	0.97
$T_0$ ( $^\circ\text{C}$ )	-20.29	3.829			

<sup>1</sup>calculated model parameter of the sub-optimal Ratkowsky equation, <sup>2</sup>SE: Standard Error, <sup>3</sup>RMSE: root mean square error, <sup>4</sup>R<sup>2</sup>: coefficient of determination

Further, the shelf life (SL) of aerobically stored horsemeat was calculated deterministically for each isothermal temperature tested (Table 3.2). In particular, the time required by TVC to multiply from the initial to the minimum spoilage level (MSL) ( $8.0 \log_{10}\text{CFU/g}$ ), was 263, 177, 90, and 59 hrs at 0, 5, 10, and  $15^\circ\text{C}$ , respectively. The particular MSL was chosen as no signs of spoilage no evident signs of spoilage appear until the end of storage period. The derived equation as well as the respective parameters is described in Fig. 3.2.2.B. In the case where pseudomonads used as index, the shelf-life was reduced at chill temperatures (0 and  $5^\circ\text{C}$ ). The calculated activation energy ( $E_a$ ) was 63 and 61 kJ/mol for TVC and pseudomonads, respectively (Table 3.2).

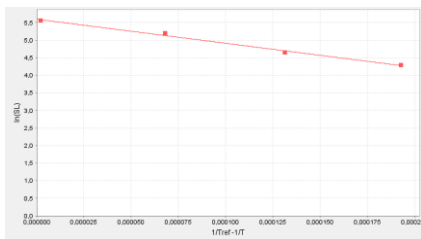
(A)

$$\sqrt{\mu_{max}} = 0.013 * (T + 20.29)$$



(B)

$$\ln(SI) = 5.595 - 6856.39 * \left(\frac{1}{273} - \frac{1}{T}\right)$$



**Fig. 3.2.2:** A: Predictions of the Suboptimal Ratkowsky square-root model (equation 1) for the effect of temperature on the maximum specific growth rate of Total Viable Counts; B: Predictions of the modified Arrhenius equation for the effect of temperature on the shelf life of aerobically stored horse fillets.

**Table 3.2.:** Shelf life estimation in hrs of aerobically stored horse fillets for each temperature, using Total Viable Counts (A), *Pseudomonas* spp. (B), and *B. thermosphacta* as indexes

<sup>1</sup> T	<sup>2</sup> OMX	<sup>2</sup> <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>B. thermosphacta</i>
0	263	254	299
5	177	169	213
10	92	90	95
15	59	58	77
<sup>3</sup> Ea	63	61	64
<sup>4</sup> Ea_μ <sub>max</sub>	46	37	48
<sup>4</sup> R <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.95

<sup>1</sup>T: θερμοκρασία (°C), <sup>2</sup>SL: εμπορική διάρκεια ζωής (Shelf-life), <sup>3</sup>Ea: ενέργεια ενεργοποίησης χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius (kJ/mol) (εξίσωση 3), <sup>4</sup>R<sup>2</sup>: συντελεστής προσδιορισμού

### 3.2.3. HPLC analysis

The HPLC-DAD-RI analysis of aerobically stored horse fillets resulted in the presence of 14-16 discrete peaks using PDA and RI detector respectively at the beginning and end of shelf-life. Among 110 analyzed samples, the identified organic acids (OACs) through PDA detector with ascending elution order were citric, pyruvic, succinic, lactic, formic, acetic, propionic, isobutyric and butyric, as well as glucose and ethanol in RI. Following the metabolite kinetics, the amount of succinic ( $p < 0.01$ ) and lactic acid decreased, while the propionic acid ( $p < 0.001$ ) decreased at all tested temperatures, except from chill storage (0°C), where its area slightly metabolized. Although formic acid decreased during storage at 0-10°C, an increase was evident when the TVC reached 8.5 log<sub>10</sub>CFU/g in samples stored at abuse temperature (10 & 15°C). Lastly, the concentration of glucose initially increased and after the midpoint of storage, it started to decrease ( $p < 0.001$ ). On the other hand, the concentration of the citric, acetic, butyric, isobutyric and pyruvic acids increased ( $p < 0.01$ ) at all storage temperatures.

Subsequently, regression models using three out of four temperature sub-datasets for training and the last one for testing were applied. When the datasets of 0, 5, and 15°C were used to calibrate the model and the dataset of 10°C to test it, the developed radial basis function support vector machine (rbf-svm) regression model yielded satisfactory predicted values (Fig. S3.3A, supplementary material) with a correlation coefficient (R<sup>2</sup>) of 0.915 and 0.910 for training and testing dataset, respectively. The assessment of the model performance by means of accuracy

( $A_f$ ) and bias factor ( $B_f$ ) and root mean square error is described in Table 3.3. The values of  $B_f$  were always close to unity, indicating good agreement between observations and estimations, while  $A_f$  showed that the average deviation of observed and predicted values ranged from 12-18%. Lastly, when the sub-dataset of 5°C was used to test the model developed by the data from 0, 10 and 15°C, the results were poorer (Table 3.3). In this case, the SVM-R model showed a tendency to overestimate the population of TVC until ca. 6.0 log<sub>10</sub>CFU/g, whereas after this value, an underestimation of TVC was evident (Fig. S3.3B). The evolution of organic acids followed the same trend as in other red meats (Argyri et al., 2011; Drosinos & Board, 1995; Koutsoumanis et al., 2008; Nychas et al., 2008; Skandamis & Nychas, 2002). In general, the amount of citric, acetic and butyric increases, in parallel with the decrease of formic, lactic, propionic, and succinic during the aerobic storage of red meats. The above mentioned analytes have been correlated with the activity of the spoilage (*Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria) microbiota (Argyri et al., 2011; Ercolini et al., 2011, 2006; Garcia-Lopez, Prieto, & Otero, 1998; Lytjou et al., 2018; Nychas et al., 2008; Zaunmüller, Eichert, Richter, & Uden, 2006). In general, horse meat contains a large amount of glycogen and adenosine triphosphate (ATP) and therefore retains a degree of plasticity and elasticity for a long time (Rossier, 2003). This may be the reason why glucose initially increased and then decreased, a fate which differs from the other reported red meats (Argyri et al., 2011; Drosinos & Board, 1995; Nychas et al., 2008) where glucose depletes at the end of shelf-life during aerobic storage. It has been demonstrated that by increasing the availability of glucose in meat, spoilage defined as proteolysis, slime, or off-odour production is postponed (Nychas et al., 2008). This statement is confirmed here, where non-visible signs of spoilage were evident in our tested samples throughout the storage period.

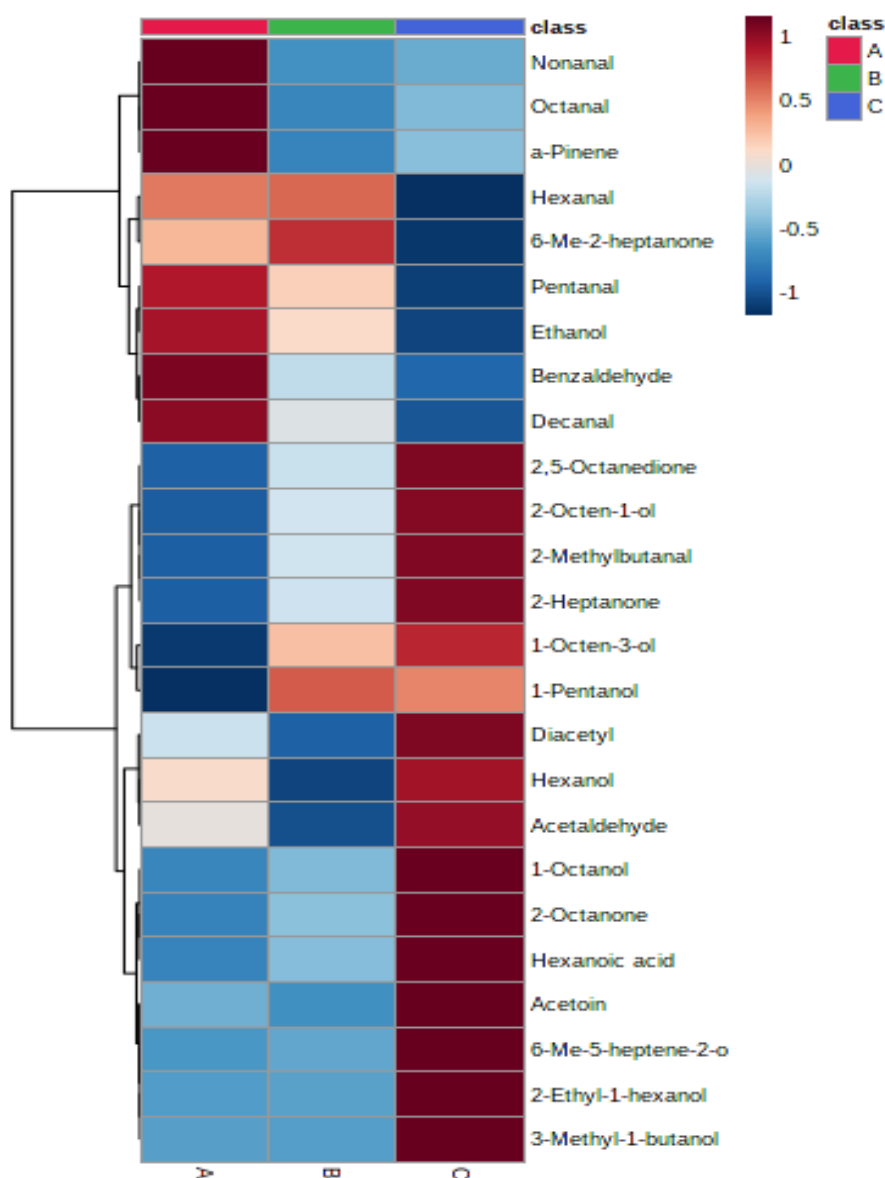
**Table 3.3:** Support vector machine regression model performance using radial basis function kernel (rbf-SVM-R), (A): training dataset: 0, 10 and 15°C, testing 5°C and (B): training dataset: 0, 5 and 15°C, testing 10°C, for the prediction of Total Viable Counts (TVC)

	$B_f$	$A_f$	RMSE	cv	% inside RE $\pm 20\%$
<b>Train_0,5,15</b>	1.01	1.12	0.93	0.90	80
<b>Test_10</b>	1.05	1.13	0.85	0.93	86
<b>Train_0,10,15</b>	1.05	1.18	1.15	0.85	74
<b>Test_5</b>	0.98	1.18	1.38	0.768	76

<sup>1</sup>: 10-fold cross-validation, <sup>2</sup> $B_f$ : Bias factor; <sup>3</sup> $A_f$ : Accuracy factor; <sup>4</sup>RMSE: root mean square error; <sup>5</sup>r: correlation coefficient, <sup>6</sup>%RE: relative error

### 3.2.4. HS/SPME-GC/MS analysis

Samples at the beginning (day 0), midpoint and end of storage were analyzed for their corresponding volatile metabolites. The samples were grouped into three classes according to microbial load as follows: class A:  $< 4.6 \log_{10}\text{CFU/g}$ ; class B:  $4.6\text{-}7.2 \log_{10}\text{CFU/g}$ ; class C:  $>7.2 \log_{10}\text{CFU/g}$ . The selection was based on the derived BETA4 cumulative distribution (Fig. S3.4). The observations were subjected to distribution fitting with 3 intervals, where it was shown the upper and lower bound of each microbial class. Hierarchical cluster analysis was performed using Euclidean distance as the similarity measure of the 45 volatiles identified in the different meat samples and Ward's linkage as clustering algorithm. The results are presented in Fig. 3.2.3 as heatmap of the 25 most significant metabolites based on Kruskal-Wallis ANOVA.



**Fig. 3.2.3.:** Heatmap representation generated from Hierarchical Cluster Analysis of 25 most significant volatiles associated with the three classes of horse meat according to the microbial load during storage (class A: TVC < 4.6 log<sub>10</sub>CFU/g; class B: 4.6 < TVC < 7.2 log<sub>10</sub>CFU/g; class C: TVC > 7.2 log<sub>10</sub>CFU/g). The color scale of cells represents the abundance of each volatile, with red indicating high abundance and blue indicating low abundance.

It is evident that samples with low TVC microbial load (<4.6 log<sub>10</sub>CFU/g) were characterized mainly by high amounts (red cells) of linear chain aldehydes with 5-10 carbon atoms, such as pentanal, hexanal, octanal, nonanal and decanal. On the contrary, these compounds were present in low amounts (blue cells) in samples with high TVC load (>7.2 log<sub>10</sub>CFU/g). The volatilome of the latter comprised mainly of higher amounts of alcohols and ketones, as well as acetaldehyde, 2-methylbutanal and hexanoic acid. In particular, regarding alcohols, 1-hexanol, 1-octanol, 1-octen-3-ol, 2-octen-1-ol, 3-methyl-1-butanol, as well as the ketones acetoin, diacetyl, 2-heptanone, 2-octanone, 6-methyl-5-hepten-2-one and 2,5-octanedione were highly correlated with class C (TVC >7.2 log<sub>10</sub>CFU/g). Lastly, the areas of hexanal, pentanal, and 1-octen-3-ol reach to a maximum at the midpoint of storage, in samples with TVC > 4.6 and <7.2 log<sub>10</sub>CFU/g and after this point they decreased.

The majority of volatile compounds identified and highlighted above are well known products of microbial metabolism and have been identified in other red meats (Argyri et al., 2015; Casaburi et al., 2015a; Ercolini et al., 2010; Frank et al., 2020; Mansur, Seo, et al., 2019; Pavlidis et al., 2019). However, it has been proposed that some alcohols can derive through oxidation process, as well. In particular, 1-octen-3-ol can be produced from the oxidative breakdown of linoleic acid (Insausti et al., 2002) which is abundant fatty acid in horse meat (Lee et al., 2007).

It is noteworthy that esters, such as ethyl acetate, ethyl butanoate and isoamyl acetate, were detected only at the final stage of storage in very low amounts. This observation differentiates the volatilome of horse meat with that of other common meat species, where esters are abundant during the whole period of aerobic storage (Argyri et al., 2015; Casaburi et al., 2015; Ercolini et al., 2010; Frank et al., 2020; Mansur et al., 2019a, 2019b). This phenomenon could be ascribed to two facts: either the released fatty acids from the lipolytic activity were converted to aldehydes, ketones or alcohols, or there was a defect or deficiency of a single enzyme related to the esterification process (Ercolini et al., 2010).

A glimpse into the metabolome of foods during storage will transform the microbiological condition into signals and informative compounds, which could act as biomarkers (Ellis & Goodacre, 2001; Jay, 1986). HPLC analysis has been applied previously in the prediction of the



microbiological condition and spoilage assessment of minced beef utilizing different process analytical methods (PAT) with similar (Argyri et al., 2011) or improved (Estelles-Lopez et al., 2017) results. In our case, two dataset partitions were performed. In the first case, when data from 0, 5, 15°C used to train the model and 10°C to test it, a higher linearity between estimated and calculated TVC values was observed. Regarding the case where the samples at 0, 10, and 15°C used to train the model and that of 5°C to test it, the rbf-SVM regression model yielded in lower results. The lower performance could be explained from the fact that the data at chill temperature were insufficient for the model to learn and that the production of the metabolites was not so pronounced. Albeit the correlation is lower compared to other analytical platforms, such as enose (Mohareb et al., 2016) and GC/MS (Argyri et al., 2015). In any case, it can serve as an informative methodology for the screening of microbial metabolites, as well as a rapid pre-screening tool that could partially substitute the time-consuming conventional plating method so as to reduce the food wastes.

### 3.3. Conclusion

High-quality products being part of the “*gastronomics*”, in particular horsemeat are quite unexplored from a microbiological and metabolite point of view. This study demonstrated for the first time the microbial association and metabolites in raw horse fillets during aerobic storage, which was found similar to other red meats reported in the literature. The dominant microorganisms in both abuse and chill temperatures were always pseudomonads followed by *B. thermosphacta*. In addition, the developed secondary models could describe satisfactorily the dependency of  $\mu_{\max}$  and shelf-life from temperature. However, validation with independent datasets is needed, in order to check the ability of the model to predict the status of unknown samples.

Once more, the potential of metabolomic-based techniques in the prediction of microbiological condition of food seems to deliver acceptable results in time-efficient period. Summarizing, improvements in the sensitivity of the metabolomics-based approach applied in this study could lead to improved performance. One of our tasks in the future will be the utilization of HPLC and GC/MS as an informative platform for authentication and/or adulteration purposes.

**Chapter IV: Volatilomics in tandem with HPLC and multivariate data analysis  
for the assessment of microbial spoilage of aerobically stored beef fillets,  
potential microbial biomarkers and contribution of enterobacteria to  
metabolome formation**

## 4.1. Materials and Methods

Further, to screen potential microbial biomarkers, beef meat with and without the background flora was stored aerobically under isothermal simulation conditions.

### 4.1.1 Beef samples preparation

A block of fresh de-boned beef from an Athenian (Greece) processing plant was transported under refrigeration to our laboratory within 1 h. It was divided into two equal parts and then treated according to Tsakanikas et al (Tsakanikas et al., 2016), resulting beef fillets with ( $>1.0 \log_{10}\text{CFU/g}$ ) and without ( $<1.0 \log_{10}\text{CFU/g}$ ) the background flora. Briefly, the first meat sub-block was hanged, and its surface was sprayed with 100% alcohol following ignition with a gas burner to eliminate the initial microbial load. The burnt surface was removed aseptically in a laminar flow air cabinet, and the sterile tissue below was excised, cut into beef fillets of ~15-25) and placed individually into sterile Petri dishes to avoid environmental contamination. The second sub-block, the one with the background flora, was cut into smaller individual beef fillets of the same size as previously. To simulate the same aeration conditions, samples were placed onto Petri dishes as well. Both sterile and naturally contaminated beef fillets stored aerobically at 2, 8 and 15°C in high precision ( $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) incubation chambers (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan). Lastly, new, independent sterile meat batch was derived as above and stored at 2 and 15°C to validate the results. Sterile samples will be referred to as “St” and the naturally contaminated as “NC” with the indicator of the batch (i, ii) and temperature for each occasion (Sti<sub>2</sub>, Sti<sub>8</sub>, Sti<sub>15</sub>, Stii<sub>2</sub>, Stii<sub>15</sub>, NC<sub>2</sub>, NC<sub>8</sub>, NC<sub>15</sub>).

### 4.1.2. Meat contamination with enterobacteria and aerobic storage

The *Hafnia alvei* B295 and *Serratia liquefaciens* B293 isolates from Doulgeraki et al., (2011) were subcultured twice in 100 ml TSB broth (LAB 100Z, LAB M, Bury, UK) at 37°C for 18 h. Cells were harvested by centrifugation (5000g for 10 min at 4°C), and washed twice with sterile quarter strength Ringer's (LAB 100Z, LAB M, Bury, UK) solution and resuspended in the same medium. Sterile beef fillets from an independent third batch were spiked with 300µl (150µL / surface) to obtain an initial concentration  $\sim 2 \times 10^2 \text{ CFU/g}$  on the meat. Then, they were left at fridge temperature for 30 min to attach the bacterial suspension. Inoculum size was tested in a previous pre-experiment, in order to have in 25, 10 and 1 g of sampling the same bacterial load.

Ringer-inoculated sterile fillets were used as controls. An equal number of sterile and inoculated samples were stored aerobically at 4 and 10°C. At 24 and 12 hrs respectively, samples were analyzed in duplicate microbiologically and for the respective microbial metabolites (utilizing HS/SPME-GC/MS and HPLC). All colonies plates were examined for phenotypic characteristics associated with the micro-organisms.

#### 4.1.3. Microbiological and pH analysis

Meat samples (10 g) were weighed aseptically, added to 90 mL of sterile quarter strength Ringer's solution (LAB 100Z, LAB M, Bury, UK) and homogenized in a stomacher bag (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) for 60s at room temperature. Serial decimal dilutions in the same solution were prepared and 0.1 mL samples of appropriate dilutions poured or spread in triplicate on Tryptic Glucose Yeast Agar (402145, Biolife, Milan, 112 Italy) incubated at 30°C for 48-72 h for Total Viable Counts (TVC). For enumeration of Enterobacteriaceae in the inoculated fillets, 1 mL samples of appropriate dilutions poured in triplicate on Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA; 402188, Biolife, Milan, Italy), overlaid with the same medium and incubated at 37°C for 18-24h. Sterility of theoretically sterile was always checked in TGY agar with a limit of detection 1 log<sub>10</sub>CFU/g. After microbiological analysis in duplicate, all samples were maintained at -80 °C until further analysis.

#### 4.1.4. HPLC-PDA-RI Analysis

The extraction of organic acids, glucose and ethanol from all NC, and selected St, Ha and Sl took place according to (Pavlidis, Mallouchos, & Nychas, 2021) with minor modifications. In brief, 2.5g of beef fillets were cut into smaller pieces and homogenized with 5mL of ultrapure water (Sigma-Aldrich) using a glass rod for 2 min. After centrifugation (5000g for 10 min at 4°C), 2.5mL of the supernatant was collected in a clean falcon tube, and 1% v/v of TrifluoroAcetic Acid solution (25µL TFA) was added for protein precipitation. After stirring for 1 min and centrifuging (at the same conditions as those described before), the supernatant was collected, filtered through a filtering paper and 25µL of 1% (v/v) sodium azide were added as a preservative. Before analysis, the final extracts were filtered through 0.22 µm syringe filters (PVDF, Millipore).

HPLC analysis was conducted according to (Pavlidis et al., 2021) on a JASCO system (Tokyo, Japan). The separation of compounds was performed in an Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at 65 °C using 0.009 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as a mobile phase at a flow rate of 0.7

mL/min. Injection volume was set to 20  $\mu$ L. Compound identification was effected by comparing the retention time and UV-Vis spectrum (200-650nm) with those of authentic compounds. Samples were analyzed in duplicate and the average of the peak areas of the chromatogram at 210 nm was used for organic acids (oxalic, tartaric, citric, pyruvic, malic, succinic, lactic, formic, acetic, propionic, isobutyric, butyric, and isovaleric), whereas for glucose and ethanol the peak areas of RI chromatogram were used in subsequent data treatment.

#### 4.1.5. Volatilome analysis by Headspace SPME-GC/MS

Sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry analyses were performed as described in (Pavlidis et al., 2019, 2021). Briefly, 2.5g of beef fillets were cut into smaller pieces and 5mL of 25% (w/v) NaCl solution was added into a 20 mL glass vial (Supelco) and homogenized with a glass rod for 2 min. The vial was fitted with a screw cap with hole and PTFE/silicone septum (Sigma Aldrich, Germany) and the contents were magnetically stirred for 15 min at 40 °C. A DVB/CAR/PDMS - 50/30 $\mu$ m fibre (length 1 cm, Sigma Aldrich, Germany) was exposed to the headspace for another 30 min under the same conditions, to absorb the volatile compounds. Desorption of volatiles took place in the injection port of GC-MS for 5min. Before each analysis, the fiber was exposed to the injection port of another GC for 5min to remove any volatile contaminants.

GC-MS analyses were performed on an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to an Agilent 5973C mass spectrometer. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. The injection port was equipped with a liner (0.75 mm i.d., Agilent) suitable for SPME analysis. It was operated in split mode (split ratio 1:2) at 250 °C. Separation of compounds was performed on an HP-5MS capillary column (30m $\times$ 0.25 mm, d.f. 0.25  $\mu$ m, Agilent). Oven temperature was maintained at 40 °C for 5 min, programmed at 4 °C/min to 150 °C and then it was raised to 250 °C with a rate of 30°C/min and held for 5 min. The mass spectrometer was operated in electron ionization mode with the electron energy set at 70 eV and a scan range of 29–350 m/z (scan rate: 4.37 scans/s, gain factor: 1). The temperature of the interface, MS source and quadrupole was set at 280°, 230° and 150 °C, respectively.

#### 4.1.6. ATR/FT-IR measurement

FTIR spectra collection of SI, Ha and Stiii were acquired using an FT/IR 6200 JASCO spectrometer (Jasco Corp., Tokyo, Japan). Small portions of the Stiii and inoculated fillets (~3 g) were placed on the surface of a ZnSe 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) crystal (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, United States) and spectra were collected from 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$  using the Spectra Manager software version 2 (Jasco Corp.). In order to increase the signal-to-noise ratio, 250 scans with

a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  were selected. Before the measurements, reference spectra were acquired using the crystal with no added meat. After each measurement, the crystal's surface was cleaned using firstly detergent and distilled water and secondly with analytical grade acetone, and dried with a lint-free tissue.

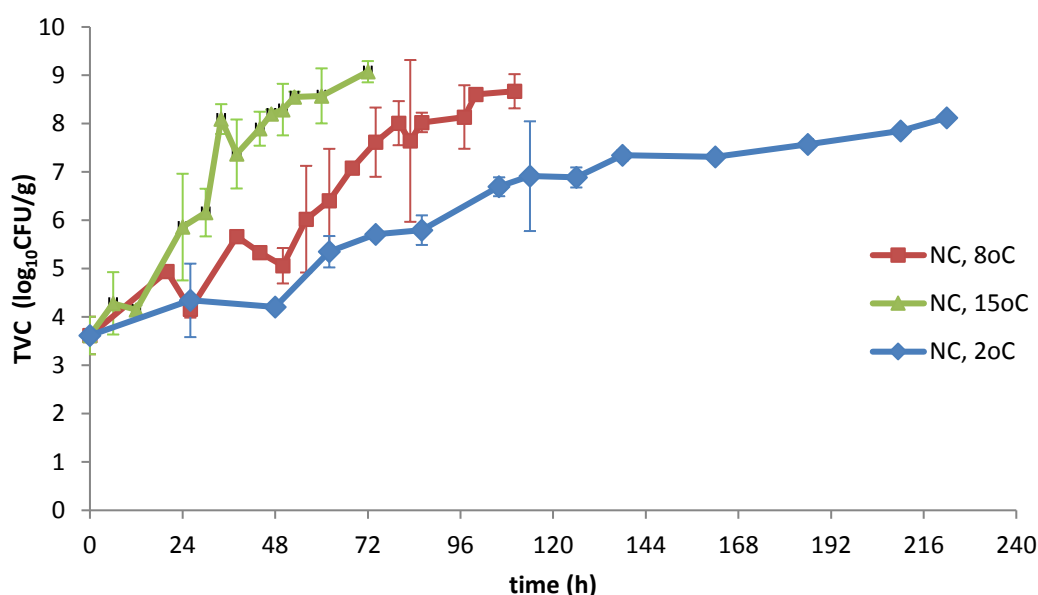
#### 4.1.7. Data collection and processing pipeline

Microbial data fitting took place with DmFit 3.0. (<https://www.combase.cc/index.php/en/>). GC/MS data processing pipeline has been described elsewhere (Pavlidis et al., 2019). The software Jasco Chrompass Chromatography Data system v1.7.403.1. used for high-throughput HPLC data processing utilizing a peak-ID table with  $\pm 0.2$  min slope. The resultant data matrix was amounts of metabolites linked to each sample injection. Multivariate Analysis of variance (MANOVA) with a statistical significance  $p < 0.05$  and/or  $< 0.01$  was applied to determine the effect of microbes on the fate of metabolites. The analytes of GC/MS and HPLC were mapped with Kegg-labelling (Table S4.1, column 4) and pathway analysis was carried out using Metaboanalyst 4.0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)). Data were  $\log_{10}$ -transformed and then auto-scaled. Radial basis function Support Vector Machine (RBF/SVM-R) took place through Statistica (StatSoft, Inc. 2011; STATISTICA data analysis software system, version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)). Partial Least Squares Discriminant Analysis was performed through Unscrambler X (Demo mode, 10.4, CAMO Software, Norway). The performance of regression models was assessed, by calculating the RMSE (root means square error) and the Bias and Accuracy factor (Argyri et al., 2015; Estelles-Lopez et al., 2017; Pavlidis, Mallouchos, & Nychas, 2021), the %relative error (%RE (Ross, 1996)) and the correlation coefficient. For classification models, the per class and total correct classification were measured (Pavlidis et al., 2019; Sokolova & Lapalme, 2009).

## 4.2. Results

### 4.2.1. Microbiological load and pH measurement

The microbiota across NC samples during aerobic storage ranged from  $3.50 \pm 0.09$  to  $9.30 \pm 0.13$   $\log_{10}$ CFU/g (Fig. 4.1). Besides, spoilage potential of *Hafnia alvei* B295 and *Serratia liquefaciens* B293 was monitored as monocultures in in-situ contaminated aerobically stored sterile beef fillets (Fig. S4.1). On the contrary, St did not exceed 1-2  $\log_{10}$ CFU/g (limit of detection), even in latter storage, while no signs of spoilage were evident. Table S4.2 summarizes kinetic parameters of the measured microbial groups following data fitting using the Baranyi and Roberts' equation (Baranyi & Roberts, 1994). The microbial shelf-life was 86 (3.5 days), 120 and 216 h (9 days) for 15, 8, and 2°C respectively.

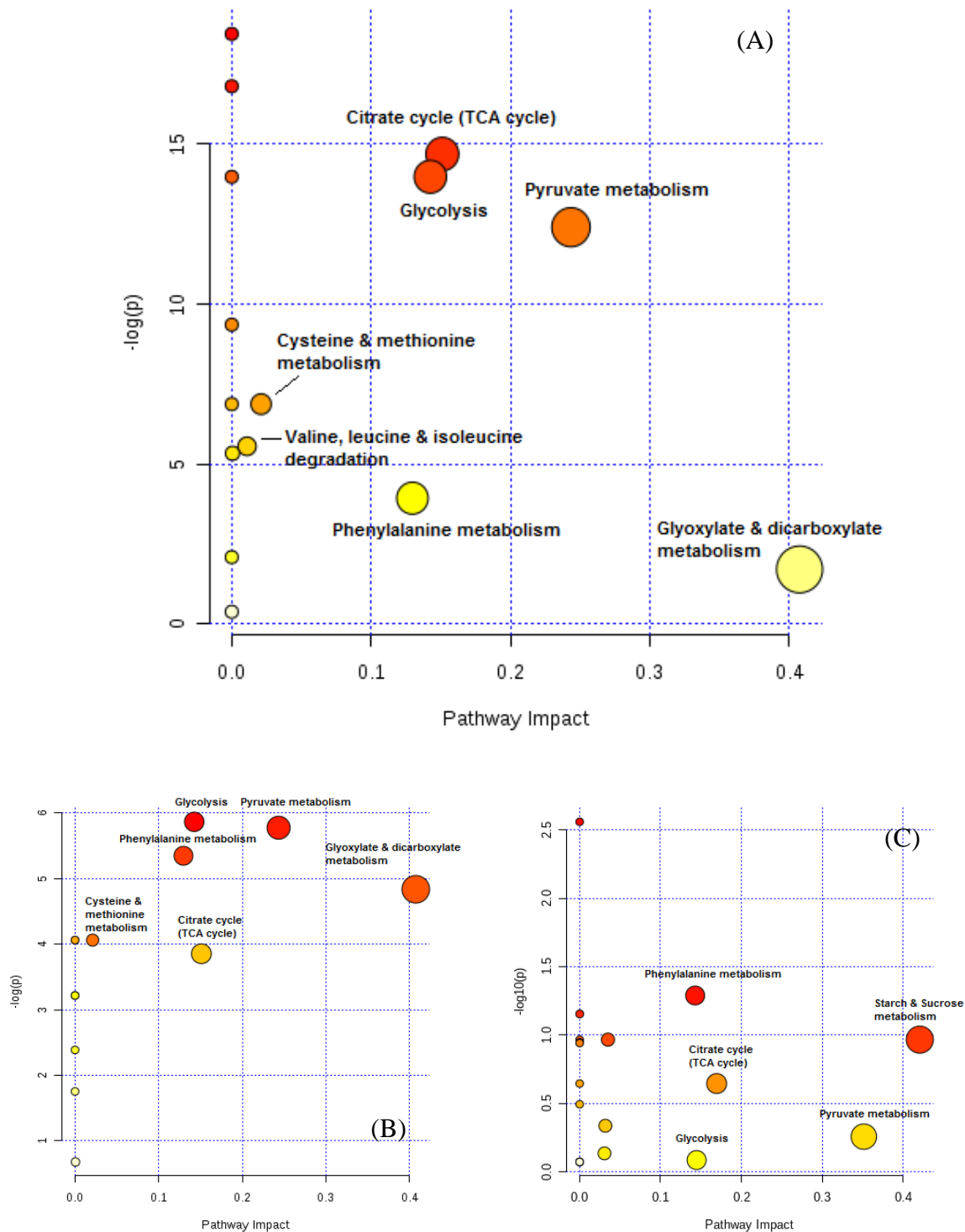


**Fig. 4.1:** Total viable counts (TVC) (mean  $\pm$  standard deviation) of naturally contaminated (NC) beef fillets during aerobic storage at 2 (blue), 8 (red) and 15°C (green) under isothermal conditions.

### 4.2.2. HPLC and pathway analysis

The analysis of raw meat through HPLC-PDA-RI resulted in the identification of 13 and 14 compounds in the St and NC samples, respectively (Table S4.1). MANOVA exhibited significant ( $p < 0.01$ ) differences between samples with and without the background flora. Fig. 4.2 represents KEGG enrichment analyses in *Bos Taurus* (cow) for NC, Sl, and Ha. It was shown that pyruvate, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, and citrate cycle (TCA cycle),

glycolysis, and amino acid catabolism were the most significant ( $p < 0.01$ ) with the highest impact for sample with the background flora (NC) (Fig. 4.2A).

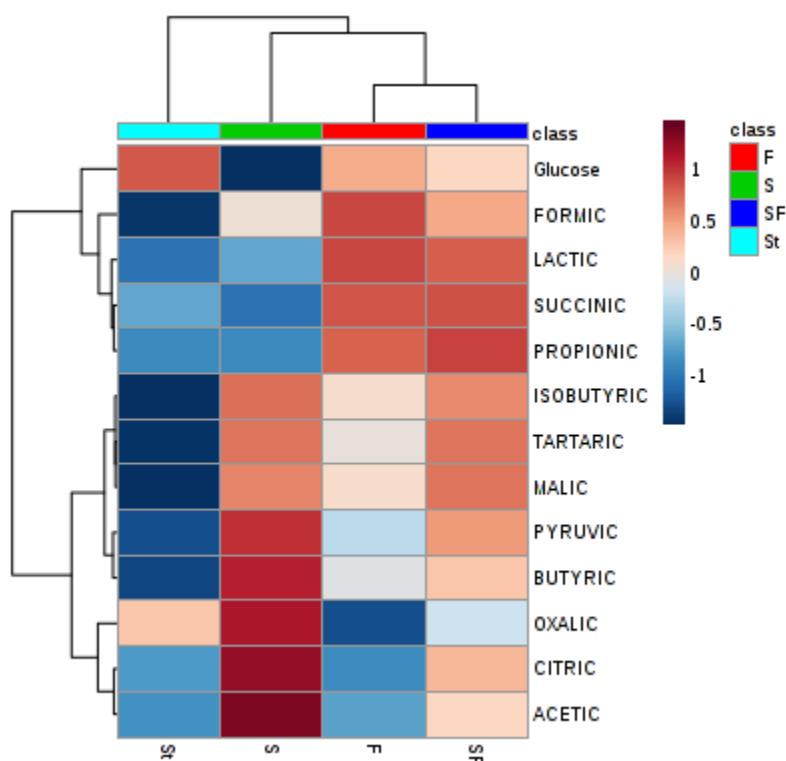


**Fig. 4.2:** Pathway analysis with the metabolites mapped in a KEGG pathway (accessible at <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). In the scatter plot the x-axis indicates the impact whereas the y-axis significant changes in a pathway (p-value)



(red: high probability and high impact and orange: indicate low probabilities pathways with high impact; A: NC, B: *S. liquefaciens*, C: *H. alvei*)

Succinate, propionate, lactate, formate were positively correlated with NC samples with TVC < 5.80 log<sub>10</sub>CFU/g (Fig. 4.3). Glucose was the only positively correlated compound with Sti (Fig. 4.3), as its concentration was not affected during storage. In parallel, the compounds oxalic, pyruvic, citric, acetic, and butyric acid correlated positively with S samples (TVC > 7.0 log<sub>10</sub>CFU/g).



**Fig. 4.3:** Heatmap expressing the correlation of the 13 identified compounds through HPLC-PDA-RI with meat classes (F: <5.8; 5.8 < SF<7.0; S: >7.0 log<sub>10</sub>CFU/g; St: 1 log<sub>10</sub>CFU/g; Red: High correlation, Blue: low or no correlation between compounds and groups)

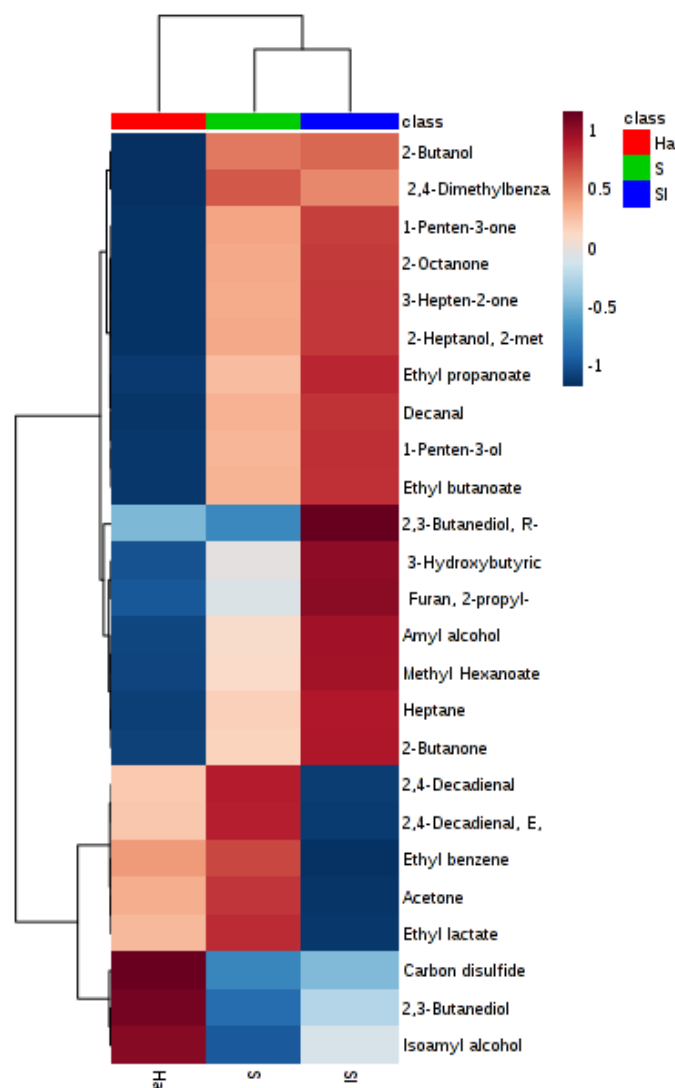
Regarding Enterobacteriaceae strains, it was noticed that glucose, lactate, formate, propionate, and succinate (p<0.05) together with ethanol were consumed during aerobic storage with a higher rate in 10°C and SI. On the other hand, both were able to produce citric, acetic and malic acids being SI the higher producer (p<0.05).

#### 4.2.3. VOCs metabolism

In total 101 NC, 88 Stii, 16 Stiii, 12 SI and 14 Ha samples were analyzed in this study. However, St exhibited weak chromatograms (low intensities of the peaks) with low variability of compounds. MANOVA demonstrated statistically significant differences (p<0.05) between the

majority of the compounds of Nc and St (Table S4.1). The metabolite-kinetics during storage was either increased, decreased or two-phase profile. In the last case, they initially increased until the TVC reached  $\sim 6.5 \log_{10}\text{CFU/g}$ , and decreased afterwards until the end of the storage period (Table S4.1, columns 5-14).

For instance, the amounts of 3-methyl-butanol, 2-pentanone, diacetyl, acetoin increased polynomial in NC ( $p < 0.01$ ) and inoculated ( $p < 0.05$ ) beef fillets in all simulation conditions. Even though 2-methyl-butanol, 3-&2-methyl-butanol, 2-methyl-propanal, 2-methyl-1-propanol acetaldehyde, 2-heptanone and 2-nonanone were not detected from the beginning of the storage, they showed a sharp increase for NC. Besides, all remain stable or did not detect at all in St. Further, temperature and species-dependent increase of these compounds except for 2-nonanone were evident for SI ( $p < 0.05$ ) and Ha. The equation describes the evolution of the compounds at 15 and 8 oC is  $y = a \cdot t^3 + b \cdot t^2 + c \cdot t + d$  (Table S4.3).



**Fig. 4.4.:** Heatmap representation generated from Hierarchical Cluster Analysis of 25 most significant volatiles associated with Stiii, Ha, Sl (S:  $<1.0 \log_{10}\text{CFU/g}$ , Ha: *Hafnia alvei*, Sl: *Serratia liquefaciens*)

This was not the case for 2-ethyl-1-hexanol, 2-octen-1-ol, and 2-octanone, which although increased in NC, Ha and Sl, they increased in St as well. The esters, ethyl propionate, ethyl acetate, ethyl hexanoate, and butyl acetate increased, except for ethyl acetate which decreased after the TVC  $6.5 \log_{10}\text{CFU/g}$  during the simulation at 2 and 8°C. Association of compounds with Ha, Sl, St<sub>iii</sub> is presented in Fig. 4.4. Additional compounds found to be produced by both strains were methanethiol, 1-butanol, 3-methyl-, acetate, 2,3-butanediol, benzeneacetaldehyde, and benzaldehyde. On the contrary, the concentration of ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-penten-3-ol, 1-octen-3-ol, pentanal, hexanal, heptanal, octanal and 2,5-octanedione exhibited two-phase profile. Besides, their abundance increased in St in all temperatures and batches tested). In this study, we found that our strains can produce these alcohols with temperature dependency rate ( $p<0.05$ ) and between the two, *S. liquefaciens* B293 seems to be the higher producer. Regarding linear aldehydes, they were decreased in Ha and Sl from the beginning of storage, showing significant differences for pentanal and octanal ( $p<0.05$ ).

#### 4.2.4. Assessment of spoilage through HPLC and GC/MS and data fusion

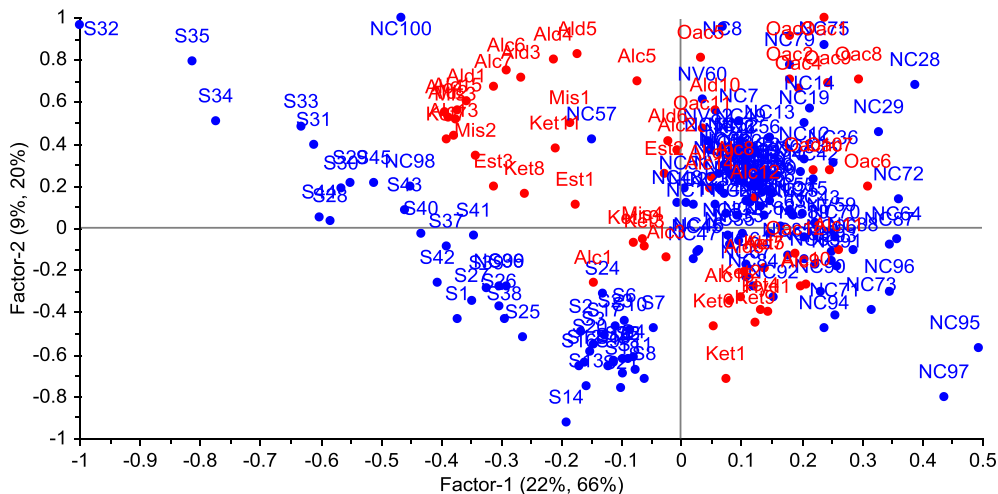
The derived datasets (i) HPLC, (ii) GC/MS and (iii) fusion (HPLC & GC/MS), were analyzed by different pattern recognition methods. The first task was to investigate whether the contaminated samples could be discriminated from the sterile (NC Vs. S). Consequently, PLS-DA classifier was applied to the transformed dataset (log- & auto-) (Fig. 4.5 & S4.2). Table 4.1 summarizes the performance of the developed classification models and compares each dataset.

**Table 4.1:** Confusion matrix of NC Vs. St as derived from the 3 datasets using PLS-DA classifier (each line represents the sensitivity: %correct classification)

Class	HPLC <sup>A</sup>			GC/MS <sup>B</sup>			HPLC & GC/MS <sup>C</sup>		
	Train	Test	Val	Train	Test	Val	Train	Test	Val
<sup>1</sup> NC	100	100	100	100	100	93.75	100	100	100
<sup>2</sup> St	100	100	100	100	96.92	68	100	100	100
<sup>3</sup> Accuracy	100	100	100	100	98.50	83.93	100	100	100

<sup>1</sup>NC: Naturally contaminated beef fillets; <sup>2</sup>St: Sterile beef fillets; <sup>3</sup>Accuracy: Overall correct classification, A&C: 101 NC and 46 sterile, B: 101 NC and 88 sterile

From the PLS-DA plot for St Vs. NC for the fusion dataset, it is evident that the St are clustered on the right (negative values) whereas the NC on the left (Fig. 4.5). The alc1 (ethyl alcohol), alc4 (pentanol), alc6 (heptanol), alc13 (1-penten-3-ol), alc14 (4-penten-2-ol), alc15 (1-octen-3-ol), est1 (methyl acetate), ket7 (2,5-octanedione), ket8 (6-methyl-5-hepten-2-one), ket11 (2-octanone), ket10 (acetone), mis1 (glucose), mis2 (2-ethyl-furan), mis3 (2-pentyl-furan), ald1 (pentanal), ald2 (hexanal), ald3 (heptanal), ald4 (octanal), ald5 (nonanal) and ald6 (decanal) were positively correlated with sterile samples, while the rest with the naturally contaminated. These are Alc2 (propanol), Alc3 (butanol) Alc5 (hexanol), Alc7 (octanol), Alc8 (2-butanol), Alc9 (3-methyl-1-butanol), Alc10 (2-methyl-1-butanol), Alc11 (2-methyl-1-propanol), Alc12 (4-methyl-2-pentanol), Alc16 (2-ethyl-1-hexanol), the  $\alpha\lambda\delta\epsilon\upsilon\delta\epsilon\varsigma$  Ald7 (3-methyl-butanal), Ald8 (2-methyl-butanal), Ald9 (2-methyl-propanal), Ald10 (acetaldehyde), Ket1 (2-butanone), Ket2 (2-pentanone), Ket3 (2-heptanone), Ket4 (2-nonanone), Ket5 (diacetyl), Ket6 (acetoin), Ket9 (2-pentanone-4-methyl-), Est2 (ethyl acetate), Est3 (ethyl propionate), Oac1 (lactic acid), Oac2 (propionic acid), Oac3 (succinic acid), Oac4 (malic acid) Oac5 (formic acid), Oac6 (acetic acid), Oac7 (citric acid), Oac8 (butyric acid), Oac9 (isobutyric acid), Oac10 (pyruvic acid), Oac11 (tartaric acid), Oac12 (oxalic acid), Mis4 (dimethyl sulphide), Hyd1 (undecane), και Hyd2 (cyclohexane).



**Fig. 4.5:** Correlation bi-plot of scores (training samples) and loadings (metabolites); NC: naturally contaminated meat cluster (n=101), blue scores: samples (n=88), red scores: loadings, S: sterile meat cluster; loading codes are explained in Table 2)

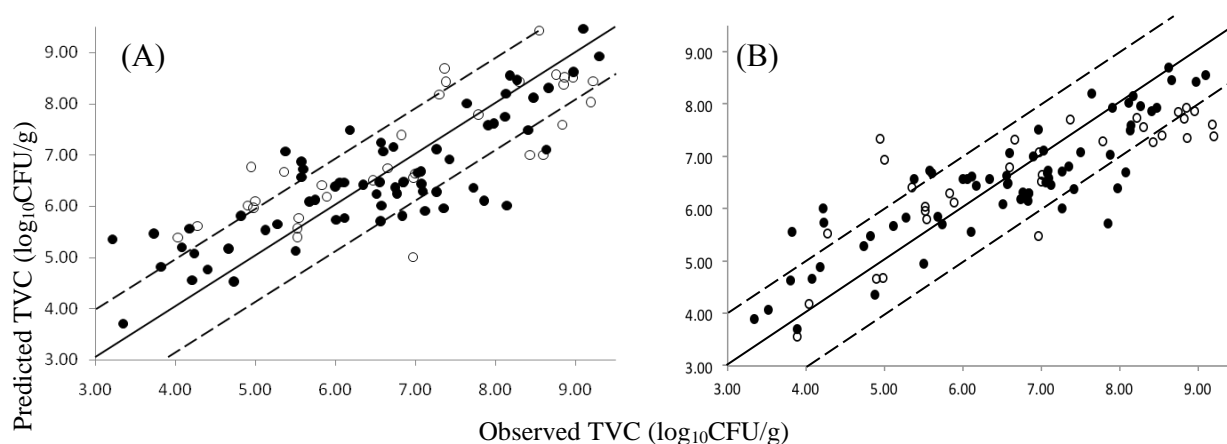
This was not the case during discrimination of  $St_{iii}$ ,  $Sl$  and  $Ha$ , where samples without the background flora could not be separated from contaminated. However, differentiation between the two strains is evident (Fig. S4.3).

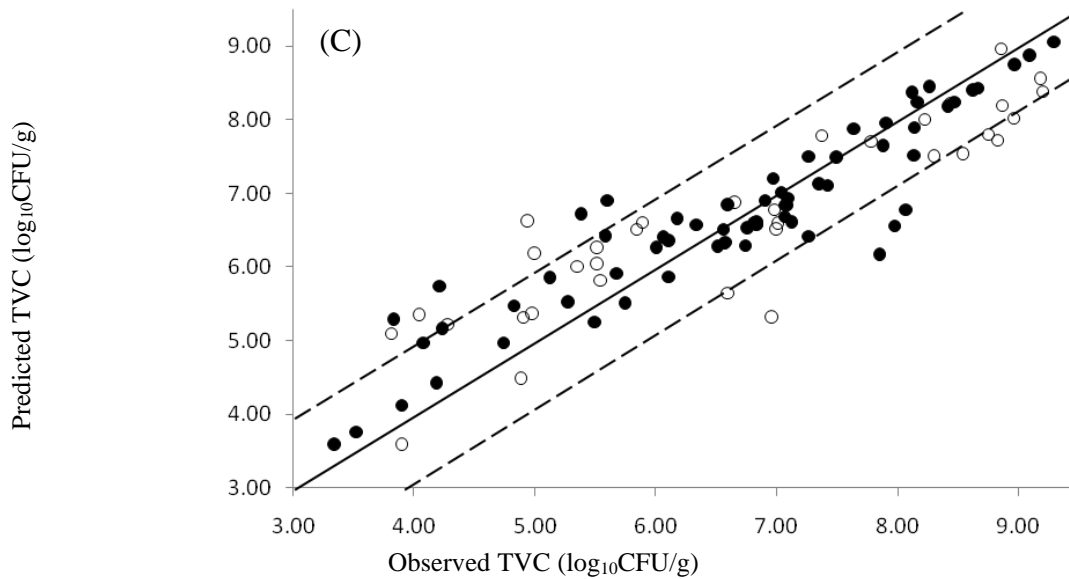
The next question was to assess the performance of the individual datasets for TVC prediction. RBF/SVM-R with 10-fold cross-validation was applied using the common metabolic compounds as independent variables (codes with underline: Table S4.1, column 3). The model performance, as well as the plot of the observed against estimated values, are presented in Table 4.2 and Fig. 4.6 respectively. The average deviation between observed and estimated counts were 12, 10 and 7% for training at 2 and 15°C while 13% for testing at 8°C utilizing HPLC, GC/MS, and joint dataset respectively. Regarding the RMSE it was calculated 0.84, 0.74 and 0.58 for training and 0.95, 0.99 and 0.82 for testing respectively.

**Table 4.2:** Assessment of the support vector machine regression models (SVM-R) with the radial basis function (RBF)

	<sup>3</sup> C	<sup>3</sup> e	<sup>3</sup> g	<sup>4</sup> Bf	<sup>5</sup> Af	<sup>6</sup> RMSE	<sup>7</sup> cv	<sup>8</sup> % inside RE $\pm 20\%$
<sup>1</sup> HPLCtrain				1.014	1.120	0.844	0.82	80.59
<sup>2</sup> HPLCtest	3	0.12	0.26	1.033	1.126	0.955	0.80	78.78
<sup>1</sup> GC/MStrain	12	0.18	0.017	1.003	1.104	0.741	0.87	89.70
<sup>2</sup> GC/MStest				0.981	1.131	0.993	0.84	87.88
<sup>1</sup> HPLC & GC/MStrain	3	0.08	0.07	1.012	1.071	0.580	0.922	89.39
<sup>2</sup> HPLC & GC/MStest				1.010	1.127	0.819	0.903	87.88

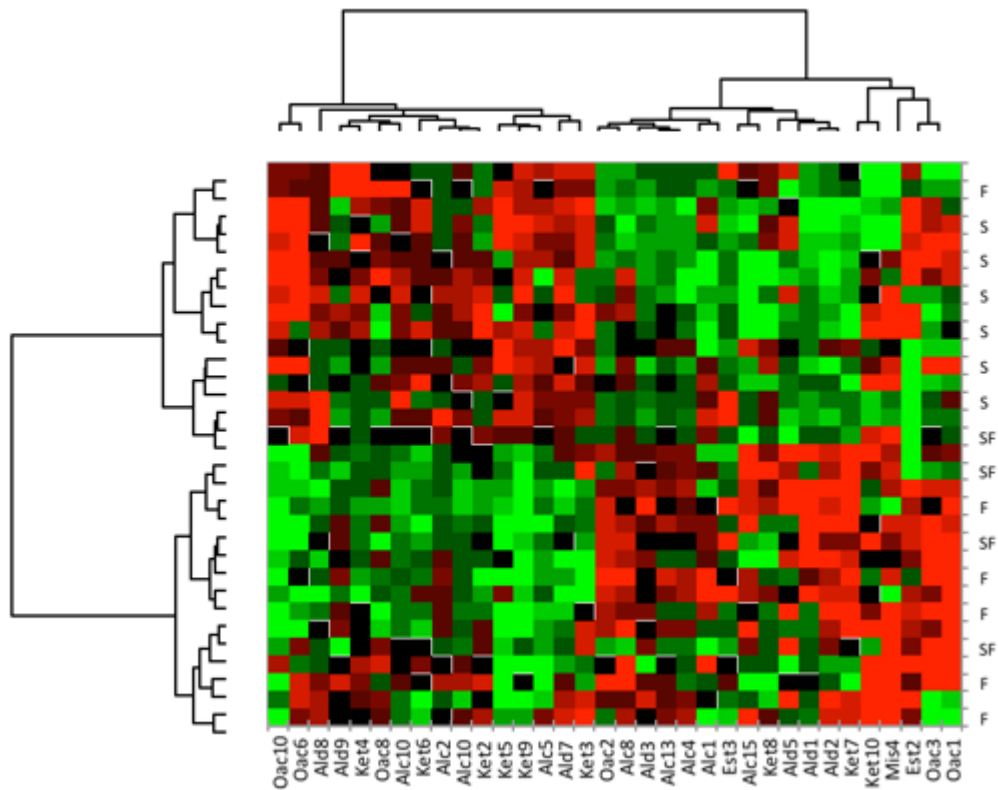
<sup>1</sup>: 10-fold cross-validation, <sup>2</sup>: test dataset (8°C), <sup>3</sup>: model parameters (c: capacity, e: epsilon, g: gamma), <sup>4</sup>Bf: Bias factor; <sup>5</sup>Af: Accuracy factor; <sup>6</sup>RMSE: root mean square error; <sup>7</sup>cv: coefficient of variance <sup>8</sup>RE: relative error





**Fig. 4.6.:** Spoilage assessment through the three different datasets: HPLC with 13 variables (A), GC/MS with 47 variables (B) and data fusion (HPLC & GC/MS) using 60 variables (C) (solid symbols: training 2 and 15°C; open symbols: test at 8°C; solid line: target line, dashed line:  $\pm 1.0 \log_{10}\text{CFU/g}$ )

Lastly, classification according to meat freshness was taken place according to the following three classes of TVC:  $F \leq 5.8$ ,  $SF > 5.8 \ \& \ \leq 7.0$  and  $S > 7.0 \log_{10}\text{CFU/g}$  (Fig S4.4). The compounds Oac4, Oac5, Ket10, Alc7, Ald5, Ald6, Mis4 and Mis2 were positively correlated with F category (Fig. 4.7). Besides, the Oac1, Oac2, Alc3, Alc8, and Est3 with SF (Fig. 4.7). The compounds Mis1, Oac3, Ald1, Ald2, Ald4, Ket7, Alc4, Alc5, Alc13, Alc15, Est1 were positively correlated with F and SF (Fig 4.7). Furthermore, the compounds Ald10, Ald7, Ald8, Ket3, and Ket4 were positively correlated with S. Lastly, Oac7, Oac8, Oac9, Oac10, Oac11, Ket1, Ket2, Ket5, Ket6, Ket8, Alc6, Alc9, Alc10, Alc11, Alc16, Est2 were positively correlated with SF and S (Fig. 4.7).



**Fig. 4.7:** Heatmap representation expressing the correlation of the significant compounds during PLS-DA classification with testing dataset (8°C) (F<5.8; SF: > 5.8 & < 7.0 log<sub>10</sub>CFU/g; S: > 7.0 log<sub>10</sub>CFU/g; Red: High, Blue: low or no correlation between compounds and groups)

### 4.3. Discussion

Metabolic pathway analysis is an effective method to analyze the correlation between metabolites and can reveal the roles of different metabolites in meat (Huang et al., 2020) during storage and distribution. In our case, where meat was stored aerobically, *Carnobacteria* could be in spoil oxidizing conditions, which favour the pyruvate metabolism through the TCA cycle (Afzal et al., 2010). Further, propionate was irreversibly converted ( $p < 0.01$ ) to lactate, which through the pyruvate metabolism ( $p < 0.01$ ) was reduced to pyruvic acid which was metabolized further, with one of its final products' acetic acid. Glycolysis pathway had a high impact as glucose is the initial and most crucial substrate supporting the growth of all the major types of bacteria, making up the microbial association (Gill 1983). Butyric acid has been associated with clostridia (Dainty, 1996) and lactic acid bacteria (Mansur, Seo, et al., 2019), while acetic acid with lactic acid bacteria, *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae, *B. thermosphacta* (Argyri et al., 2011; Garcia-Lopex, Prieto, & Otero, 1998; Mansur, Seo, et al., 2019).

The origin of the majority of VOCs has been discussed extensively in previous articles (Argyri et al., 2015; Casaburi et al., 2014, 2015a; Dainty, 1996; Dainty, Edwards, & Hibbard, 1985; Dainty, Edwards, Hibbard, & Marnewick, 1989; Ercolini et al., 2010, 2011; Frank et al., 2020; Insausti et al., 2002; Klein, Maurer, Herbert, Kreyenschmidt, & Kaul, 2018; Lytou et al., 2018; Mansur, Seo, et al., 2019; Mansur, Song, et al., 2019; Nychas et al., 2008; Pavlidis et al., 2019, 2021; Resconi et al., 2018; Saraiva et al., 2015) with similar findings for chicken, horse-meat, beef and pork stored under various packaging conditions. Regarding alcohols, they have been correlated with glucose and amino acid catabolism (Dainty, 1996), lipolysis (Leroy, Vasilopoulos, Van Hemelryck, Falony, & De Vuyst, 2009), proteolysis (Ercolini et al., 2010) and/or reduction from their corresponding aldehydes (Casaburi et al., 2015a). Aldehydes have been strongly correlated with amino acid transamination (Smit, Engels, & Smit, 2009) and oxidation phenomena, such as  $\beta$ -oxidation of unsaturated fatty acids, hydrolysis of triglycerides and/or lipid auto-oxidation (Ladikos & Lougovois, 1990). In particular, Ald7-9 derive from leucine (Smit et al., 2009), isoleucine (Afzal et al., 2012), and valine ( $p < 0.01$ ) catabolism (Fig. 4.2A) and subscribe off-odours in naturally spoiled beef (Argyri et al., 2015; Dainty et al., 1989; Frank et al., 2020; Jääskeläinen, Hultman, Parshintsev, Riekkola, & Björkroth, 2016; Mansur, Seo, et al., 2019; Mansur, Song, et al., 2019; Saraiva et al., 2015), horse-meat (Pavlidis et al., 2021) and raw milk (Molimard & Spinnler, 1996). Accordingly, (El-Din A. Bekhit et al., 2021) suggest nonanal, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, acetic acid, and 1-hexanol as potential meat spoilage-indicators. Gram-negative bacteria (e.g. *Pseudomonas*, *Enterobacteria*), *B. thermosphacta* and *C. maltaromaticum* are the major producers of 3- and 2-methyl-butanol (Ercolini et al., 2009; Mansur, Seo, et al., 2019; Papadopoulou et al., 2020)(in this study). Considering FTIR results, both strains positively correlated with 900-1540 $\text{cm}^{-1}$  regions corresponding to amides and amines and 1660-1710  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to unsaturated aldehydes and ketones (Socrates, 2001).

The correlation of many individual metabolites with two categories at the same time is explained probably from the 2-phase pattern they presented. This trend may be explained from the succession of the microbial association during storage and/or the fact that other energy-substrates have already depleted from the activity of microbiota of meat and consequently, microbes may turn to consume these as carbon and nitrogen sources. Besides, the fact that the aldehydes and alcohols, except for propanol, increased in all sterile batches, leads us to the result that they might be lipid auto-oxidation by-products and we follow various authors (Leroy et al., 2009; Montel, Masson, & Talon, 1998; Moretti et al., 2004).



At this point, it has to be notified that the stone corner for retarding spoilage is the compounds glucose, propionic and lactic acid, and the linear aldehydes (pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal), which as observed in this study for St samples, in MAP (Argyri et al., 2015) and marinated (Lytou et al., 2018) they increased, or remained constant through the whole period of storage. As a consequence, it is of high importance to maintain these compounds on high levels before and during the storage of meat

Regarding multivariate data analysis, to improve the robustness of the respective developed models, the data corresponding to the min and the max temperature limits (2 and 15°C) were utilized to calibrate (train) the model, while those from 8°C for validation (test) of the predictor by interpolation. This was taken into consideration since different temperatures favour the growth; thus, the metabolism of different spoilage bacteria in meat (2 for psychotropic and 15 °C for mesophilic) (Nychas et al., 2008). For this reason, TVC was selected as a uniform, and easy to measure microbial group which reflects the overall picture of food. With respect to GC/MS data, a better performance compare to HPLC is apparent yielding in lower RMSE. Having a look at Fig. 4.6b, the model “fails safe” to predict with precision samples with observed values above 7.0 log<sub>10</sub>CFU/g. However, the predictions are in the "spoiled" region. The better performance of GC/MS compare to HPLC may be explained from the fewer number of variables and the concept of the methodology itself. Similar results for *Bf*, *Af*, RMSE and predictions in the RE±20% have been notified previously (Argyri et al., 2015; Estelles-Lopez et al., 2017; Pavlidis et al., 2021). Validation/testing using moderate temperature (8°C in our case) has been applied previously in a similar dataset by (Fengou et al., 2019; Tsakanikas et al., 2016).

#### 4.4. Conclusion

The metabolomic approach followed in this study showed that many representative compounds were produced or metabolized during the growth of TVC and enterobacteria on the meat. The more diverse VOCs in NC explains the significant contribution of microbes in the volatilome formation during storage. As far as the contribution of enterobacteria to the metabolome formation is concerned, we would dare to say that their contribution during storage as monocultures is small. However, by taking into account the whole microbial consortium of meat, which is diverse as it comes from molecular studies and considering that the other spoilers may have consumed and/or produce substances that could be used from enterobacteria, they may produce some of the compounds indirectly.

The spoilage assessment through metabolomic approach and multivariate analysis managed to combine all these individuals and correlate them with freshness categories. Once more, sensor-based methodologies could exploit the encouraging findings of this study and their development for such purposes could partially substitute the laborious microbiological analysis. However, the outcome of this study should be substantiated by additional environmental factors, such as pH and packaging (vacuum) and field validation during distribution. Further investigation of this approach in different meat species, could lead to an holistic application in meat analysis, where the ideal sensor with the appropriate variables could give as output the meat specie and level of freshness.

### **Acknowledgements**

This work has been supported by the project “Intelligent multi-sensor system for meat analysis -iMeatSense \_550” co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: ARISTEIA-I. The author would like specially thank Anastasios Stamatou for his support in sterile meat preparation.

## Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και Μελλοντική δουλειά

## 5.1. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μια στοχευμένη προσέγγιση συνδυάζοντας μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις έλαβε χώρα. Συγκεκριμένα, παράλληλα με τη μικροβιακή συσχέτιση μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ του κρέατος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βολατιλομική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη αξιολογώντας το πτητικό προφίλ όπως προκύπτει κατά τη GC/MS ανάλυση, σε συνδυασμό με HPLC δεδομένα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος πρόβλεψης της μικροβιολογικής κατάστασης/επίπεδο αλλοίωσης στο νωπό κρέας. Δεδομένου ότι προκύπτουν ισχυρά συσχετιζόμενα αποτελέσματα μεταξύ εκτιμώμενων και παρατηρούμενων τιμών, θα μπορούσε υπο προϋποθέσεις να αντικαταστήσει εν μέρει τη συμβατική χρονοβόρα μικροβιολογική μέθοδο καταμέτρησης των τρυβλίων. Ακόμη, αποδείχτηκε πως οι ίδιες μεθοδολογίες θα μπορούσαν να πληροφορήσουν σχετικά με την προέλευση/αυθεντικότητα του κρέατος.

Οι κυριότερες παρατηρήσεις συνοψίζονται παρακάτω:

- Το είδος της αγοράς (λιανοπώληση/βιομηχανικό επίπεδο για supermarkets) δεν έδειξε να επηρεάζει το μέσο όρο των μικροβιακών πληθυσμών. Επίσης, ο χρόνος που παρέρχεται από τη σφαγή του ζώου έως την παραγωγή κιμά αλλά και η δειγματοληψία σε διαφορετικές εποχές του χρόνου έδειξε να επηρεάζει σημαντικά τη μικροβιακή σύνθεση.
- Συγκριτικά με την απόδοση των ενόργανων αναλυτικών τεχνικών προκύπτει η ανωτερότητα της GC/MS έναντι της HPLC κατά την παλινδρόμηση και ταξινόμηση. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο είδος αλλά και στον αριθμό των μεταβολιτών που κατάφερε να προσδιορίσει.
- Με κατάλληλους μετασχηματισμούς των δεδομένων (λογαριθμημένες τιμές) κατέστη δυνατό να αναδειχτούν διαφοροποιήσεις μεταξύ συνεχών δειγμάτων, όπου οι raw τιμές φάνηκε να μην επηρεάζουν τα αποτελέσματα.
- Χρησιμοποιήθηκε ο όρος “volatilomics” σαν μια ενιαία μεθοδολογία μελέτης μεγάλης κλίμακας των μεταβολικών οδών και δικτύων των πτητικών ουσιών σε βιολογικά συστήματα.
- Τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου «2» αποδεικνύουν ότι η Αέρια Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Ανιχνευτή Φασματομετρίας Μάζας (HS/SPME-GC/MS) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο εσωτερικού ελέγχου στη βιομηχανία κρέατος με εφαρμογή εκτός της γραμμής παραγωγής (off-line) και να πληροφορεί σχετικά με την

προέλευση (αυθεντικότητα) του τελικού προϊόντος με υψηλή ευκρίνεια. Υπό προϋποθέσεις θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την αξιολόγηση του μικροβιακού πληθυσμού, απαιτούνται όμως περαιτέρω αναλύσεις και δεδομένα. Η επτανάλη, οκτανάλη, βουτανόλη, πεντανόλη, εξανόλη, οκτανόλη, 1-πεντέν-3-όλη, 2-οκτέν-1-όλη, ακετοΐνη, βουτάν-2-όνη, και επτάν-2-όνη συσχετίστηκαν θετικά με τα βόεια. Επίσης, η πεντανάλη, εξανάλη, εννεανάλη, δεκανάλη, βενζαλδεύδη, trans-2-εξενάλη, trans-2-επτενάλη, trans-2-οκτενάλη και 1-οκτέν-3-όνη, συσχετίστηκαν θετικά με το χοιρινό κιμά. Τέλος, οι αλκοόλες βουτάν-2-όλη και 1-οκτέν-3-όλη έδειξαν θετική συσχέτιση με τα ανάμικτα δείγματα.

- Υψηλής ποιότητας προϊόντα μέρος της γαστρονομίας (“gastronomics”), όπως το κρέας αλόγου, παραμένουν σχετικά ανεξερεύνητα από μικροβιολογικής και μεταβολομικής άποψης. Αυτή η μελέτη κατέδειξε για πρώτη φορά τη συσχέτιση μικροοργανισμών και μεταβολιτών σε νωπά φιλέτα αλόγου κατά τη διάρκεια αερόβιας προσομείωσης στους 0-15°C, η οποία βρέθηκε παρόμοια με άλλα κόκκινα κρέατα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ο κυρίαρχος μικροοργανισμός, τόσο σε θερμοκρασία κατάχρησης, όσο και ψύξης ήταν πάντα οι ψευδομονάδες ακολουθούμενες από τον *B. thermosphacta*. Επιπρόσθετα, το δευτερογενές μοντέλο που αναπτύχθηκε μπόρεσε να περιγράψει ικανοποιητικά την εξάρτηση του  $\mu_{max}$  και εμπορικής διάρκειας ζωής (shelf-life) από τη θερμοκρασία. Ωστόσο απαιτείται επικύρωση με ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με σκοπό να ελεγχθεί η ικανότητα του μοντέλου να εκτιμά την κατάσταση άγνωστων δειγμάτων. Παρ’ όλα αυτά, δεδομένου ότι το μοντέλο είναι διαθέσιμο σε εναρμονισμένη μορφή, η επικύρωση του μπορεί να λάβει χώρα, όταν ανάλογο σύνολο δεδομένων γίνει διαθέσιμο. Η μεταβολομική προσέγγιση έδειξε ότι παρουσιάζει δυναμική εφαρμογή σε άλλα –λιγότερο διαδεδομένα- κρέατα.
- Εν συνεχεία με νεότερη πειραματική διαδικασία αναδείχθηκαν δυνητικοί μικροβιακοί μεταβολίτες στο βόειο κρέας κατά την αερόβια συντήρηση. Το μεταβολικό προφίλ μοσχαρίσιων φιλέτων με- και χωρίς-αυτόχθονη χλωρίδα διερευνήθηκε. Πολλές από τις αντιπροσωπευτικές ουσίες που ανιχνεύθηκαν παράγονται ή μεταβολίζονται από μικροοργανισμούς της OMX. Η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα των φυσικά επιμολυσμένων δειγμάτων αποδεικνύει τη σημαντική συμβολή των μικροοργανισμών στο σχηματισμό του πτητικού προφίλ κατά την αερόβια συντήρηση. Η ανάλυση του βιοχημικού μονοπατιού έδειξε ότι ο κύκλος των κιτρικών, γλυκόλυση και μεταβολισμός πυρουβικών και αμινοξέων ως τα σημαντικότερα με τη μεγαλύτερη επίπτωση. Αναδείχθηκαν οι δυνητικοί μικροβιακοί μεταβολίτες: βουτάν-2-όνη, πεντάν-2-όνη,

επτάν-2-όνη, εννεάν-2-όνη, διακετύλιο, ακετοΐνη, 3-&2-μέθυλο-βουτανόλη, 2-μέθυλο-προπανόλη, οξικός και προπιονικός αιθυλεστέρας κατά την αερόβια συντήρηση μοσχαρίσιων φιλέτων. Συγκρίθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε σύζευξη τα δεδομένα από HS/SPME-GC/MS και HPLC για την πρόβλεψη της OMX. Τέλος, κατά την περίπτωση της σύζευξης τα αποτελέσματα της πανιδρόμησης και ταξινόμησης ήταν βελτιωμένα.

- Όσον αφορά τη συμμετοχή των Enterobacteriaceae στη διαμόρφωση του μεταβολικού προφίλ προέκυψε ότι σαν μονοκαλλιέργειες τα δυο στελέχη εμφάνισαν χαμηλή δυναμική αλλοίωσης. Όμως λαμβάνοντας υπόψιν τη μικροβιακή συσχέτιση όπως προκύπτει από μοριακές έρευνες και συνυπολογίζοντας το γεγονός ότι άλλοι αλλοιωγόνι να είχαν καταναλώσει ή/και παράξει άλλα μεταβολικά προϊόντα μπορεί να συμμετέχουν με έμμεσο τρόπο.
- Μέσω των πειραματικών διαδικασιών εξορύχθησαν βιοδείκτες που αποδόθηκαν στη μικροβιακή ανάπτυξη κατά την αερόβια συντήρηση, καθώς και ουσίες προερχόμενες από άλλους παράγοντες, όπως οξείδωση και διατροφή των ζώων.

Από τις πειραματικές διαδικασίες προκύπτει πως οι αναλυτικές τεχνικές βασισμένες στη μεταβολομική (metabolomics-based) αποδίδουν αποδεκτά αποτελέσματα πρόβλεψης της μικροβιολογικής κατάστασης σε χρονικά αποδεκτή περίοδο. Σίγουρα, βελτιώσεις στην ευαισθησία των αναλυτικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν σε αυτή τη διατριβή θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε βελτιωμένη απόδοση. Ο προσδόκιμος απώτερος στόχος αυτών των συστημάτων είναι η ολοκλήρωση των μοντέλων που απορρέουν από τα προρρητικά πρότυπα, τους αισθητήρες, και τα διάφορα λογισμικά, με στόχο οι εμπλεκόμενοι (π.χ. καταναλωτές, φορείς) στην αλυσίδα των τροφίμων να μπορούν να προβλέψουν την ασφάλεια και την ποιότητα αυτών (McMeekin et al., 2008; McMeekin & Ross, 1996; Tamplin, 2018). Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά για τους κατασκευαστές αισθητήρων προκειμένου να ληφθεί υπόψη η μικροβιακή συμβολή στον σχηματισμό μεταβολιτών.

Παρ' όλα αυτά, τα ευρήματα της μελέτης πρέπει να τεκμηριωθούν και από την επίδραση άλλων περιβαλλοντικών παραγόντες όπως pH και συσκευασία (π.χ. κενό, άλλη σύσταση αερίων στην ενεργό συσκευασία). Απαιτείται επίσης η επικύρωση στο πεδίο (field validation) κατά τη διανομή, ούτως ώστε η προσέγγιση να βρίσκει εφαρμογή καθ' όλη την αλυσίδα παραγωγής. Επιπρόσθετη έρευνα αυτής της προσέγγισης με περισσότερα είδη κρέατος, θα μπορούσε να οδηγήσει σε ολιστική προσέγγιση ανάλυσης του κρέατος, όπου ο ιδανικός αισθητήρας με τις

κατάλληλες μεταβλητές και μοντέλα θα μπορούσε να πληροφορεί σχετικά με το είδος κρέατος και το επίπεδο της μικροβιολογικής κατάστασης.

## 5.2. Μελλοντική έρευνα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δυο αναλυτικές πλατφόρμες (GC/MS, HPLC) χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την αξιολόγηση της μικροβιολογικής κατάστασης ή/και αλλοίωσης του κρέατος κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες και συσκευασίες. Κατά τη διερεύνηση του μεταβολικού αποτυπώματος των τροφίμων ένα παράπλευρο ερευνητικό κεφάλαιο που ανοίχτηκε ήταν εκείνο της αυθεντικότητας. Παρ'όλο το ισχυρό δυναμικό των μεθόδων προς στήριξη της διαδικασίας λήψης αποφάσεων, περισσότερες πειραματικές διαδικασίες απαιτούνται ούτως ώστε να έχουμε πιο αξιόπιστα και εύρωστα αποτελέσματα. Έτσι θα μπορούσαν να διεξαχθούν οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες:

- Αξιολόγηση της μικροβιολογικής κατάστασης κρεάτων αποθηκευμένα σε διαφορετικές συσκευασίες MAP, ούτως ώστε να καλύψουμε όλο το πιθανό φάσμα αερίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί.
- Χρήση των ίδιων πειραματικών διαδικασιών με περισσότερες παρτίδες κρέατος. Σε κάθε περίπτωση απαιτούνται περαιτέρω δείγματα και πειραματικές διαδικασίες με σκοπό να τροφοδοτηθούν τα μοντέλα με περισσότερα δεδομένα (π.χ. συσκευασίες, θερμοκρασίες, pH), ώστε τα αποτελέσματα να γίνουν πιο έγκυρα. Περισσότερα είδη κρέατος θα ενισχύσουν τη βάση δεδομένων και θα διευρύνουν την εφαρμοστικότητα των μεθόδων που προτάθηκαν.
- Εμβολιασμός στείρου μυϊκού ιστού με πολλά στελέχη από ένα αλλοιωγόνο είδος
- Μελέτη του μεταβολικού προφίλ σε στείρο μυϊκό ιστό εμβολιασμένο με bulk κύτταρα
- Συντήρηση λιπαρού και άπαχου κομματιού κρέατος με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης του λίπους στη δημιουργία του πτητικού προφίλ στο
- Βύθιση στείρου μυϊκού ιστού σε αιθανόλη και αξιολόγηση της δυναμικής αλλοιωγόνων στην παραγωγή εστέρων.
- Συντήρηση στείρου μυϊκού ιστού σε ατμοσφαιρικά τροποποιημένη συσκευασία ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί η κινητική των ουσιών που σχετίζονται με την οξείδωση κατά την αερόβια συντήρηση
- Lipidomics-προσεγγίσεις σε δοκιμές αλλοίωσης στο κρέας

- Επικύρωση κινητικών αλόγου με ανεξάρτητες παρτίδες κρέατος. Αξιολόγηση της μικροβιακής συσχέτισης υπο συνθήκες κενού, που είναι και η κύρια συσκευασία διανομής.
- Απομόνωση χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση *Enterobacteriaceae* απομονωμένα από κρέας αλόγου κατά τη συντήρη του. Έλεγχος των απομονωθέντων στελεχών ως προς την ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών και ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Αξιολόγηση της παρουσίας βιογενών αμινών σε κρέας αλόγου σαν δυνητικό βιοδείκτη ποιότητας.
- Εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης και συσχέτιση με πτητικούς μεταβολίτες όπως προέρχονται από τη GC/MS.
- Χρήση φορητής ηλεκτρονικής μύτης (portable enose) με στόχο την αξιολόγηση της μικροβιολογικής κατάστασης στα τρόφιμα
- Ανάλυση του πτητικού προφίλ με enose απευθείας από τον περιέκτη. Δεδομένου ότι πλέον υπάρχουν at-line αισθητήρες οι οποίες μπορούν να μετρήσουν τη σύσταση των αερίων, θα μπορούσε στο μέλλον να αναπτυχθεί σύστημα-αισθητήρας που να αξιολογεί το πτητικό προφίλ της συσκευασίας. Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια εφαρμογής της προτεινόμενης προσέγγισης, όπου αναλύθηκαν συσκευασίες με απευθείας λήψη του πτητικού περιεχομένου και έγχυση στην enose. Τα αποτελέσματα έδειξαν καλή συσχέτιση δειγμάτων και κατηγοριών φρεσκότητας.
- Διερεύνηση της ικανότητας της GC/MS για εφαρμογή σε ερωτήματα αξιολόγησης της νοθείας στο κρέας. Χρήση περισσότερων από 3 κλάσεις. Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια εφαρμογής της εν λόγω πλατφόρμας, όπου αξιολογήθηκε η ανίχνευση δυνητικής νοθείας μοσχαρίσιου κιμά από χοιρινό και αλογίσιο κρέας. Τα πρωταρχικά αποτελέσματα αναδεικνύουν τη GC/MS ως κατάλληλο εργαλείο για αυτό το σκοπό.
- δοκιμές νοθείας με μη-γραμμικούς μύες
- δοκιμές νοθείας με νοθεύματα μη-ζωικής προέλευσης
- δοκιμές νοθείας με αλλοιωμένα κρέατα
- δοκιμές αυθεντικότητας ή/και νοθείας σε μαγειρεμένο κρέας
- αυθεντικότητα σε >3 είδη



## Κεφάλαιο 6: Αναφορές

- (EFSA), E. F. S. A., Donohoe, T., Garnett, K., Lansink, A. O., Afonso, A., & Noteborn, H. (2018). Emerging risks identification on food and feed – EFSA. *EFSA Journal*, *16*(7), e05359. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5359>
- Adams, M., & Moss, M. (2000). *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1039/9781847550880>
- Adebo, O. A., Njobeh, P. B., Adebisi, J. A., Gbashi, S., & Kayitesi, E. (2017). Food Metabolomics: A New Frontier in Food Analysis and its Application to Understanding Fermented Foods. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*, (August). <https://doi.org/10.5772/intechopen.69171>
- Afzal, M. I., Delaunay, S., Paris, C., Borges, F., Revol-Junelles, A.-M., & Cailliez-Grimal, C. (2012). Identification of metabolic pathways involved in the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism by *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. *International Journal of Food Microbiology*, *157*(3), 332–339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.010>
- Afzal, M. I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Millière, J.-B., Revol-Junelles, A.-M., & Cailliez-Grimal, C. (2010). *Carnobacterium maltaromaticum*: Identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiology*, *27*(5), 573–579. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.03.019>
- Al-Kahtani, H. A., Ismail, E. A., & Asif Ahmed, M. (2017). Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques. *Food Chemistry*, *219*, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.108>
- Alamprese, C., Casale, M., Sinelli, N., Lanteri, S., & Casiraghi, E. (2013). Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UV-vis, NIR and MIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(1), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.027>
- Ampuero, S., & Bosset, J. O. (2003). The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *94*(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00321-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00321-6)
- Andritsos, N. D., Mataragas, M., Mavrou, E., Stamatiou, A., & Drosinos, E. H. (2012). The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. *Meat Science*, *91*(4), 486–489. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.036>
- ANGELO, A. J. St., VERCELLOTTI, J. R., LEGENDRE, M. G., VINNEIT, C. H., KUAN, J. W., JAMES JR., C., & DUPUY, H. P. (1987). Chemical and Instrumental Analyses of Warmed-Over Flavor in Beef. *Journal of Food Science*, *52*(5), 1163–1168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb14034.x>
- Argyri, A A, Panagou, E. Z., Tarantilis, P. A., Polysiou, M., & Nychas, G. E. (2010). Sensors and Actuators B : Chemical Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, *145*(1), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.11.052>
- Argyri, Anthoula 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. *International Journal of Food Microbiology*, *150*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.07.010>
- Argyri, Anthoula A., Mallouchos, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2015). The dynamics of the HS/SPME–GC/MS as a tool to assess the spoilage of minced beef stored under

- different packaging and temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.09.020>
- Arrhenius, S. (1889). Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift Für Physikalische Chemie*, 4U(1), 226–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/zpch-1889-0416>
- Badiani, A., Nanni, N., Gatta, P. P., Tolomelli, B., & Manfredini, M. (1997). Nutrient Profile of Horsemeat1. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(3), 254–269. <https://doi.org/10.1006/JFCA.1997.0540>
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S., Logue, C. M., Marchello, M., Doetkott, C., Gu, H., ... Nolan, L. (2004). Spoilage identification of beef using an electronic nose system. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 47(5), 1625–1633. <https://doi.org/10.13031/2013.17593>
- Ballin, N. Z. (2010a). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577–587. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2010.06.001>
- Ballin, N. Z. (2010b). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Barker, M., & Rayens, W. (2003). Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, 17(3), 166–173. <https://doi.org/10.1002/cem.785>
- Baty, F., Ritz, C., Charles, S., Brutsche, M., Flandrois, J.-P., & Delignette-Muller, M.-L. (2015). A Toolbox for Nonlinear Regression in R: The Package nlstools. *Journal of Statistical Software; Vol 1, Issue 5 (2015)*. Retrieved from <https://www.jstatsoft.org/v066/i05>
- Belaunzaran, X., Bessa, R. J. B., Lavín, P., Mantecón, A. R., Kramer, J. K. G., & Aldai, N. (2015). Horse-meat for human consumption - Current research and future opportunities. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.006>
- Belcher, J. N. (2006). Industrial packaging developments for the global meat market. *Meat Science*, 74(1), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.031>
- Bergana, M. M., Adams, K. M., Harnly, J., Moore, J. C., & Xie, Z. (2019). Non-targeted detection of milk powder adulteration by 1H NMR spectroscopy and conformity index analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 78, 49–58. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2019.01.016>
- Bjorkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzappel, W. H., ... Vandamme, P. (2000). Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3764–3772. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3764-3772.2000>
- Blixt, Y., & Borch, E. (1999). Using an electronic nose for determining the spoilage of vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology*, 46(2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00192-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00192-5)
- Bondi, M., Messi, P., Halami, P. M., Papadopoulou, C., & de Niederhausern, S. (2014). Emerging Microbial Concerns in Food Safety and New Control Measures. *BioMed Research International*, 2014, 251512. <https://doi.org/10.1155/2014/251512>

- Borch, E., Kant-Muermans, M.-L., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 103–120. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01135-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01135-X)
- Bouzembrak, Y., Steen, B., Neslo, R., Linge, J., Mojtahed, V., & Marvin, H. J. P. (2018). Development of food fraud media monitoring system based on text mining. *Food Control*, 93(June), 283–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.003>
- Boyaci, I. H., Temiz, H. T., Uysal, R. S., Velioglu, H. M., Yadegari, R. J., & Rishkan, M. M. (2014). A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 148, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.006>
- Boyen, F., Smet, A., Hermans, K., Butaye, P., Martens, A., Martel, A., & Haesebrouck, F. (2013). Methicillin resistant staphylococci and broad-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in horses. *Veterinary Microbiology*, 167(1–2), 67–77. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.05.001>
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2003). Centering and scaling in component analysis. *Journal of Chemometrics*, 17(1), 16–33. <https://doi.org/10.1002/cem.773>
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812–2831. <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>
- Broeckling, C. D., Reddy, I. R., Duran, A. L., Zhao, X., & Sumner, L. W. (2006). MET-IDEA: Data Extraction Tool for Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 78(13), 4334–4341. <https://doi.org/10.1021/ac0521596>
- Brown, M., & Baird-Parker, A. (1982). *The Microbiological Examination of Meat*. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-9819-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-011-9819-6_11)
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.05.048>
- Bueno, M., Resconi, V. C., Campo, M. M., Ferreira, V., & Escudero, A. (2019). Development of a robust HS-SPME-GC-MS method for the analysis of solid food samples. Analysis of volatile compounds in fresh raw beef of differing lipid oxidation degrees. *Food Chemistry*, 281, 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.12.082>
- Calkins, C. R., & Hodgen, J. M. (2007). A fresh look at meat flavor. *Meat Science*, 77(1 SPEC. ISS.), 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.016>
- Cappellin, L., Aprea, E., Granitto, P., Romano, A., Gasperi, F., & Biasioli, F. (2013). Multiclass methods in the analysis of metabolomic datasets: The example of raspberry cultivar volatile compounds detected by GC–MS and PTR-MS. *Food Research International*, 54(1), 1313–1320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.004>
- Casaburi, A., De Filippis, F., Villani, F., & Ercolini, D. (2014). Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. *Food Research International*, 62, 366–374. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.03.019>
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., & Ercolini, D. (2015a). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45, 83–102. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.02.002>
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G. J., Villani, F., & Ercolini, D. (2015b). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45(PA).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002>

- Cavin, C., Cottenet, G., Blancpain, C., Bessaire, T., Frank, N., & Zbinden, P. (2016). Food adulteration: From vulnerability assessment to new analytical solutions. *Chimia*, *70*(5), 329–333. <https://doi.org/10.2533/chimia.2016.329>
- Champiat, D., Matas, N., Monfort, B., & Fraass, H. (2001). Applications of biochemiluminescence to HACCP. *Luminescence*, *16*(2), 193–198. <https://doi.org/10.1002/bio.647>
- Chen, M., Rao, R. S. P., Zhang, Y., Zhong, C. X., & Thelen, J. J. (2014). A modified data normalization method for GC-MS-based metabolomics to minimize batch variation. *SpringerPlus*, *3*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-439>
- Cheng, J. H., Chou, H. T., Lee, M. S., & Sheu, S. C. (2016). Development of qualitative and quantitative PCR analysis for meat adulteration from RNA samples. *Food Chemistry*, *192*, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.094>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, *68*(1), e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Cifuentes, A. (2009). Food analysis and Foodomics. *Journal of Chromatography A*, *1216*(43), 7109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.018>
- Coloretti, F., Chiavari, C., Poeta, A., Succi, M., Tremonte, P., & Grazia, L. (2019). Hidden sugars in the mixture: Effects on microbiota and the sensory characteristics of horse meat sausage. *LWT*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.032>
- Cottenet, G., Sonnard, V., Blancpain, C., Ho, H. Z., Leong, H. L., & Chuah, P. F. (2016). A DNA macro-array to simultaneously identify 32 meat species in food samples. *Food Control*, *67*, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.042>
- Cuadros-Rodríguez, L., Ruiz-Samblás, C., Valverde-Som, L., Pérez-Castaño, E., & González-Casado, A. (2016). Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food “identification” and food authentication – A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, *909*, 9–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.042>
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, *60*, 95–107. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.11.041>
- Dainty, R. H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 19–33. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01137-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01137-3)
- Dainty, R. H., Edwards, R. A., & Hibbard, C. M. (1985). Time course of volatile compound formation during refrigerated storage of naturally contaminated beef in air. *The Journal of Applied Bacteriology*, *59*(4), 303–309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb03324.x>
- DAINTY, R. H., EDWARDS, R. A., HIBBARD, C. M., & MARNEWICK, J. J. (1989). Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, *66*(4), 281–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02480.x>
- Dainty, R. H., & Hibbard, C. M. (1983). Precursors of the major end products of aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology*, *55*(1), 127–

133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02656.x>
- Dainty, R. H., & Mackey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(s21), 103s-114s. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb03630.x>
- Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 305–317. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00136-T](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00136-T)
- Damez, J. L., & Clerjon, S. (2008, September). Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science*, Vol. 80, pp. 132–149. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.039>
- Danezis, G. P., Pappas, A. C., Zoidis, E., Papadomichelakis, G., Hadjigeorgiou, I., Zhang, P., ... Georgiou, C. A. (2017). Game meat authentication through rare earth elements fingerprinting. *Analytica Chimica Acta*, 991, 46–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.09.013>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0886-6>
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G.-J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 130–141. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.05.020>
- Doulgeraki, A. I., & Nychas, G.-J. E. (2013). Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food Microbiology*, 34(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2012.11.017>
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., Kagkli, D. M., & Nychas, G.-J. E. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*, 27(8), 1028–1034. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.07.004>
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G. J. E. (2011). Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030>
- Doulgeraki, A., Panagou, E., & Nychas, G. J. (2016). Rapid methods for microbial analysis of meat and meat products. In *Emerging Technologies in Meat Processing: Production, Processing and Technology*. <https://doi.org/10.1002/9781118350676.ch12>
- Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1995). Attributes of microbial associations of meat growing as xenic batch cultures in a meat juice at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 279–293. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00131-O](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00131-O)
- Druml, B., Hochegger, R., & Cichna-Markl, M. (2015). Duplex real-time PCR assay for the simultaneous determination of the roe deer (*Capreolus capreolus*) and deer (sum of fallow deer, reddeer and sika deer) content in game meat products. *Food Control*, 57, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.023>
- Dunstall, G., Rowe, M. T., Wisdom, G. B., & Kilpatrick, D. (2005). Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of *Pseudomonas* spp. of raw milk origin. *Journal of Dairy Research*, 72(3), 276–280. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0022029905000713>

- El-Din A. Bekhit, A., Holman, B. W. B., Giteru, S. G., & Hopkins, D. L. (2021). Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109(December 2020), 280–302. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.006>
- El Barbri, N., Llobet, E., El Bari, N., Correig, X., & Bouchikhi, B. (2008). Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as an alternative technique for the spoilage classification of red meat. *Sensors*, 8(1), 142–156. <https://doi.org/10.3390/s8010142>
- Elliott, C. (2014). *Elliott Review into the integrity and assurance of food supply networks-Final report: A national food crime prevention framework*. (July).
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., & Goodacre, R. (2002). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2822–2828. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2822-2828.2002>
- Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2001). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: Current status and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 12(11), 414–424. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00019-5)
- Ellis, D. I., Muhamadali, H., Allen, D. P., Elliott, C. T., & Goodacre, R. (2016, August 1). A flavour of omics approaches for the detection of food fraud. *Current Opinion in Food Science*, Vol. 10, pp. 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.07.002>
- Elmasry, G., Barbin, D. F., Sun, D.-W., & Allen, P. (2012). Meat Quality Evaluation by Hyperspectral Imaging Technique: An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 689–711. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507908>
- Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., ... Villani, F. (2010). Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 120–131. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.06.012>
- Ercolini, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., La Storia, A., ... Villani, F. (2011). Monitoring of Microbial Metabolites and Bacterial Diversity in Beef Stored under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7372 LP – 7381. <https://doi.org/10.1128/AEM.05521-11>
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., & Villani, F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1990–2001. <https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. (2006). Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4663 LP – 4671. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-06>
- Estelles-Lopez, L., Ropodi, A., Pavlidis, D., Fotopoulou, J., Gkousari, C., Peyrodie, A., ... 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.013>
- Fengou, L. C., Lianou, A., Tsakanikas, P., Gkana, E. N., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2019). Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy and multispectral imaging as means of estimating the microbiological spoilage of farmed sea bream. *Food Microbiology*, 79, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.020>

- Ferrocino, I., Storia, A. La, Torrieri, E., Musso, S. S., Mauriello, G., Villani, F., & Ercolini, D. (2013). Antimicrobial packaging to retard the growth of spoilage bacteria and to reduce the release of volatile metabolites in meat stored under vacuum at 1°C. *Journal of Food Protection*, 76(1), 52–58. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-257>
- Frank, D., Hughes, J., Piyasiri, U., Zhang, Y., Kaur, M., Li, Y., ... Stark, J. (2020). Volatile and non-volatile metabolite changes in 140-day stored vacuum packaged chilled beef and potential shelf life markers. *Meat Science*, 161(December 2018), 108016. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108016>
- Garcia-Lopex, M. L., Prieto, M., & Otero, A. (1998). physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. *Microbiology of Meat and Poultry*. London ; New York : Blackie Academic & Professional, 1998.
- Geeraerts, W., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2019). Mapping the dominant microbial species diversity at expiration date of raw meat and processed meats from equine origin, an underexplored meat ecosystem, in the Belgian retail. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.019>
- Ghasemi-Varnamkhasti, M., Apetrei, C., Lozano, J., & Anyogu, A. (2018). Potential use of electronic noses, electronic tongues and biosensors as multisensor systems for spoilage examination in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 71–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.018>
- Giaretta, N., Di Giuseppe, A. M. a, Lippert, M., Parente, A., & Di Maro, A. (2013). Myoglobin as marker in meat adulteration: a UPLC method for determining the presence of pork meat in raw beef burger. *Food Chemistry*, 141(3), 1814–1820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.124>
- GILL, C. O. (1983). Meat Spoilage and Evaluation of the Potential Storage Life of Fresh Meat. *Journal of Food Protection*, 46(5), 444–452. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.5.444>
- Gill, C. O., Deslandes, B., Rahn, K., Houde, A., & Bryant, J. (1998). Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1050–1058. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00441.x>
- Gill, C. O., & Jones, T. (1995). The presence of Aeromonas, Listeria and yersinia in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. *Food Microbiology*, 12(C), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80089-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80089-1)
- GILL, C. O., & NEWTON, K. G. (1977). The Development of Aerobic Spoilage Flora on Meat Stored at Chill Temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 43(2), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00742.x>
- Goodacre, R., Broadhurst, D., Smilde, A. K., Kristal, B. S., Baker, J. D., Beger, R., ... Wulfert, F. (2007). Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*, 3(3), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0081-3>
- Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>
- Gustavsson, P., & Borch, E. (1993). Contamination of beef carcasses by psychrotrophic Pseudomonas and Enterobacteriaceae at different stages along the processing line.



*International Journal of Food Microbiology*, 20(2), 67–83. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90095-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90095-X)

- Haddi, Z., El Barbri, N., Tahri, K., Bougrini, M., El Bari, N., Llobet, E., & Bouchikhi, B. (2015). Instrumental assessment of red meat origins and their storage time using electronic sensing systems. *Analytical Methods*, 7(12), 5193–5203. <https://doi.org/10.1039/c5ay00572h>
- Hansen, T., Petersen, M. A., & Byrne, D. V. (2005). Sensory based quality control utilising an electronic nose and GC-MS analyses to predict end-product quality from raw materials. *Meat Science*, 69(4), 621–634. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.11.024>
- Herbert, R. A., Hendrie, M. S., Gibson, D. M., & Shewan, J. M. (1971). Bacteria Active in the Spoilage of Certain Sea Foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 34(1), 41–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1971.tb02267.x>
- Hinton, M., Coombs, E., Tucker, V., Jones, S., Allen, V., Hudson, W. R., & Corry, J. E. L. (1998). The bacteriological quality of British beef 2. Frozen minced beef. *Meat Science*, 50(4), 395–402. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00048-5)
- Holsteijn, F. van, & Kemna, R. (2018). Minimizing food waste by improving storage conditions in household refrigeration. *Resources, Conservation and Recycling*. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.09.012>
- Huang, S. cheng, Cao, Q. qin, Cao, Y. bing, Yang, Y. rong, Xu, T. ting, Yue, K., ... Wang, X. bing. (2020). Morinda officinalis polysaccharides improve meat quality by reducing oxidative damage in chickens suffering from tibial dyschondroplasia. *Food Chemistry*, 344, 128688. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128688>
- Illikoud, N., Rossero, A., Chauvet, R., Courcoux, P., Pilet, M.-F., Charrier, T., ... Zagorec, M. (2019). Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *Food Microbiology*, 81, 22–31. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.01.015>
- Insausti, K., Beriain, M. J., Gorraiz, C., & Purroy, A. (2002). Volatile Compounds of Raw Beef from 5 Local Spanish Cattle Breeds Stored Under Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, 67(4), 1580–1589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10325.x>
- Insausti, K., Goñi, V., Petri, E., Gorraiz, C., & Beriain, M. J. (2005). Effect of weight at slaughter on the volatile compounds of cooked beef from Spanish cattle breeds. *Meat Science*, 70(1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.003>
- Jääskeläinen, E., Hultman, J., Parshintsev, J., Riekkola, M.-L., & Björkroth, J. (2016). Development of spoilage bacterial community and volatile compounds in chilled beef under vacuum or high oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 25–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.022>
- Jackson, T. C., Acuff, G. R., Vanderzant, C., Sharp, T. R., & Savell, J. W. (1992). Identification and evaluation of volatile compounds of vacuum and modified atmosphere packaged beef strip loins. *Meat Science*, 31(2), 175–190. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(92\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0309-1740(92)90037-5)
- Jakes, W., Gerdova, A., Defernez, M., Watson, A. D., McCallum, C., Limer, E., ... Kemsley, E. K. (2015). Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz 1H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 175, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.110>
- JAKOBSEN, M., & BERTELSEN, G. (2007). The use of CO<sub>2</sub> in packaging of fresh red meats and its effect on chemical quality changes in the meat: A review. *Journal of Muscle Foods*, 13, 143–168. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2002.tb00326.x>

- Kammenou, M., Metaxopoulos, J., & Drosinos, E. (2003). Microbiological quality of minced beef from butcher shops and supermarkets. *Italian Journal of Food Science*, *15*, 95–104.
- Kamruzzaman, M., Barbin, D., Elmasry, G., Sun, D. W., & Allen, P. (2012). Potential of hyperspectral imaging and pattern recognition for categorization and authentication of red meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *16*, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.07.007>
- Kamruzzaman, M., Sun, D., Elmasry, G., & Allen, P. (2013). Talanta Fast detection and visualization of minced lamb meat adulteration using NIR hyperspectral imaging and multivariate image analysis. *Talanta*, *103*, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.020>
- Kapetanakou, A. E., Agathagelou, E. I., & Skandamis, P. N. (2014). Storage of pork meat under modified atmospheres containing vapors from commercial alcoholic beverages. *International Journal of Food Microbiology*, *178*, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.021>
- Kilcher, S., Loessner, M. J., & Klumpp, J. (2010). Brochothrix thermosphacta bacteriophages feature heterogeneous and highly mosaic genomes and utilize unique prophage insertion sites. *Journal of Bacteriology*, *192*(20), 5441–5453. <https://doi.org/10.1128/JB.00709-10>
- King, M. F., Hamilton, B. L., Matthews, M. A., Rule, D. C., & Field, R. A. (1993). Isolation and identification of volatiles and condensable material in raw beef with supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(11), 1974–1981. <https://doi.org/10.1021/jf00035a030>
- Kirsching, Á., Bázár, G., Házás, Z., & Romvári, R. (2012). Classification of meat with boar taint using an electronic nose. *Acta Agriculturae Slovenica*, *100*(SUPPL.3), 99–103.
- Klein, D., Breuch, R., von der Mark, S., Wickleder, C., & Kaul, P. (2019). Detection of spoilage associated bacteria using Raman-microspectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Talanta*, *196*, 325–328. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.12.094>
- Klein, D., Maurer, S., Herbert, U., Kreyenschmidt, J., & Kaul, P. (2017). Detection of Volatile Organic Compounds Arising from Chicken Breast Filets Under Modified Atmosphere Packaging Using TD-GC/MS. *Food Anal. Methods (Food Analytical Methods)*, *11*(1), 88–98.
- Klein, D., Maurer, S., Herbert, U., Kreyenschmidt, J., & Kaul, P. (2018). Detection of Volatile Organic Compounds Arising from Chicken Breast Filets Under Modified Atmosphere Packaging Using TD-GC/MS. *Food Analytical Methods*, *11*(1), 88–98. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0978-z>
- Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. E. (1999). Chemical and sensory changes associated with microbial flora of mediterranean boque (Boops boops) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(2), 698–706. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.698-706.1999>
- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G.-J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, *25*(7), 915–921. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.05.006>
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. E. (2006). Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Applied and*

*Environmental Microbiology*, 72(1), 124 LP – 134.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.2006>

- Ladikos, D., & Lougovois, V. (1990, January 1). Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chemistry*, Vol. 35, pp. 295–314. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90019-Z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90019-Z)
- Lahlali, R., Serrhini, M. N., & Jijakli, M. H. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.002>
- Lambert, A. D., Smith, J. P., & Dodds, K. L. (1991). Shelf-life extension and microbiological safety of fresh meat--a review. *Food Microbiology*, 8(4), 267–297. [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(05\)80002-4](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(05)80002-4)
- Lee, C.-E., Seong, P.-N., Oh, W.-Y., Ko, M.-S., Kim, K.-I., & Jeong, J.-H. (2007). Nutritional characteristics of horsemeat in comparison with those of beef and pork. *Nutrition Research and Practice*, 1(1), 70. <https://doi.org/10.4162/nrp.2007.1.1.70>
- Lei, Z., Li, H., Chang, J., Zhao, P. X., & Sumner, L. W. (2012). MET-IDEA version 2.06; improved efficiency and additional functions for mass spectrometry-based metabolomics data processing. *Metabolomics*, 8(June), 105–110. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0397-5>
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
- Leistner, L., & Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6(2), 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88941-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88941-4)
- Leroy, F., Vasilopoulos, C., Van Hemelryck, S., Falony, G., & De Vuyst, L. (2009). Volatile analysis of spoiled, artisan-type, modified-atmosphere-packaged cooked ham stored under different temperatures. *Food Microbiology*, 26(1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.08.005>
- Li, N., Zhang, Y., Wu, Q., Gu, Q., Chen, M., Zhang, Y., ... Zhang, J. (2019). High-throughput sequencing analysis of bacterial community composition and quality characteristics in refrigerated pork during storage. *Food Microbiology*, 83(100), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.013>
- Lin, J., Zhang, P., Pan, Z., Xu, H., Luo, Y., & Wang, X. (2013). Discrimination of oolong tea (*Camellia sinensis*) varieties based on feature extraction and selection from aromatic profiles analysed by HS-SPME/GC-MS. *Food Chemistry*, 141(1), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.128>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Campagnol, P. C. B., Zhu, Z., Alpas, H., Barba, F. J., & Tomasevic, I. (2017). Technological aspects of horse meat products – A review. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.094>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.023>
- Malti, J., & Amarouch, H. (2008). Microbial and Physicochemical Characterization of the Horse Meat in Fermented Sausage. *Food Biotechnology - FOOD BIOTECHNOL*, 22, 276–296. <https://doi.org/10.1080/08905430802262830>

- Manios, S. G., Grivokostopoulos, N. C., Bikouli, V. C., Doultzos, D. A., Zilelidou, E. A., Gialitaki, M. A., & Skandamis, P. N. (2015). A 3-year hygiene and safety monitoring of a meat processing plant which uses raw materials of global origin. *International Journal of Food Microbiology*, *209*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.028>
- Mann, E., Dzieciol, M., Metzler-Zebeli, B. U., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2014). Microbiomes of unreactive and pathologically altered ileocecal lymph nodes of slaughter pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(1), 193–203. <https://doi.org/10.1128/AEM.03089-13>
- Mann, E., Wetzels, S. U., Piniór, B., Metzler-Zebeli, B. U., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2016). Psychrophile spoilers dominate the bacterial microbiome in musculature samples of slaughter pigs. *Meat Science*, *117*, 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2016.02.034>
- Mansur, A. R., Seo, D.-H., Song, E.-J., Song, N.-E., Hwang, S. H., Yoo, M., & Nam, T. G. (2019). Identifying potential spoilage markers in beef stored in chilled air or vacuum packaging by HS-SPME-GC-TOF/MS coupled with multivariate analysis. *LWT*, *112*, 108256. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108256>
- Mansur, A. R., Song, E. J., Cho, Y. S., Nam, Y. Do, Choi, Y. S., Kim, D. O., ... Nam, T. G. (2019). Comparative evaluation of spoilage-related bacterial diversity and metabolite profiles in chilled beef stored under air and vacuum packaging. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.006>
- McMeekin, T. A. (1993). *Predictive microbiology: theory and application*. Taunton, Somerset, England; New York: Research Studies Press ; J. Wiley & Sons.
- McMeekin, T., Bowman, J., McQuestin, O., Mellefont, L., Ross, T., & Tamplin, M. (2008). The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology*, *128*(1), 2–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.026>
- Mcmeekin, T., Smale, N., Jenson, I., Ross, T., & Tanner, D. (2006). Combining microbial growth models with near real-time temperature monitoring technologies to estimate the shelf life and safety of foods during processing and distribution. *Proceedings of the 2nd International Workshop on Cold Chain Management, Bonn*, 71–78.
- McMillin, K. W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, *80*(1), 43–65. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.028>
- Meza-Márquez, O. G., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2010). Application of mid-infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. *Meat Science*, *86*(2), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.044>
- Miller, A., Scanlan, R. A., Lee, J. S., Libbey, L. M., & Morgan, M. E. (1973). Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *Applied Microbiology*, *25*(2), 257–261. <https://doi.org/10.1128/aem.25.2.257-261.1973>
- MIN, D. B. S., INA, K., PETERSON, R. J., & CHANG, S. S. (1979). PRELIMINARY IDENTIFICATION OF VOLATILE FLAVOR COMPOUNDS IN THE NEUTRAL FRACTION OF ROAST BEEF. *Journal of Food Science*, *44*(3), 639–642. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08465.x>
- Mohareb, F., Papadopoulou, O., Panagou, E., Nychas, G. J., & Bessant, C. (2016). Ensemble-

- based support vector machine classifiers as an efficient tool for quality assessment of beef fillets from electronic nose data. *Analytical Methods*, 8(18), 3711–3721. <https://doi.org/10.1039/c6ay00147e>
- Molimard, P., & Spinnler, H. E. (1996). Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 169–184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, 49(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)90042-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)90042-0)
- Moretti, V. M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M. A., Panseri, S., ... Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science*, 66(4), 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.08.006>
- Musatov, V., Sysoev, V., Sommer, M., & Kiselev, I. (2010). Assessment of meat freshness with metal oxide sensor microarray electronic nose: A practical approach. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 144, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.10.040>
- Newsholme, P. (2016). Overview: Metabolomics and lipidomics in nutrition and metabolism research. *Essays in Biochemistry*, 60(5), 407. <https://doi.org/10.1042/EBC20160047>
- Nieminen, T. T., Dalgaard, P., & Björkroth, J. (2016). Volatile organic compounds and *Photobacterium phosphoreum* associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged raw pork. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.003>
- Nurjuliana, M., Che Man, Y. B., Mat Hashim, D., & Mohamed, A. K. S. (2011). Rapid identification of pork for halal authentication using the electronic nose and gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer. *Meat Science*, 88(4), 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.022>
- Nychas, G.-J. E., & Skandamis, P. N. (2005). 22 - Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In J. N. B. T.-I. the S. of F. M. Sofos (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 461–502). <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845691028.2.461>
- Nychas, G.-J. E., & Tassou, C. C. (1997). Spoilage Processes and Proteolysis in Chicken as Detected by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2), 199–208. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199706\)74:2<199::AID-JSFA790>3.0.CO;2-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199706)74:2<199::AID-JSFA790>3.0.CO;2-4)
- Nychas, G.-J., Marshall, D. L., & Sofos, J. (2007). Meat, poultry, and seafood. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 105–140. <https://doi.org/10.1128/9781555815912.ch6>
- Nychas, G.-J.E., Dourou, D., Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Baranyi, J., & Sofos, J. (2009). Effect of microbial cell-free meat extract on the growth of spoilage bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1819–1829. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04377.x>
- Nychas, G J E, Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1998). Chemical changes in stored meat. *Microbiology of Meat and Poultry*. London ; New York: Blackie Academic & Professional, 1998.
- Nychas, George-John E, Panagou, E. Z., & Mohareb, F. (2016). s. *Current Opinion in Food Science*, 12, 13–20. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2016.06.005>

- Nychas, George-John E, Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1), 77–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>
- Nychas, George John E., Panagou, E. Z., & Mohareb, F. (2016). Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, 12, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.06.005>
- O’Callaghan, T. F., Hennessy, D., McAuliffe, S., Kilcawley, K. N., O’Donovan, M., Dillon, P., ... Stanton, C. (2016). Effect of pasture versus indoor feeding systems on raw milk composition and quality over an entire lactation. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9424–9440. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2016-10985>
- Olegário, L. S., Andrade, J. K. S., Andrade, G. R. S., Denadai, M., Cavalcanti, R. L., da Silva, M. A. A. P., & Narain, N. (2019). Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. *Food Research International*, 123(March), 481–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.004>
- Orrillo, I., Cruz-Tirado, J. P., Cardenas, A., Oruna, M., Carnero, A., Barbin, D. F., & Siche, R. (2019). Hyperspectral imaging as a powerful tool for identification of papaya seeds in black pepper. *Food Control*, 101, 45–52. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.02.036>
- OSCAR, T. P. (2005). MODELING MICROBIAL RESPONSES IN FOOD. *Journal of Food Quality*, 28(4), 404–405. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00029.x>
- Panagou, E. Z., Mohareb, F. R., Argyri, A. A., Bessant, C. M., & Nychas, G. J. E. (2011). A comparison of artificial neural networks and partial least squares modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.014>
- 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*, 174C, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.026>
- Panigrahi, S., Balasubramanian, S., Gu, H., Logue, C., & Marchello, M. (2006). Neural-network-integrated electronic nose system for identification of spoiled beef. *LWT - Food Science and Technology*, 39(2), 135–145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.01.002>
- Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Botta, C., Cocolin, L., & Nychas, G. J. E. (2012). Genotypic characterization of *Brochothrix thermosphacta* isolated during storage of minced pork under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Meat Science*, 92(4), 735–738. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.030>
- Papadopoulou, O. S., Iliopoulos, V., Mallouchos, A., Panagou, E. Z., Chorianopoulos, N., Tassou, C. C., & Nychas, G. J. E. (2020). Spoilage potential of *Pseudomonas* (*P. fragi*, *P. putida*) and LAB (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*) strains and their volatile profile during storage of sterile pork meat using GC/MS and data analytics. *Foods*, 9(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods9050633>
- Papadopoulou, O. S., Panagou, E. Z., Mohareb, F. R., & Nychas, G.-J. E. (2013a). Sensory and microbiological quality assessment of beef fillets using a portable electronic nose in tandem with support vector machine analysis. *Food Research International*, 50(1), 241–249. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.10.020>

- Papadopoulou, O. S., Panagou, E. Z., Mohareb, F. R., & Nychas, G. J. E. (2013b). Sensory and microbiological quality assessment of beef fillets using a portable electronic nose in tandem with support vector machine analysis. *Food Research International*, *50*(1), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.020>
- Paramithiotis, S., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. (2009). Insights into Fresh Meat Spoilage. In *Safety of Meat and Processed Meat* (pp. 55–82). [https://doi.org/10.1007/978-0-387-89026-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-89026-5_3)
- Park, S. Y., Yoon, Y. M., Schilling, M. W., & Chin, K. B. (2009). Evaluation of volatile compounds isolated from pork loin (*Longissimus dorsi*) as affected by fiber type of solid-phase microextraction (SPME), preheating and storage time. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *29*(5), 579–589. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2009.29.5.579>
- Parlapani, F. F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *189*, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.006>
- Parsons, H. M., Ekman, D. R., Collette, T. W., & Viant, M. R. (2009). Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics. *Analyst*, *134*(3), 478–485. <https://doi.org/10.1039/B808986H>
- Pastorelli, G., Magni, S., Rossi, R., Pagliarini, E., Baldini, P., Dirinck, P., ... Corino, C. (2003). Influence of dietary fat, on fatty acid composition and sensory properties of dry-cured Parma ham. *Meat Science*, *65*(1), 571–580. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00250-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00250-4)
- Pavlidis, D. E., Mallouchos, A., Ercolini, D., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2019). A volatilomics approach for off-line discrimination of minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.01.003>
- Pavlidis, D. E., Mallouchos, A., & Nychas, G. J. (2021). Microbiological assessment of aerobically stored horse fillets through predictive microbiology and metabolomic approach. *Meat Science*, *172*(July 2020), 108323. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108323>
- Pennacchia, C., Ercolini, D., & Villani, F. (2009). Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. *International Journal of Food Microbiology*, *134*(3), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.005>
- Pérez Chabela, M. ., Rodríguez Serrano, G. ., Lara Calderón, P., & Guerrero, I. (1999). Microbial spoilage of meats offered for retail sale in Mexico City. *Meat Science*, *51*(4), 279–282. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00096-5)
- Peris, M., & Escuder-Gilabert, L. (2009). A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.02.009>
- Peris, M., & Escuder-Gilabert, L. (2016, December 1). Electronic noses and tongues to assess food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 58, pp. 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.014>
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., & Ercolini, D. (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*, *109*, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.014>

- Pothakos, V., Samapundo, S., & Devlieghere, F. (2012). Total mesophilic counts underestimate in many cases the contamination levels of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) in chilled-stored food products at the end of their shelf-life. *Food Microbiology*, *32*(2), 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.011>
- Pothakos, V., Snauwaert, C., De Vos, P., Huys, G., & Devlieghere, F. (2014). Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. *Food Microbiology*, *39*, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.005>
- Rajamäki, T., Alakomi, H. L., Ritvanen, T., Skyttä, E., Smolander, M., & Ahvenainen, R. (2006). Application of an electronic nose for quality assessment of modified atmosphere packaged poultry meat. *Food Control*, *17*(1), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.08.002>
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., & Chandler, R. E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, *154*(3), 1222–1226. <https://doi.org/10.1128/jb.154.3.1222-1226.1983>
- Regattieri, A., Gamberi, M., & Manzini, R. (2007). Traceability of food products: General framework and experimental evidence. *Journal of Food Engineering*, *81*(2), 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.032>
- Reis, M. M., Reis, M. G., Mills, J., Ross, C., & Brightwell, G. (2016). Characterization of volatile metabolites associated with confinement odour during the shelf-life of vacuum packed lamb meat under different storage conditions. *Meat Science*, *113*, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.11.017>
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M. F., & Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009>
- Ren, J., Deng, T., Huang, W., Chen, Y., & Ge, Y. (2017). A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food. *PLOS ONE*, *12*(3), e0173567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173567>
- Resconi, V. C., Bueno, M., Escudero, A., Magalhaes, D., Ferreira, V., & Campo, M. M. (2018). Ageing and retail display time in raw beef odour according to the degree of lipid oxidation. *Food Chemistry*, *242*, 288–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.036>
- Resconi, V., Escudero, A., & Campo, M. (2013). The Development of Aromas in Ruminant Meat. *Molecules*, *18*(6), 6748–6781. <https://doi.org/10.3390/molecules18066748>
- Rocchi, R., Mascini, M., Faberi, A., Sergi, M., Compagnone, D., Di Martino, V., ... Pittia, P. (2019). Comparison of IRMS, GC-MS and E-Nose data for the discrimination of saffron samples with different origin, process and age. *Food Control*, *106*, 106736. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106736>
- Rohman, A., Sismindari, Erwanto, Y., & Che Man, Y. B. (2011). Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Science*, *88*(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.007>
- Ropodi, A.I., Pavlidis, D. E., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2015). Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. *Food Research International*, *67*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.032>



- Ropodi, Athina I., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2017). Multispectral imaging (MSI): A promising method for the detection of minced beef adulteration with horsemeat. *Food Control*, *73*, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.048>
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*(5), 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>
- Ross, T., & McMeekin, T. A. (1994). Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, *23*(3–4), 241–264. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90155-4)
- Rossier, E. (2003). *HORSE MEAT* (B. B. T.-E. of F. S. and N. (Second E. Caballero, Ed.)). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00607-6>
- Ruiz Orduna, A., Husby, E., Yang, C. T., Ghosh, D., & Beaudry, F. (2017). Detection of meat species adulteration using high-resolution mass spectrometry and a proteogenomics strategy. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, *34*(7), 1110–1120. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1329951>
- Sabow, A. B., Sazili, A. Q., Aghwan, Z. A., Zulkifli, I., Goh, Y. M., Ab Kadir, M. Z. A., ... Adeyemi, K. D. (2016). Changes of microbial spoilage, lipid-protein oxidation and physicochemical properties during post mortem refrigerated storage of goat meat. *Animal Science Journal*, *87*(6), 816–826. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/asj.12496>
- Säde, E. (2011). Leuconostoc spoilage of refrigerated, packaged foods. In *Veterinary Medicine*.
- Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., ... Ogawa, M. (2002). Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1–2), 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00732-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00732-2)
- Saraiva, C., Oliveira, I., Silva, J. A., Martins, C., Ventanas, J., & García, C. (2015). Implementation of multivariate techniques for the selection of volatile compounds as indicators of sensory quality of raw beef. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(6), 3887–3898. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1447-y>
- SHERIDAN, J. J. (1998). SOURCES OF CONTAMINATION DURING SLAUGHTER AND MEASURES FOR CONTROL. *Journal of Food Safety*, *18*(4), 321–339. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1998.tb00223.x>
- Shurubor, Y. I., Paolucci, U., Krasnikov, B. F., Matson, W. R., & Kristal, B. S. (2005). Analytical precision, biological variation, and mathematical normalization in high data density metabolomics. *Metabolomics*, *1*(1), 75–85. <https://doi.org/10.1007/s11306-005-1109-1>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01467.x>
- Skandamis, Panagiotis N, & Nychas, G.-J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *79*(1–2), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00177-0)
- Smit, B. A., Engels, W. J. M., & Smit, G. (2009). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(6), 987–999. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1758-x>

- Soares, S., Amaral, J. S., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science*, 85(3), 531–536. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2010.03.001>
- Socrates, G. (2001). Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts. In *Journal of Raman Spectroscopy*. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1238>
- Sokolova, M., & Lapalme, G. (2009). A systematic analysis of performance measures for classification tasks. *Information Processing and Management*, 45(4), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.ipm.2009.03.002>
- Soncin, S., Chiesa, L. M., Cantoni, C., & Biondi, P. A. (2007a). Preliminary study of the volatile fraction in the raw meat of pork, duck and goose. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 436–439. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.001>
- Soncin, S., Chiesa, L. M., Cantoni, C., & Biondi, P. A. (2007b). Preliminary study of the volatile fraction in the raw meat of pork, duck and goose. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 436–439. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.001>
- Song, S., Yuan, L., Zhang, X., Hayat, K., Chen, H., Liu, F., ... Niu, Y. (2013). Rapid measuring and modelling flavour quality changes of oxidised chicken fat by electronic nose profiles through the partial least squares regression analysis. *Food Chemistry*, 141(4), 4278–4288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.009>
- Springer, A., Riedl, J., Esslinger, S., Roth, T., A Glomb, M., & Fauhl-Hassek, C. (2014). Validated Modeling for German White Wine Varietal Authentication Based on Headspace Solid-Phase Microextraction Online Coupled with Gas Chromatography Mass Spectrometry Fingerprinting. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 62). <https://doi.org/10.1021/jf502042c>
- Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S. M., Singh, T., Tamplin, M., & Chandry, P. S. (2018). Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 268(November 2017), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.005>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Stolzenbach, S., Leisner, J. J., & Byrne, D. V. (2009). Sensory shelf life determination of a processed meat product “rullepølse” and microbial metabolites as potential indicators. *Meat Science*, 83(2), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.011>
- Suzuki, J., & Bailey, M. E. (1985). Direct sampling capillary GLC analysis of flavor volatiles from ovine fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(3), 343–347. <https://doi.org/10.1021/jf00063a006>
- Tamplin, M. L. (2018). Integrating predictive models and sensors to manage food stability in supply chains. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.001>
- Tian, X., Wang, J., & Cui, S. (2013). Analysis of pork adulteration in minced mutton using electronic nose of metal oxide sensors. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 744–749. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.004>
- Timsorn, K., Thoopboochagorn, T., Lertwattanasakul, N., & Wongchoosuk, C. (2016). Evaluation of bacterial population on chicken meats using a briefcase electronic nose. *Biosystems Engineering*, 151, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.09.005>

- Trivedi, D. K., Hollywood, K. A., Rattray, N. J. W., Ward, H., Trivedi, D. K., Greenwood, J., ... Goodacre, R. (2016). Meat, the metabolites: An integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork. *Analyst*, *141*(7), 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/c6an00108d>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.019>
- Valdramidis, V. (2016). Predictive microbiology. In *Modeling in Food Microbiology: From Predictive Microbiology to Exposure Assessment*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-155-0.50001-0>
- Van Boxstael, S., Devlieghere, F., Berkvens, D., Vermeulen, A., & Uyttendaele, M. (2014). Understanding and attitude regarding the shelf life labels and dates on pre-packed food products by Belgian consumers. *Food Control*, *37*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.08.043>
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, *7*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Vasta, V., & Priolo, A. (2006). Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. *Meat Science*, *73*(2), 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.017>
- Vestergaard, J., Martens, M., & Turkki, P. (2007). Application of an Electronic Nose System for Prediction of Sensory Quality Changes of a Meat Product (Pizza Topping) During Storage. *LWT - Food Science and Technology*, *40*, 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.06.008>
- Wang, D., Wang, X., Liu, T., & Liu, Y. (2012). Prediction of total viable counts on chilled pork using an electronic nose combined with support vector machine. *Meat Science*, *90*(2), 373–377. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2011.07.025>
- Wang, Q., Li, L., Ding, W., Zhang, D., Wang, J., Reed, K., & Zhang, B. (2019). Adulterant identification in mutton by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometer. *Food Control*, *98*, 431–438. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.11.038>
- Wenk, M. R. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*(7), 594–610. <https://doi.org/10.1038/nrd1776>
- Wu, D., Shi, H., He, Y., Yu, X., & Bao, Y. (2013). Potential of hyperspectral imaging and multivariate analysis for rapid and non-invasive detection of gelatin adulteration in prawn. *Journal of Food Engineering*, *119*(3), 680–686. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.06.039>
- Wu, H., Qian, C., Wang, R., Wu, C., Wang, Z., Wang, L., ... Wu, J. (2020). Identification of pork in raw meat or cooked meatballs within 20 min using rapid PCR coupled with visual detection. *Food Control*, *109*, 106905. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106905>
- Xu, Y.-J. (2017). Foodomics: A novel approach for food microbiology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *96*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.05.012>
- Xu, Y., Correa, E., & Goodacre, R. (2013). Integrating multiple analytical platforms and chemometrics for comprehensive metabolic profiling: application to meat spoilage detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*(15), 5063–5074.

<https://doi.org/10.1007/s00216-013-6884-3>

- Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science*, 70(1), R1–R10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09052.x>
- Young, L. L., Reviere, R. D., & Cole, A. B. (n.d.). Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres. *Food Technology (USA)*.
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., & Uden, G. (2006). Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(3), 421–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0514-3>
- Zeppa, G., Conterno, L., & Gerbi, V. (2001). Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2722–2726. <https://doi.org/10.1021/jf0009403>
- Zhao, M., Downey, G., & O'Donnell, C. P. (2014). Detection of adulteration in fresh and frozen beefburger products by beef offal using mid-infrared ATR spectroscopy and multivariate data analysis. *Meat Science*, 96(2), 1003–1011. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.015>
- Zheng, X., Li, Y., Wei, W., & Peng, Y. (2019). Detection of adulteration with duck meat in minced lamb meat by using visible near-infrared hyperspectral imaging. *Meat Science*, 149, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.11.005>
- Zini, C. A., Augusto, F., Christensen, E., Caramão, E. B., & Pawliszyn, J. (2002). SPME Applied to the Study of Volatile Organic Compounds Emitted by Three Species of Eucalyptus in Situ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7199–7205. <https://doi.org/10.1021/jf025666m>
- Zotta, T., Parente, E., Ianniello, R. G., De Filippis, F., & Ricciardi, A. (2019). Dynamics of bacterial communities and interaction networks in thawed fish fillets during chilled storage in air. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.008>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Πίνακες / Supplementary Material (Tables)

**Table S2.1:** Mean peak areas of common volatile compounds identified in Beef, Pork and Mixed meat samples and effect of sampling in different seasons of the year

Volatile Compound	<sup>b</sup> Group	Mean Peak Area and Effect of Seasonality <sup>a</sup>			
		Beef	Pork	Mixed	Whole dataset
ALCOHOLS					
Ethanol	Alc1	2714673*	1612081*	3714330	2357272*
Propanol	Alc2	1288094	1275316*	1039991*	1252699*
2-Butanol	Alc3	201876*	55842*	445903	167974*
Butanol	Alc4	95015*	76826*	118639 *	89978
1-Penten-3-ol	Alc5	771533*	310907*	653677	557778*
3-Methyl-1-butanol	Alc6	75652*	35603*	80167	58844*
Pentanol	Alc7	1866587*	1151364*	1009895	1453606*
Hexanol	Alc8	796905*	227770*	490410	513434
1-Octen-3-ol	Alc9	4133882*	2235423*	3177352	3196236*
2-Octen-1-ol	Alc10	32093*	12666*	6136	20552*
1-Octanol	Alc11	111400*	49501*	37114	75641*
ALDEHYDES					
Acetaldehyde	Ald1	77646*	61854*	92172*	72552*
3-Methylbutanal	Ald2	243381*	19489*	229789 *	144742
Pentanal	Ald3	746857*	1228225*	835821	966122*
Hexanal	Ald4	24908814 *	33193008*	23853542*	28371025*
(E)-2-Hexenal	Ald5	16944*	50470*	-	29430*
Heptanal	Ald6	750550*	480320*	514731	605089*
(E)-2-Heptenal	Ald7	192725*	409156*	170796	283857*
Benzaldehyde	Ald8	57549*	72935*	-	57289*
Octanal	Ald9	258300*	192451*	190966	221667*
(E)-2-Octenal	Ald10	116967*	204060*	96211	152203*
Nonanal	Ald11	549675	546346*	324105	521085*
Decanal	Ald12	27182	27919	-	39440
KETONES					
Acetone	Ket1	1085539*	418743*	2205710	931456*
2,3-Butanedione	Ket2	1180105	202074	648233	692352
2-Butanone	Ket3	708699	77372*	745926	439651
1-Penten-3-one	Ket4	104918*	81118*	122365 *	96706*
2-Pentanone	Ket5	234868*	213159	277169	230553*
3-Hydroxy-2-butanone	Ket6	761262*	10003*	103403	356598*
2-Heptanone	Ket7	188505*	97714*	137148	142988*
1-Octen-3-one	Ket8	268019*	636720*	233163	423568*
2,5-Octanedione	Ket9	5199729*	2953097*	4100639*	4094077*
ESTERS					

Methyl acetate	Est1	55947*	12254*	538039	96780*
Ethyl acetate	Est2	314691*	45426*	843332*	287938*
Ethyl butanoate	Est3	20638*	7215*	22957*	15102*
Ethyl hexanoate	Est4	80191	28299*	95179	59512*
HYDROCARBONS					
Cyclopentane	Hyd1	110926*	71052*	340287	121253*
Hexane	Hyd2	782886*	785075*	732492*	777770*
Heptane	Hyd3	94789*	151831*	192345*	131244*
Nonane	Hyd4	79164*	59285*	59881	68231*
Heptane2,2,4,6,6-pentamethyl	Hyd5	4476834*	3976745*	2072602*	3970816*
Decane	Hyd6	159885*	147444*	121612*	149889*
Undecane	Hyd7	23693*	22348*	-	20259*
Dodecane	Hyd8	38923	42290	31096	39440
MISCELLANEOUS					
Dimethyl sulfide	Mis1	230532*	16924*	110848*	123580*
2-Ethyl-furan	Mis2	153558	71632	116037	113547
2-Pentyl-furan	Mis3	247785*	33195*	194948	148453*
TERPENES					
$\alpha$ -Pinene	Ter1	875290*	418027*	3942230	1046283*
Sabinene	Ter2	215262*	77928*	1971573	367133*
$\beta$ -Pinene	Ter3	287929*	93973*	941295	282528*
$\delta$ -3-Carene	Ter4	124799*	69860	146967	103664*
p-Cymene	Ter5	1899895	890460*	5870737	1940438*
Limonene	Ter6	351575*	333723*	414552*	351420*

<sup>a</sup>**Mean Peak Area:** mean peak area for each meat species

<sup>b</sup>**Group:** volatile group belonging each volatile compound; **alc:** alcohols; **ald:** aldehydes; **ket:** ketones; **est:** esters; **hyd:** hydrocarbons; **mis:** miscellaneous

**Columns 3-6:** \*Statistical Analysis by Kruskal-Wallis; p-values<0.05 indicate statistically significant variable during sampling at different seasons

**Table S2.2:** Additional volatile compounds not included in statistical analysis.

Compound	Rt	RI	Reliability of identification	m/z
<b>Alcohols</b>				
2-Methyl-3-buten-2-ol	2.26	611	C	71
3-Methyl-3-buten-1-ol	3.99	727	C	56
Heptanol	13.32	974	A	70
2-Ethyl-1-hexanol	15.71	1032	A	81

<b>Aldehydes</b>				
2-Methylbutanal	2.79	658	B	57
(E)-2-Pentenal	4.67	750	C	83
<b>Ketones</b>				
2,3-Pentanedione	3.24	697	A	100
2-Octanone	14.16	993	B	58
3-Octen-2-one	16.16	1041	C	111
<b>Esters</b>				
Methyl butyrate	3.78	719	A	74
Ethyl lactate	6.71	817	A	45
Methyl hexanoate	11.35	927	A	74
<b>Terpenoids</b>				
Camphene	12.162	946	B	93
Myrcene	14.12	992	A	93
Eucalyptol	15.69	1030	B	81
$\gamma$ -Terpinene	16.86	1059	A	136
Camphor	20.20	1144	A	95
<b>Hydrocarbons</b>				
Pentane, 3-methyl-	2.04	586	C	57
Cyclopentane, methyl-	2.40	624	C	56
Cyclohexane, methyl-	3.74	717	C	83
Pentane, 2,3,4-trimethyl-	4.36	740	C	71
Pentane, 2,3,3-trimethyl-	4.48	744	C	71
Octene isomer	5.72	789	C	56
Octene isomer	6.31	807	C	112
Octene isomer	6.61	814	C	112
Alkane	6.88	821	C	85
Cyclohexane, ethyl-	7.28	831	C	83
Alkane	15.55	1027	C	57
Alkane	15.95	1031	C	57
<b>Aromatic Hydrocarbons</b>				
Benzene	2.76	656	A	78
Toluene	4.89	759	A	91
Ethyl benzene	8.50	859	B	91
Xylene isomer	8.80	867	C	91
Styrene	9.70	889	B	104
Xylene isomer	9.79	891	C	91
Naphthalene	21.58	1181	A	128
<b>Chlorine-containing</b>				
Methylene Chloride	1.83	551	A	84
Trichloromethane	2.31	616	B	83
Tetrachloroethylene	6.35	808	C	166
<b>Miscellaneous</b>				
Carbon disulfide	1.86	555	C	76

**RI:** Retention Indices based on n-alkanes

**Rt:** Retention time of each identified volatile compound

**m/z:** target ion used for quantification;

**A:** MS data and RI in agreement with those of authentic compound,

**B:** MS data and RI in close agreement with those in literature and NIST14 MS library (peak matching > 95%),

**C:** MS data and RI not in close agreement with those in literature and NIST14 MS library (80% < peak matching < 95%)

**Table S3.1:** Estimated growth kinetics parameters for the microbial groups Total Viable Counts (TVC), *Pseudomonas* spp., *Brochothrix (B.) thermosphacta*, lactic acid bacteria (LAB), Enterobacteriaceae and Yeasts and Moulds (Y&M) measured in this study

Μικροβιακή Ομάδα	T (°C)	<sup>1</sup> N <sub>0</sub>	<sup>2</sup> N <sub>max</sub>	<sup>3</sup> lag	<sup>4</sup> μ <sub>max</sub>	<sup>5</sup> RMS E	<sup>6</sup> R <sup>2</sup>
OMX	0	2.58 ± 0.27	8.02 ± 0.23	92.02 ± 16.47	0.08 ± 0.01	0.45	0.97
<i>Pseudomonas</i> spp.		3.03 ± 0.24	8.34 ± 0.18	109.95 ± 12.94	0.09 ± 0.01	0.39	0.98
<i>B. thermosphacta</i>		2.39 ± 0.19	7.07 ± 0.18	106.76 ± 13.22	0.07 ± 0.01	0.34	0.99
LAB		1.30 ± 0.14	2.88 ± 0.29	193.39 ± 29	0.04 ± 0.02	0.33	0.82
enterobacteria		-	-	-	-	-	-
Y&M		2.08 ± 0.19	25.11 ± 0.22	137.22 ± 19.68	0.06 ± 0.02	0.38	0.94
OMX	5	3.67 ± 0.26	9.32 ± 0.35	55.03 ± 12.98	0.11 ± 0.01	0.51	0.96
<i>Pseudomonas</i> spp.		3.46 ± 0.30	9.26 ± 0.10	74.10 ± 9.62	0.13 ± 0.02	0.47	0.97
<i>B. thermosphacta</i>		1.99 ± 0.14	7.46 ± 0.11	4.10 ± 7.09	0.07 ± 0.00	0.14	0.99
LAB		0.97 ± 0.05	3.70 ± 0.12	112.16 ± 4.03	0.09 ± 0.01	0.12	0.99
enterobacteria		2.46 ± 0.71	4.57 ± 0.45	73.14 ± 71.92	0.04 ± 0.01	1.14	0.55
Y&M		2.06 ± 0.31	6.96 ± 3.61	46.95 ± 24.31	0.06 ± 0.01	0.43	0.93
OMX	10	2.45 ± 0.40	8.76 ± 0.30	1.72 ± 9.71	0.14 ± 0.01	0.42	0.96
<i>Pseudomonas</i> spp.		2.51 ± 0.41	8.95 ± 0.33	5.00 ± 9.77	0.15 ± 0.02	0.44	0.97
<i>B. thermosphacta</i>		2.03 ± 0.19	7.04 ± 0.13	17.82 ± 4.87	0.18 ± 0.02	0.26	0.99
LAB		1.00 ± 0.05	3.41 ± 0.06	45.78 ± 2.56	0.16 ± 0.02	0.10	0.99
enterobacteria		1.77 ± 0.46	4.66 ± 0.42	54.24 ± 12.07	0.36 ± 0.33	1.02	0.71
Y&M		2.02 ± 0.27	N.D.	40.20 ± 12.61	0.11 ± 0.03	0.48	0.92
OMX	15	2.48 ± 0.29	9.17 ± 0.21	2.36 ± 4.36	0.22 ± 0.01	0.30	0.99
<i>Pseudomonas</i> spp.		2.34 ± 0.31	9.15 ± 0.24	2.91 ± 4.61	0.22 ± 0.01	0.32	0.99
<i>B. thermosphacta</i>		1.88 ± 0.31	7.53 ± 0.21	0.11 ± 5.63	0.18 ± 0.02	0.31	0.98
LAB		0.99 ± 0.39	4.35 ± 0.24	14.40 ± 10.22	0.17 ± 0.05	0.48	0.91
enterobacteria		3.03 ± 0.19	6.89 ± 0.23	36.66 ± 3.97	0.28 ± 0.05	0.32	0.96
Y&M		2.03 ± 0.49	4.13 ± 0.01	0.00 ± 15.30	0.13 ± 0.04	0.51	0.89

<sup>1</sup>: estimated initial value (log<sub>10</sub>CFU/g), <sup>2</sup>: estimated final value (log<sub>10</sub>CFU/g), <sup>3</sup>: lag phase (h), <sup>4</sup>: maximum specific growth rate (h<sup>-1</sup>), <sup>5</sup>: root mean square error (log<sub>10</sub>CFU/g), <sup>6</sup>: coefficient of determination



**Table S4.1:** Common identified compounds that were shown to be metabolized during storage of NC, Ha, SI

Compound <sup>1</sup>	Plarform <sup>2</sup>	Code <sup>3</sup>	Kegg <sup>4</sup>	St <sub>i</sub> <sup>5</sup>	St <sub>ii</sub> <sup>5</sup>	St <sub>iii</sub> <sup>5</sup>	NC <sub>2</sub> <sup>6</sup>	NC <sub>8</sub> <sup>6</sup>	NC <sub>15</sub> <sup>6</sup>	Ha <sub>4</sub> <sup>7</sup>	Ha <sub>10</sub> <sup>7</sup>	SI <sub>4</sub> <sup>8</sup>	SI <sub>10</sub> <sup>8</sup>
<b>Alcohols</b>													
Ethanol	A	<b>Alc1</b>	C00469	–	–	–	↑↓	↑↓	↑↓	–	↑↓	↑	–
1-propanol	A	<b>Alc2</b>	C05979.	↑	–	–	↑*	↑↓	↑↓	↑	↑*	↑	↑*
1-butanol	A	<b>Alc3</b>	C06142	↑	↑	↑	↑↓	↑↓	↑↓	↑	↑↓		↑↓
1-pentanol	A	<b>Alc4</b>	C16834	↑	↑	↑	↑↓*	↑↓*	↑↓*	↑	↑	↑	↑**
1-hexanol	A	<b>Alc5</b>	C00854	–	–	–	↑	↑	↑*	↑	↑*	↑	↑**
1-heptanol	A	<b>Alc6</b>	n.m.	↑	↑	↑	↑↓	↑↓	↑↓	↑	↑*	↑	↑*
1-octanol	A	<b>Alc7</b>	C00756	↑	–	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
2-butanol	A	<b>Alc8</b>	n.m.	↑	–	–	↓	↓	↓	n.d. / traces	↓	↑*	–
1-butanol, methyl	3-A	<b>Alc9</b>	C07328	–	–	–	↑**	↑**	↑**	↑	↑*	↑*	↑*
1-butanol, methyl	2-A	<b>Alc10</b>	n.m.	–	–	–	↑*	↑*	↑*	n.d.	↑	↑	↑
1-propanol, methyl-	2-A	<b>Alc11</b>	C14710	–	–	n.d.	↑*	↑**	↑**	n.d.	n.d. <sup>(c)</sup>	n.d.	n.d.
2-pentanol, methyl-	4-A	<b>Alc12</b>	n.m.	–	–	n.d.	↑	↑	↑	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1-penten-3-ol	A	<b>Alc13</b>	n.m.	↑**	↑**	–	↑↓*	↑↓**	↑↓**	↑	–↓	↑↓	↑*
4-penten-2-ol	A	<b>Alc14</b>	n.m.	–	–	n.d.	↑*	↑↓	↑↓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1-octen-3-ol	A	<b>Alc15</b>	C14272	↑**	↑**	↑	↑↓*	↑↓**	↑↓**	↑	↑	↑	↑
1-hexanol, ethyl	2-A	<b>Alc16</b>	C02498	↑	↑	↑	↑*	↑*	↑*	↑	↑	↑	↑
<b>Aldehydes</b>													
Pentanal	A	<b>Ald1</b>	n.m.	↑	–	–/↓	↑↓	↑↓	↑↓	↓*	↓*	↓*	↓*
Hexanal	A	<b>Ald2</b>	C02373	↑**	↑**	↑**	↑↓*	↑↓**	↑↓**	↓	↓	↓*	↓*
Heptanal	A	<b>Ald3</b>	C14390	↑**	–	–	↑↓	↑↓	↑↓	↓	↓	↓	↓
Octanal	A	<b>Ald4</b>	n.m.	↑	↑	–	↑↓	↑↓	↑↓	↓	↓*	↓*	↓*
Nonanal	A	<b>Ald5</b>	n.m.	↑	–	–	↑↓	↑↓	↓↑	↓	↓	↓	↓
Decanal	A	<b>Ald6</b>	C12307	↑	–/n.d.	–	↓	↓	↓	–	–	–	–

Butanal, methyl	3-	A	<b>Ald7</b>	C07329	–	–	–	↑**	↑*9	↑*9	↑*	↑*	↑*	↑*
Butanal, methyl	2-	A	<b>Ald8</b>	C02223	–	–	–	↑**	↑**	↑**	↑*	↑*	↑*	↑*
Propanal, methyl-	2-	A	<b>Ald9</b>	C03219	–	–	n.d.	↑	↑	↑	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetaldehyde		A	<b>Ald10</b>	C00084	–	–	–	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

### Ketones

2-butanone		A	<b>Ket1</b>	C02845	–	–	–	↑*	↑*	↑*	↑	↑	↑*	↑*
2-pentanone		A	<b>Ket2</b>	C01949	–	–	–	↑*	↑*	↑*	↑	↑*	↑	↑*
2-heptanone		A	<b>Ket3</b>	C08380	–	–	–	↑*	↑*	↑*	↑	↑*	↑	↑*
2-octanone		A	Ket11	n.m.	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
2-nonanone		A	<b>Ket4</b>	n.m.	–	–	– / ↑	↑*	↑**	↑**	↑	↑	↑	↑
2,3-butanedione		A	<b>Ket5</b>	C00741	↓	–	–	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
3-hydroxy-2-butanone		A	<b>Ket6</b>	C00466	–	–	–	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
2,5-octanedione		A	<b>Ket7</b>	n.m.	↑	–	–	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	–	↑↓	↓
5-Hepten-2-one, 6-methyl-		A	<b>Ket8</b>	n.m.	↑	–	↑	↑	↑↓	↑↓	↑	↑	↑	↑
2-pentanone, 4-methyl-	4-	A	Ket9	n.m.	–	–	n.d.	↑	↑	↑	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetone		A	<b>Ket10</b>	C00207	↓	↓	↑	↓	↓	↓	–	–	–	–

### Esters

Methyl acetate		A	<b>Est1</b>	C17530	–	–	–	↑↓	↑↓	↑↓	↓*	↓*	↓*	↓*
Ethyl acetate		A	<b>Est2</b>	C00849	–	–	–	↑↓	↑↓	↑	↑	↑	↑	↑
Ethyl propionate		A	<b>Est3</b>	n.m.	–	–	–	↑	↑	↑	↑	–	–	↑

### Acids

Lactic acid		B	<b>Oac1</b>	C00186	–	–	–	↓*	↓*	↓*	↓	↓	↓	↓
Propionic acid		B	<b>Oac2</b>	n.m.	–	–	–	↓*	↓*	↓*	↓	↓	↓	↓*
Succinic acid		B	<b>Oac3</b>	C00042	–	–	–	↓*	↓*	↓*	↓	↓*	↓	↓*
Malic acid		B	<b>Oac4</b>	C00711	–	–	–	↓↑	↓↑	↓↑	↑	↑	↑	↑
Formic acid		B	<b>Oac5</b>	C00058	–	–	↓	↓	↓*	↓*	↓	↓	↓	↓*
Acetic acid		B	<b>Oac6</b>	C00033	–	–	–	↑*	↑*	↑*	↑	↑	↑	↑*
Citric acid		B	<b>Oac7</b>	C00158	–	–	–	↑	↑	↑	↑	↑		↑

Butyric acid	B	<b>Oac8</b>	C00246	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Isobutyric acid	B	<b>Oac9</b>	C02632	-	-	-	↑↓	↑↓	↑↓	-	↑	↑	↑
Pyruvic acid	B	<b>Oac10</b>	C00022	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-	-
Tartaric acid	B	<b>Oac11</b>	C02107	-	-	-	↑↓	↑	↑	-	-	↑	↑
Oxalic acid	B	<b>Oac12</b>	C00209	-	-	-	↑↓	↑	↑	-	-	↑	↑
Miscellaneous													
Glucose	B	<b>Mis1</b>	C00031	-	-	-	↓*	↓*	↓*	↓	↓	↓	↓
Furan, 2-ethyl-	A	Mis2	n.n.	-	-	-	↑↓	↑↓	↑↓	↓	↓	↓	↓
Furan, 2-pentyl-	A	<b>Mis3</b>	n.n.	↑	-	-	↑↓	↑↓	↑↓	-	↓	-	↓
Dimethyl Sulphide	A	<b>Mis4</b>	C00580	↓	↓	↓		↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑
Hydrocarbons													
1-Undecene	A	Hyd1	n.n.	n.d.	n.d.	n.d.	↑**	↑**	↑**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cyclohexane	A	Hyd2	n.n.	n.d.	n.d.	n.d.	↑**	↑**	↑**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>1</sup>: ένωση που προσδιορίστηκε και χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη,<sup>2</sup>Πλατφόρμα A: GC/MS, B: HPLC-PDA-RI;

<sup>3</sup>: Κωδικός: Alc: αλκοόλες; Ald: αλδεΐδες; Ket: κετόνες; Est: εστέρες; Mis: Miscellaneous; OAC: οργανικά οξέα; Hyd: υδρογονάνθρακες; <sup>4</sup>: σήμανση με βάση το Keg pathway; n.n.: μη συμφωνία ουσίας με κωδικό βιβλιοθήκης.

<sup>5</sup>: Sti, ii, iii: παρτίδα χωρίς φυσιολογική χλωρίδα ("στείρο") 1,2, και 3; <sup>6</sup>: NC<sub>2,8,15</sub>: παρτίδα με φυσιολογική χλωρίδα ("φυσικά επιμολυσμένα") στους 2, 8, και 15°C; <sup>7</sup>: Ha: *Hafnia alvei* στους 4 και 10°C; <sup>8</sup>: Sl: *Serratia liquefaciens* στους 4, 10°C

-: σταθερή; ↑: αύξηση; ↓: μείωση κατά τη συντήρηση; ↑↓: αυξήθηκε μέχρι τους 6.5-7.0 log<sub>10</sub>CFU/g για την OMX και μετέπειτα μειώθηκε μέχρι το τέλος της περιόδου αποθήκευσης

\*: Στατιστικά σημαντικό (p<0.05); \*\*: Στατιστικά σημαντικό (p<0.01)

(-): με εξαίρεση τη συντήρηση στη 10<sup>n</sup> ημέρα;

αρχικές τιμές pH: pH\_NC: 5.72±0.08, pH\_Ha: 5.64±0.06, pH\_Sl: 5.59±0.01, pH\_Sti., 5.58±0.02, pH\_Stii, 5.6, pH\_Stiii: 5.55±0.11

**Table S4.2: Growth parameters of microbial population measured in this study**

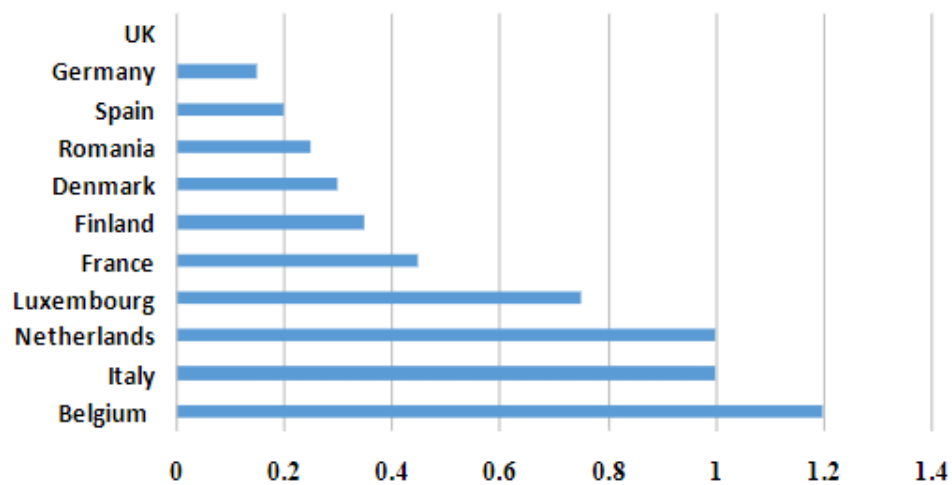
Microorganism	<sup>2</sup> T	<sup>3</sup> μ <sub>max</sub>	<sup>4</sup> lag	<sup>5</sup> y <sub>0</sub>	<sup>6</sup> y <sub>End</sub>	<sup>6</sup> RMSE	<sup>7</sup> R <sup>2</sup>	<sup>8</sup> T <sub>min</sub> (°C)
TVC <sup>1</sup>	2	0.06±0.01	3.30	3.44	9.97	0.43	0.94	
	8	0.18±0.05	3.36±0.46	3.32±0.05	8.91	0.43±0.02	0.95	-2.95
	15	0.66±0.14	10.21±0.48	3.92±0.41	9.32±0.08	0.35±0.08	0.96	
<i>H. alvei</i> B295	4	0.04±0.00	50.45±11.42	2.34±0.06	n.d.	0.36±0.13	0.98	
	10	0.12±0.03	16.331±1.35	2.43±0.14	9.48±0.8	0.27±0.06	0.99	-0.3
<i>S. liquefaciens</i> B293	4	0.05±0.00	88.56±30.91	2.62±0.11	9.84	0.36±0.03	0.99	
	10	0.10±0.00	6.54±0.00	2.30±0.08	9.57±0.08	0.46±0.05	0.98	-0.1

<sup>1</sup>NC: Naturally contaminated beef fillets; <sup>2</sup>T: tested temperature (°C), <sup>3</sup>μ<sub>max</sub>: maximum specific growth rate (h<sup>-1</sup>), <sup>4</sup>: lag time (h), <sup>5,6</sup>: y<sub>0</sub>: predicted initial and final concentration, <sup>6</sup>: RMSE: root mean square error (log<sub>10</sub>CFU/g), <sup>7</sup>R<sup>2</sup>: coefficient of determinate; <sup>8</sup>T<sub>min</sub>: cardinal temperature, n.a.d.: not available data

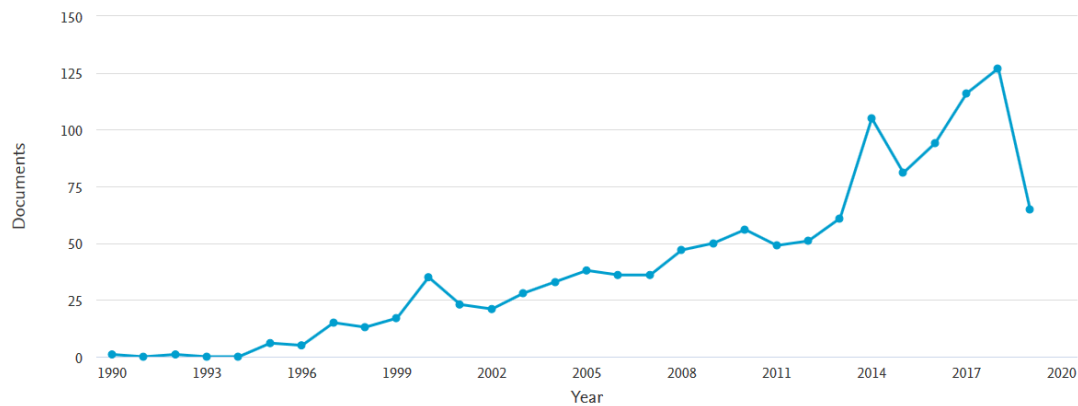
**Table S4.3:** Parameters for growth prediction of representative indicators using the polynomial equation:  
 $y=a*t^3+b*t^2+c*t+d$  (a, b, c, d: model constants)

Compound	T (°C)	a	b	c	d	R <sup>2</sup>	rmse
2-butanone	15	11.06	181.93	-28238.89	389640.70	0.95	235.77
2-pentanone	15	29.59	-979.65	18908.36	167639.50	0.98	303.12
2-heptanone	15	224942.00	-1914.58	43427.30	596836629.00	0.94	153.33
	8	1.95	-251.59	9859.54	-5176.84	0.69	145.95
2-nonanone	15	24.45	-2096.35	45769.76	-121063.25	0.91	194.02
	8	5.14	-631.13	19641.71	-42513.74	0.90	138.76
3-methyl-1-butanol	15	29.59	-979.65	18908.33	167639.90	0.98	303.12
3-methyl-1-butanol, Ha	10	3.30	-665.98	32580.47	-111292.07	0.99	304.01
2-methyl-1-butanol	15	10.58	-463.42	8722.71	66132.52	0.99	80.69
3-methyl-1-butanal	15	8.31	-745.46	21917.19	-12027.00	0.84	128.81
3-methyl-1-butanal	8	1.96	-212.52	5998.57	-8747.04	0.91	41.39
2-methyl-1-butanal	15	5407.00	-392.71	8182.79	-2141.66	0.90	32.17
2-methyl-1-butanal	8	0.15	21.45	-1370.12	20723.04	0.90	36.69
2-methyl-1-propanol	15	-0.56	81.86	-470.26	38319.89	0.78	38.79
2-pentanone,4-methyl	15	2.27	-192.61	4289.38	4471.77	0.86	24.02
undecene	15	13.64	-1159.01	25381.92	-78850.65	0.87	132.28

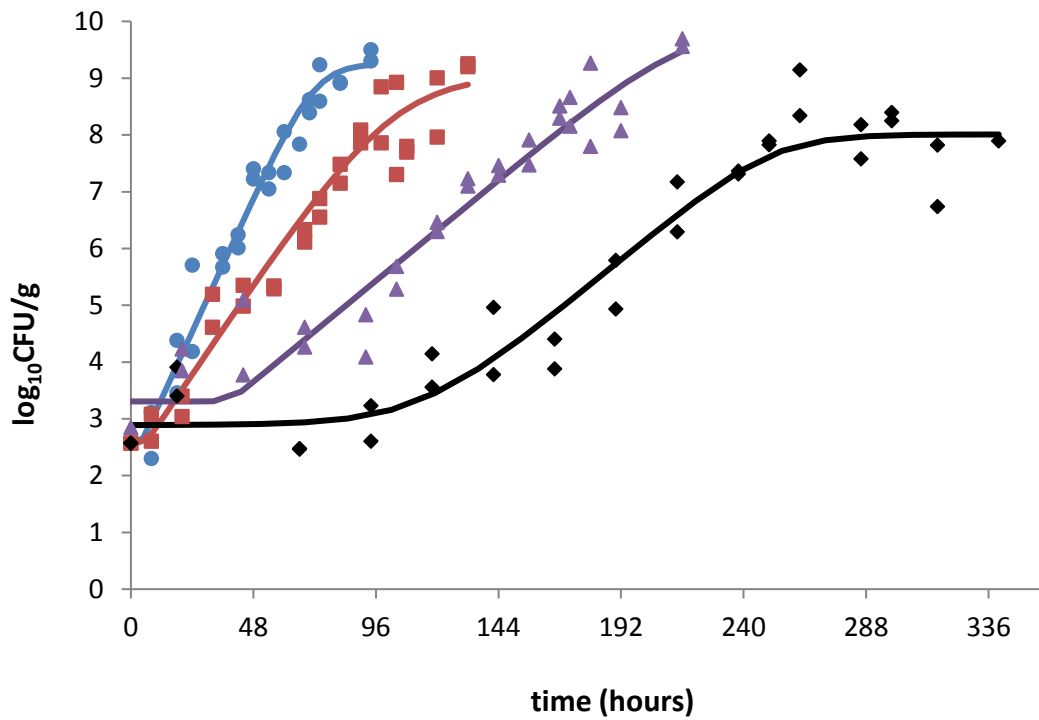
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Εικόνες (Supplementary Material – Figures)



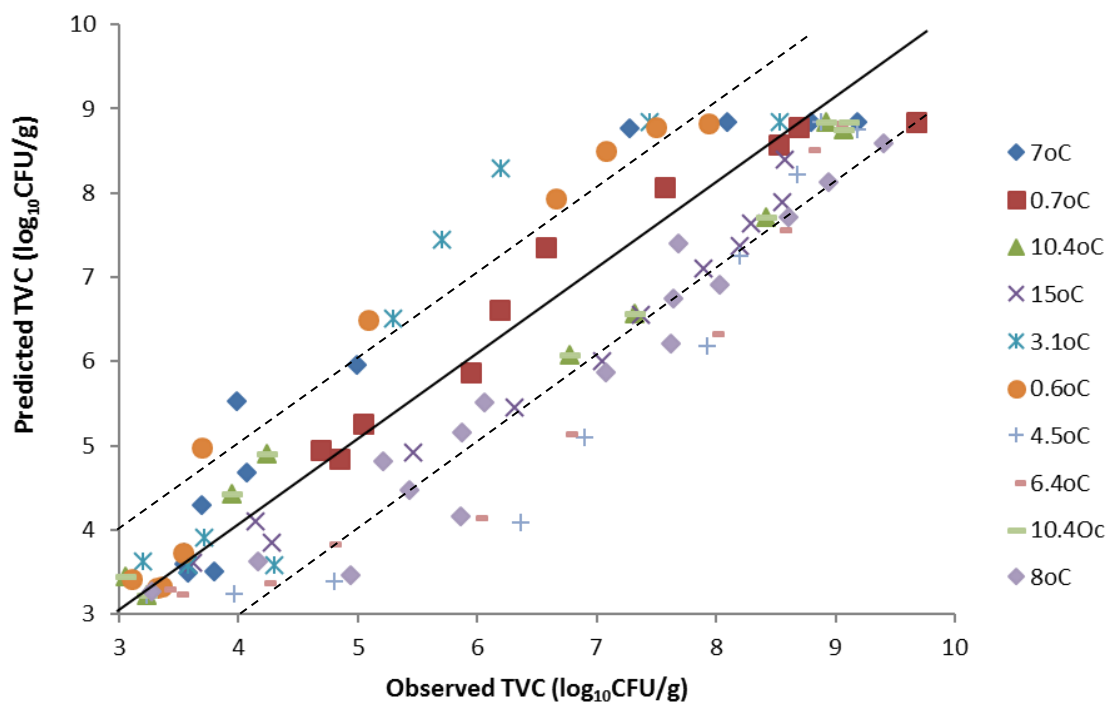
**Εικόνα S1.1:** Κατανάλωση κρέατος (kg κατά κεφαλήν/έτος) αλόγου στην Ευρώπη (Πηγή: Eurostat Database, 2014).



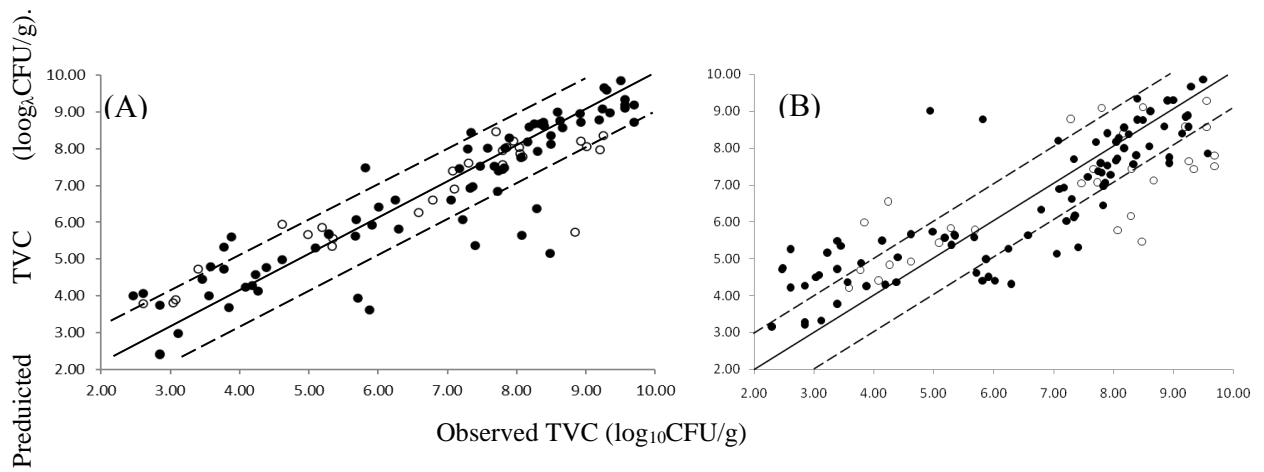
**Εικόνα S1.2:** Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την ηλεκτρονική μύτη στα τρόφιμα τα τελευταία 30 χρόνια (Πηγή: <https://www.scopus.com/>).



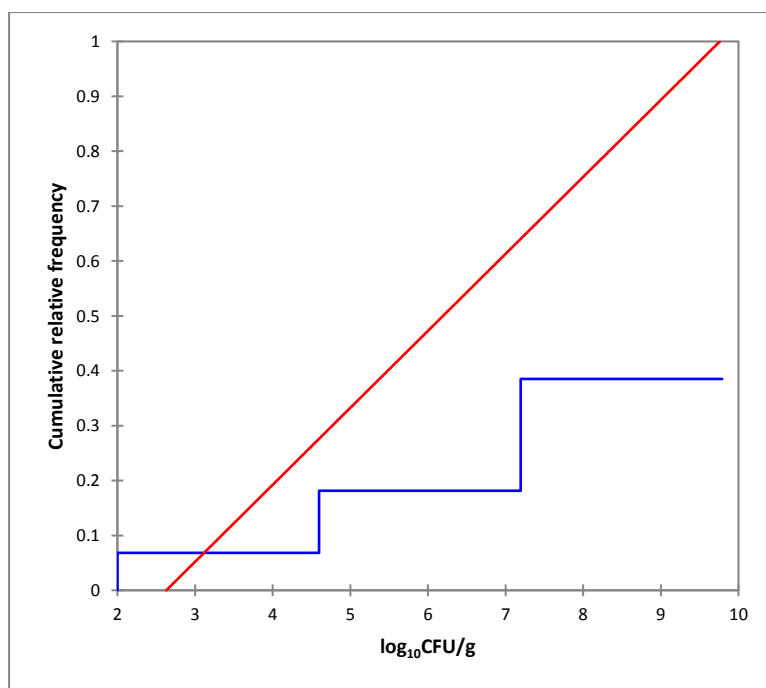
**Fig. S.3.1:** Observed and Predicted growth kinetics of TVC in aerobically stored horse fillets at 0-15°C. (circles: 15°C; boxes: 10°C; triangles: 5°C; rhombus: 0°C)



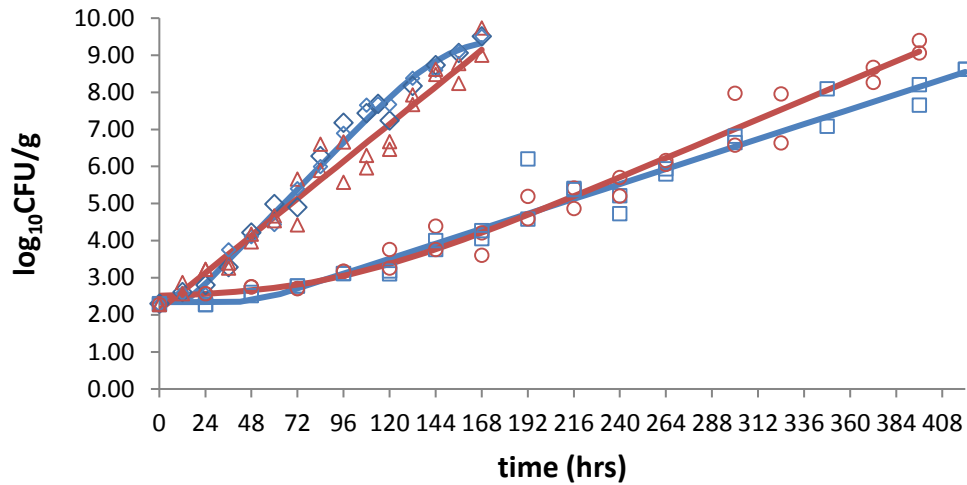
**Fig. S3.2:** Predictions of the estimated Suboptimal Ratkowsky square-root model using observed TVC values from beef (Data collected from Combase)



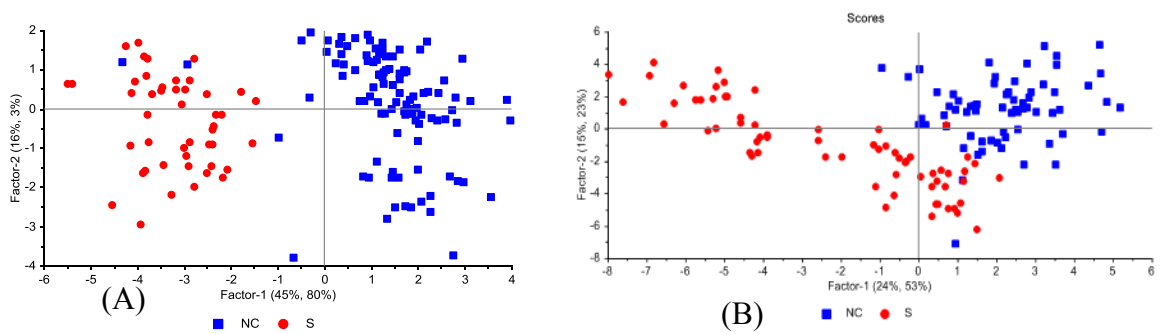
**Fig. S3.3:** Observed vs. predicted values for Total Viable Counts (TVC) during rbf-SVM regression model development, (A): training dataset: 0, 10 and 15°C (solid symbols), testing 5°C (open symbols) and (B): training dataset: 0, 5 and 15°C (solid symbols), testing 10°C (open symbols).



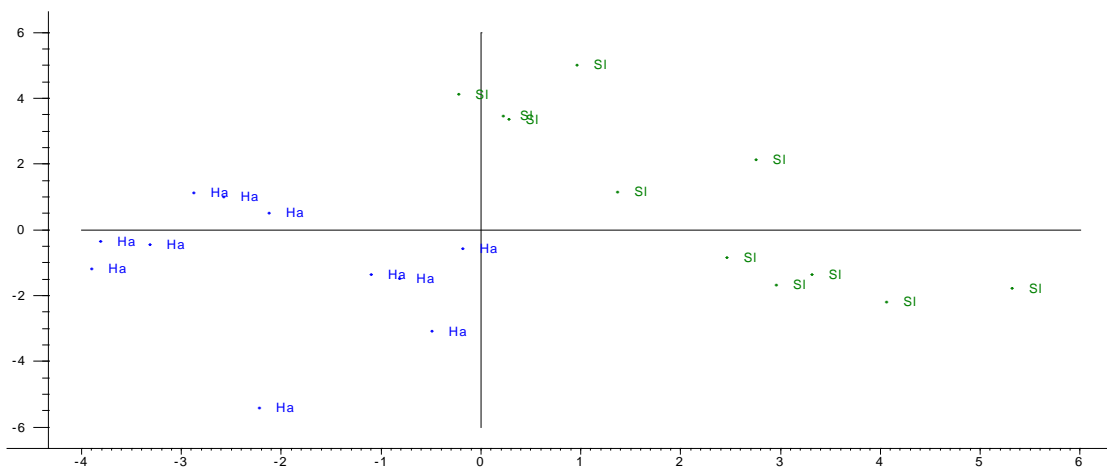
**Fig. S3.4.** Distribution fitting based on microbiological dataset range of the analyzed samples with GC/MS ( $\alpha=0.7179$ ,  $\beta=0.5924$ ,  $c=2.6294$ ,  $d=9.7601$ )



**Fig S4.1:** Observed and estimated growth curves for the two utilized strains (data points: observed, solid lines: estimated values)  $\diamond$  *H. alvei*, 10oC  $\square$  *H. alvei*, 4oC  $\triangle$  *S. liquefaciens*, 10oC  $\circ$  *S. liquefaciens*, 4oC

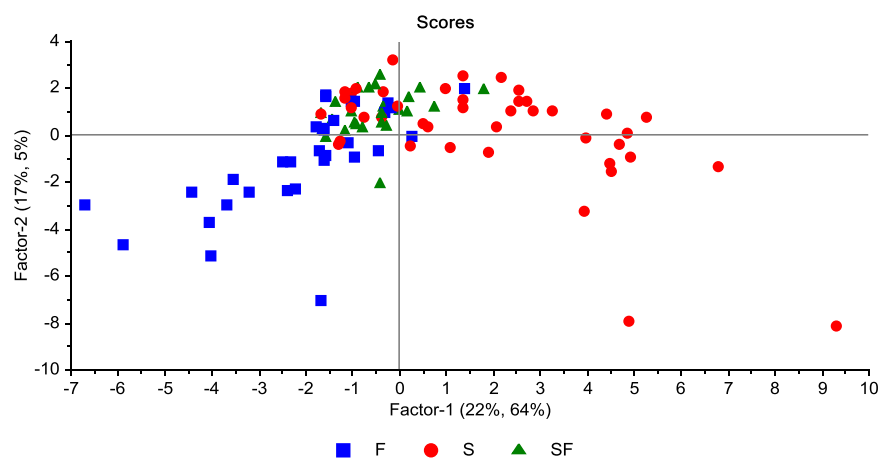


**Fig. S4.2:** Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) plot of HPLC-PDA-RI (A) and GC/MS (B) data respectively for Sterile Vs. Naturally Contaminated Beef fillets using 5 principal components (NC: Naturally contaminates, S: Sterile)



**Fig S4.3:** PLS-DA plot for *S. liquefaciens* (SI) Vs. *H. alvei* (Ha) utilizing two (2) latent variables





**Fig. S4.4.:** PLS-DA plot of the fusion training dataset (GC/MS & HPLC); Factor1 Vs Factor2;  $F \leq 5.79 \log_{10}\text{CFU/g}$ ,  $5.8 \log_{10}\text{CFU/g} < SF \leq 6.99 \log_{10}\text{CFU/g}$ , αλλοιωμένα  $S > 7.0 \log_{10}\text{CFU/g}$



Contents lists available at ScienceDirect

Meat Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meatsci](http://www.elsevier.com/locate/meatsci)

## A volatilomics approach for off-line discrimination of minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis



Dimitrios E. Pavlidis<sup>a</sup>, Athanasios Mallouchos<sup>b</sup>, Danilo Ercolini<sup>c</sup>, Efstathios Z. Panagou<sup>a</sup>, George-John E. Nychas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

<sup>b</sup>Laboratory of Food Chemistry and Analysis, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

<sup>c</sup>Division of Microbiology, Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, Portici, Italy

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Machine learning  
Discrimination  
Beef  
Pork  
GC-MS  
Metabolomics  
Microbial quality

### ABSTRACT

Beef, pork and mixed (70% beef and 30% pork) minced meat samples were obtained from a meat processing plant in Athens during a two-year survey and analyzed both microbiologically and by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS). A validated method for the discrimination of minced meat was developed based on the volatile fingerprints. Unsupervised (PCA) and supervised (PLS-DA) multivariate statistical methods were applied to visualize, group and classify the samples. The data-set was divided 70% for model calibration and 30% for model prediction. During model calibration 99, 100 and 100% of the samples were correctly classified as beef, pork and mixed meat samples, respectively, while for model prediction the respective percentages were 100, 100 and 95% respectively. In both datasets, the overall correct classification rate amounted to 99% on average. Among the volatile compounds identified, heptanal, octanal, butanol, pentanol, hexanol, octanol, 1-penten-3-ol, 2-octen-1-ol, 3-hydroxy-2-butanone, 2-butanone and 2-heptanone were positively correlated with beef samples. Furthermore, pentanal, hexanal, decanal, nonanal, benzaldehyde, trans-2-hexenal, trans-2-heptenal, trans-2-octenal and 1-octen-3-one were positively correlated with pork. Lastly, the alcohols, 2-butanol and 1-octen-3-ol showed positive correlation with mixed samples. The results indicated that the volatilomics approach employed in this study could be used as an alternative method for robust and reliable discrimination and classification of meat samples in an off-line mode.



## Microbiological assessment of aerobically stored horse fillets through predictive microbiology and metabolomic approach



Dimitrios E. Pavlidis<sup>a</sup>, Athanasios Mallouchos<sup>b</sup>, George John Nychas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Greece

<sup>b</sup> Laboratory of Food Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, School of Food and Nutritional Sciences, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Horsemeat spoilage  
Microbial association  
Metabolomics  
Shelf-life  
Predictive microbiology  
Machine learning

### ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the microbial association of horse fillets during aerobic storage at isothermal conditions (0–15 °C). Samples were analyzed microbiologically, and in parallel the metabolic profile of the samples was quantified by HS-SPME/GC-MS and HPLC-PDA-RI. Considering HPLC results, the concentration of propionic, formic, lactic and succinic acids decreased during aerobic storage of horse fillets, contrary to acetic, citric, butyric and isobutyric acids, which increased. As far as the volatile formation during aerobic storage is concerned, pentanal, hexanal, octanal, nonanal, decanal, were correlated with fresh samples, while diacetyl, acetoin, 2-heptanone, 2-octanone, hexanoic acid, 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol and 3-methyl-butanol detected in spoiled ones. Herein, a support vector machine regression model using data from 0, 5 and 15 °C predicted the responses of the dataset at 10 °C with a correlation coefficient 0.915 and 0.910 for training and testing, respectively.

## Συνέδρια

1. Pavlidis, D.E., Panagou, E.Z. and Nychas, G.-J. (2019) Shelf Life Estimation of Horse Fillets during Aerobic Storage, IAFP 15th European Symposium on Food Safety, Nantes, France
2. Pavlidis, D.E., Mauroudis, E.Z. and Nychas, G.-J. (2019) Spoilage Potential of *Hafnia Alvei* B295 and *Serratia Liquefaciens* B293 in Sterile Beef Meat, IAFP 15th European Symposium on Food Safety, Nantes, France
3. Pavlidis, D.E., Panagou, E. Z. and Nychas G.-J.. (2017) Rapid detection of microbial condition of raw minced beef through Electronic nose with multivariate analysis and validation with independent datasets. 10th International Conference of Predictive Modelling in Food (ICPMF10) – Córdoba. Oral presentation
4. Pavlidis, D.E., Haroutounian, S., Panagou, E.Z. and Nychas, G.-J. (2017) Volatilomics-Approach through GC/MS and e-Nose for the Detection of Minced Beef Adulteration with Horse Meat. IAFP 13th European Symposium on Food Safety, Brussels, Belgium
5. Pavlidis, D.E., Tsakanikas, P., Mallouchos, A., Haroutounian, S., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J. (2017) Microbial Metabolome Evolution in Aerobically Stored Naturally Contaminated Beef Fillets. IAFP 13th European Symposium on Food Safety, Brussels, Belgium
6. Pavlidis, D.E., Haroutounian, S., Panagou, E.Z. and Nychas, G.-J. (2017) Microbial metabolome evolution in aerobically stored naturally contaminated beef fillets, Πανελλήνιο Συνέδριο Το Κρέας και τα Προϊόντα του, Θεσσαλον, 3-5 Φεβρουαρίου 2017, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα. Προφορική Παρουσίαση

7. Pavlidis, D.E., Chondodimou, O.1, Ropodi A.1, Panagou E.Z.1, Nychas G.J. (2017) *The microbiological condition of minced meat end-products from an Athenian meat processing plant*, 7<sup>th</sup> National MicroBioKosmos (MBK) Conference, Athens, Greece
8. Pavlidis, D.E., Malouchos, A., Panagou, E. Z. and Nychas, G.-J.E. (2016) *Microbial Quality of mixed pork/beef minced meat using HS-SPME GC/MS in tandem with bioinformatics*. The Food Factor I, Barcelona Conference, Barcelona, Spain
9. Pavlidis, D.E., Malouchos, A., Panagou, E. Z. and Nychas, G.-J.E. (2016) *Microbiological Quality Management using e-nose and data analysis*. The Food Factor I Barcelona Conference, Barcelona, Spain
10. Pavlidis, D.E., Tsakanikas, P., Panagou, E.Z. and Nychas, G.-J. (2016) *GC/MS fingerprint for discrimination of beef and pork minced meat and identification of adulteration*. 1st International Conference, First Food Chemistry Conference - Shaping the Future of Food Quality, Health and Safety, Amsterdam, Holland
11. Pavlidis, D.E., Panagou, E.Z. and Nychas, G.-J. (2016) *Potential of Electronic nose in tandem with artificial neural networks to determine microbial spoilage*, 26<sup>th</sup> International ICFMH Conference - FoodMicro 2016, Cardiff, Wales
12. Pavlidis, D.E., Panagou, E., Mallouchos, A., Haroutounian, S. and Nychas, G.-J. (2016) *Integrated Quality Management (IQM) in Meat Plant Through HS-SPME GC/MS*, IAFP 12<sup>th</sup> European Symposium on Food Safety, Athens-Greece
13. Pavlidis, D.E., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J. E. (2015) *Monitoring the volatilome of minced beef during storage using Headspace Solid Phase Microextraction (HS/SPME) GC/MS*, 29<sup>th</sup> European Federation of Food Science and Technology (EFFoST) International Conference, Athens-Greece,
14. Pavlidis, D.E., Panagou, E. Z. and Nychas, G.-J.E. (2014) *Trace back on minced meat's history using metabolomics*, 24<sup>th</sup> International ICFMH Conference FoodMicro 2014, Nantes, France