



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

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εκτίμηση της αλλοίωσης μαριναρισμένων προϊόντων από μπούτι κοτόπουλο
με σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης

Μαρία Σ. Χουλιούμη

Επιβλέπων καθηγητής:

Νυχάς Γεώργιος Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2021

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εκτίμηση της αλλοίωσης μαριναρισμένων προϊόντων από μπούτι κοτόπουλο
με σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης

Assessment of the alteration of chicken products with modern methods of
analysis

Μαρία Σ. Χουλιούμη

Εξεταστική επιτροπή:

Νυχάς Γεώργιος Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Πανάγου Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Κουτσουμανής Κωνσταντίνος, Καθηγητής ΑΠΘ

Εκτίμηση της αλλοίωσης μαριναρισμένων προϊόντων από μπούτι κοτόπουλο με σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης

*ΠΜΣ Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κατανάλωση και η σπατάλη του κρέατος τη τελευταία δεκαετία εμφανίζουν ραγδαία αύξηση, καθώς υπάρχει η ανάγκη για υψηλής ποιότητας κρέας όσο αυξάνεται και ο πληθυσμός. Η ζήτηση των προϊόντων από κρέας κοτόπουλου ολοένα και αυξάνεται εξαιτίας της υψηλής θρεπτικής τους αξίας και του χαμηλού κόστους τους. Ωστόσο, τα νωπά προϊόντα κοτόπουλου είναι από τη φύση τους ευαλλοίωτα (μικρό self-life) αναπτύσσοντας ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά την αλλοίωσή τους. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών ταχέων μεθόδων για την εκτίμηση της αλλοίωσης και της διάρκειας ζωής των νωπών προϊόντων κοτόπουλου. Δύο από τις μη επεμβατικές, ταχείες μεθόδους που χρησιμοποιούνται στο τομέα των τροφίμων είναι η πολυφασματική απεικόνιση και οι βιομιμητικοί σένσορες (ηλεκτρονική μύτη και ηλεκτρονική γλώσσα). Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων από πειράματα αλλοίωσης σε σουβλάκι από μαριναρισμένο μπούτι κοτόπουλου, με τα δεδομένα που προέκυψαν από τη πολυφασματική απεικόνιση και από την εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης (e-nose). Βάσει των δεδομένων αυτών κατασκευάστηκαν και αξιολογήθηκαν ποσοτικά και ποιοτικά μοντέλα εκμάθησης για την εκτίμηση του βαθμού αλλοίωσης του κρέατος από μαριναρισμένο μπούτι κοτόπουλου. Παράλληλα, από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης τη μικροχλωρίδας του μαριναρισμένου μπουτιού κοτόπουλου και μελετήθηκε η επίδραση που είχε η θερμοκρασία στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Έτσι διεξήχθησαν τρία ανεξάρτητα πειράματα συντήρησης των μαριναρισμένων προϊόντων από μπούτι κοτόπουλου υπο αερόβιες συνθήκες ατμόσφαιρας και διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας. Πιο αναλυτικά, στα δύο πειράματα το κοτόπουλο συντηρήθηκε σε ισόθερμες συνθήκες (0, 5, 10 °C) ενώ στο τρίτο πείραμα συντηρήθηκαν σε ένα δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ (12 ώρες στους 0 °C, 8 ώρες στους 5 °C και 4 ώρες στους 10 °C) για συνολικό διάστημα 13^{ων} ημερών. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (6- 24 ώρες) σε δύο δείγματα για κάθε ισοθερμοκρασιακό προφίλ και σε τρία για το δυναμικό, στα οποία διεξάγονταν μικροβιολογικές αναλύσεις και εφαρμοζόταν οι μέθοδοι της πολυφασματικής ανάλυσης και της e-nose.

Για την ανάπτυξη των μοντέλων εκμάθησης (βάσει των αποτελεσμάτων της πολυφασματικής απεικόνισης), τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εκπαίδευσης ήταν τα μικροβιολογικά και τα πολυφασματικά των 0, 5, και 10 °C, ενώ τα δεδομένα για τον έλεγχο της πρόβλεψης των μοντέλων ήταν αυτά του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ. Μετά από το μετασχηματισμό των δεδομένων με το μετασχηματισμό κανονικής τυπικής μεταβλητής (SNV), αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή μοντέλων εκτίμησης της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) στο κοτόπουλο, βάσει του αλγορίθμου της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squared- Regression, PLS-R). Ως ανεξάρτητες

μεταβλητές ορίστηκαν τα δεδομένα τη πολυφασματικής απεικόνισης (n=36) και ως εξαρτημένη ο πληθυσμός της OMX, των *Pseudomonas* spp. και των LAB για κάθε μοντέλο. Για τη ποιοτική εκτίμηση της αλλοίωσης του μπουτιού κοτόπουλου εφαρμόστηκε η διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squared-Discriminant Analysis, PLS-DA). Ορίστηκαν δύο κλάσεις αλλοίωσης βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας ως εξής: φρέσκο (κλάση 1) με OMX μικρότερη από 7 log CFU/g και αλλοιωμένο (κλάση 2) με OMX μεγαλύτερη από 7 log CFU/g. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές ήταν πάλι τα πολυφασματικά δεδομένα (n=36) και οι εξαρτημένες ήταν οι δύο κλάσεις. Η παραπάνω διαδικασία έγινε και για την ανάπτυξη των μοντέλων εκμάθησης με τη χρήση των δεδομένων που αποκτήθηκαν από την e-nose, αλλά με κάποιες διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, για τα δεδομένα της e-nose τα δεδομένα εκπαίδευσης ήταν τα μικροβιολογικά και οι αποκρίσεις των αισθητήρων της στους 0, 5, και 10 °C, για τη PLS-R και τη PLS-DA ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν οι αποκρίσεις των αισθητήρων της e-nose (n=12), ενώ για τη PLS-R εξαρτημένη μεταβλητή ήταν ο πληθυσμός της OMX και των *Pseudomonas* spp.

Τα μοντέλα ποσοτικής εκτίμησης PLS-R από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης εμφάνισαν πολύ καλή επίδοση, αφού η πρόβλεψή τους για τη OMX παρουσίασε τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Squared Error, RMSE_p) ίση με 0.779 log CFU/g και συντελεστή παλινδρόμησης (correlation coefficients, r_p) ίσο με 0.878. Για τα *Pseudomonas* spp. οι τιμές RMSE_p και r_p εμφάνισαν 0.981 log CFU/g και 0.857 αντίστοιχα, ενώ για τα LAB η τιμή RMSE_p ήταν ίση με 0.832 log CFU/g και η τιμή r_p ίση με 0.791. Από τους συντελεστές παλινδρόμησης Β φάνηκε ότι τα μήκη κύματος που επηρεάζουν την επίδοση των μοντέλων ήταν αυτά που σχετίζονται με τη μυογλοβίνη και τα παραπροϊόντα οξειδωσής της. Τα μοντέλα πρόβλεψης της OMX και των *Pseudomonas* spp., για τα δεδομένα της e-nose, εμφάνισαν για τη πρόβλεψη RMSE_p ίσο με 3.626 και 2.105 log CFU/g αντίστοιχα, και συντελεστή συσχέτισης r_p ίσο με -0.196 και 0.118 αντίστοιχα.

Τα μοντέλα ποιοτικού προσδιορισμού PLS-DA από τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από την e-nose ταξινόμησαν σε λιγότερο ικανοποιητικό βαθμό τα δείγματα στις δύο κλάσεις (φρέσκα, αλλοιωμένα) με συνολική ακρίβεια πρόβλεψης του μοντέλου ίση με 42.42 %, σε σχέση με τα μοντέλα PLS-DA που κατασκευάστηκαν με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, τα οποία έδειξαν συνολική ακρίβεια πρόβλεψης ίση με 90.91 %.

Συνοψίζοντας, φάνηκε ότι η θερμοκρασία έπαιξε σημαντικό ρόλο στο ρυθμό αλλοίωσης των δειγμάτων μαριναρισμένου μπουτιού κοτόπουλου κατά την αερόβια συντήρησή τους και ότι ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός στη μικροχλωρίδα των δειγμάτων ήταν τα *Pseudomonas* spp. Τα γραμμικά ποσοτικά μοντέλα προσδιορισμού (της OMX, των *Pseudomonas* spp. και των LAB) βάσει των πολυφασματικών δεδομένων, προέβλεψαν ικανοποιητικά το μικροβιακό πληθυσμό, ενώ τα αντίστοιχα μοντέλα πρόβλεψης από τα δεδομένα της e-nose απέτυχαν να προβλέψουν το πληθυσμό της OMX και των *Pseudomonas* spp. Παράλληλα, τα μοντέλα ποιοτικής εκτίμησης της αλλοίωσης του μαριναρισμένου κοτόπουλου, που κατασκευάστηκαν με τη χρήση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης, πέτυχαν καλύτερη ταξινόμηση των δειγμάτων στις δύο κλάσεις, συγκριτικά με τα ποιοτικά μοντέλα βάσει της e-nose.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: μαριναρισμένο μπούτι κοτόπουλο, αλλοίωση, πολυφασματική απεικόνιση, ηλεκτρονική μύτη, γραμμικά μοντέλα μηχανικής εκμάθησης.

Assessment of the alteration of chicken products with modern methods of analysis

*MSc Food Quality & Safety Management Systems
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Microbiology & Food Biotechnology*

ABSTRACT

Meat consumption and food loss and waste in the last decade have been rapidly increase, as the need for high quality meat rises. The demand for chicken products has been increasing due to their high nutritional value and low cost. However, fresh chicken products are by nature vulnerable (small self-life), producing undesirable organoleptic characteristics during their deterioration. For this purpose, rapid alternative methods have been investigated for the assessment of spoilage and the determination of shelf-life on raw chicken products. Two promising, non-invasive and rapid methods applied in the food sector are Multispectral imaging (MSI) and biomimetic sensors (electronic nose and electronic tongue). The main objective of the present study was to correlate the microbiological results from storage experiments with marinated chicken souvlaki to the obtained MSI and e-nose data. Quantitative and qualitative predictive models were developed and evaluated for their efficacy to assess microbial spoilage of marinated chicken leg meat. In parallel, the kinetic parameters of microflora's growth on marinated chicken souvlaki were determined, while the effect of the temperature on the specific growth rate of the microorganisms was investigated.

In this context, three independent storage experiments were performed on marinated chicken souvlaki products under aerobic conditions and different temperature conditions. More specifically, two independent storage experiments were undertaken in marinated chicken souvlaki at three isothermal conditions (0, 5, 10 °C). An independent storage experiment was performed at a dynamic temperature profile (12 hours at 0 °C, 8 hours at 5 °C and 4 hours at 10 °C) up to 13 days. At pre-determined intervals, duplicate of samples stored at isothermal conditions and triplicate of samples stored at the dynamic temperature profile were analyzed microbiologically while in parallel MSI and e-nose analyses were implemented.

For the development of the predictive models (based on the results of multispectral imaging), the data defined as training samples were the microbiological results and the respective spectral data from 0, 5, and 10 °C. For model evaluation, results from the dynamic temperature profile experiment were utilized. Standard Normal Variate transformation (SNV) was applied to spectral and volatile data and afterwards Partial Least Squares- Regression (PLS-R) models were developed for the estimation of Total Viable Counts (TVC), *Pseudomonas* spp. and Lactic acid bacteria (LAB) in marinated chicken souvlaki. Multispectral imaging data were defined as independent variables (n = 36) and as dependent were the population of TVC, *Pseudomonas* spp. and LAB for each model. Partial Least Squares- discriminant analysis (PLS-DA) was performed for the assessment of quality at marinated chicken souvlaki. Two quality classes were defined, based on the existing literature as follows: fresh (class 1) with TVC less than 7 logCFU/g and spoiled (class 2) with TVC greater than 7 logCFU/g. For e-nose data, the training samples were the microbiological ones and the corresponding signal responses (n = 12) per sensor at 0, 5, and 10 °C, for PLS-R and PLS-DA

PLS-R models predicted TVC via MSI analysis showed acceptable performance, as RMSEp and r_p values were calculated at 0.779 log CFU/g and 0.878 respectively. For *Pseudomonas*

spp. model, RMSEp was estimated 0.981 log CFU/g and r_p was 0.857, while RMSEp and r_p for LAB model demonstrated values of 0.832 log CFU/g and 0.791. The regression coefficients B illustrated that the wavelengths influencing models' performance were the ones associated with myoglobin and its oxidation by-products. On the contrary, TVC and *Pseudomonas* spp. prediction using e-nose data showed an RMSEp value equal to 3.626 log CFU/g and 2.105 log CFU/g respectively, whereas correlation coefficient r_p was calculated at -0.196 and 0.118 respectively. PLS-DA model via e-nose analysis, classified accurately samples in the two classes (fresh or spoiled) with an overall accuracy during prediction - being 42.42%, compared to PLS-DA from MSI analysis, which showed an overall prediction accuracy of 90.91%.

In conclusion, temperature had a great impact on marinated chicken souvlaki spoilage during aerobic storage, and especially on *Pseudomonas* spp. counts which were the predominant spoilage microorganism. PLS-R models based on the multispectral data, predicted the microbial populations satisfactorily, while the corresponding predictive models from e-nose measurements failed to predict accurately TVC and *Pseudomonas* spp. population. In contrast, PLS-DA models via MSI data achieved more accurate classification of samples in the correct class compared to PLS-DA model using e-nose signal response.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: marinated chicken leg, spoilage, multispectral imaging (MSI), electronic nose, linear machine learning models.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπο την επίβλεψη του καθηγητή κυρίου Γεωργίου Ιωάννη Νυχά, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, την εμπιστοσύνη και τη καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω και το καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου για τη καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, με τη πολύτιμη προσφορά των γνώσεων και συμβουλών του κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλουν να δοθούν και στον καθηγητή κ. Κωσταντίνου Κουτσομανή για το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη της εργασίας και τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην υποψήφια Διδάκτορα Ευγενία Σπυρέλλη, για την εξαιρετική συνεργασία, την υπομονή, τη στήριξη, τις συμβουλές, τις γνώσεις και τη πολύτιμη καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και την υποψήφια Διδάκτορα Ειρήνη Σχοινά, της οποίας οι γνώσεις, το ενδιαφέρον και οι συμβουλές έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εκπόνηση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ, επίσης όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, τους υποψήφιους Διδάκτορες, μεταπτυχιακούς φοιτητές και επιστημονικούς συνεργάτες, για την άψογη συνεργασία και το ζεστό και φιλικό κλίμα που υπήρχε τη περίοδο εργασίας στο εργαστήριο.

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

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ.....	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	6
ΓΛΩΣΣΆΡΙΟ ΟΡΟΛΟΓΪΑΣ.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ.....	10
1.2 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....	12
1.3 ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ.....	13
1.3.1 Μικροβιακή Αλλοίωση κρέατος κοτόπουλου.....	14
1.3.1.1 <i>Pseudomonas</i> spp.	15
1.3.1.2 <i>Enterobacteriaceae</i>	17
1.3.1.3 Γαλακτικά βακτήρια- LAB.....	18
1.3.1.4 Ενδείξεις μικροβιακής αλλοίωσης.....	20
1.3.2 Χημική αλλοίωση.....	21
1.3.2.1 Μεταβολισμός αλλοιογόνων μικροοργανισμών υπό αερόβιες συνθήκες.....	22
1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ.....	23
1.4.1 Θερμοκρασία.....	24
1.4.2 Μαρινάδα.....	27
1.5 ΣΥΓΧΡΟΝΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΤΟ ΚΡΕΑΣ.....	28
1.5.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (<i>MultiSpectral Image Analysis, MSI</i>).....	30
1.5.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά <i>Fourier</i> (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR</i>).....	31
1.5.3 Ηλεκτρονική μύτη (<i>e-nose</i>).....	32
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	34

2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	34
2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	36
2.2.1 Μικροβιολογική ανάλυση.....	37
2.2.2 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (<i>MultiSpectral Imaging, MSI</i>).....	38
2.2.3 Εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης	40
2.2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων	40
2.2.3.2 Ηλεκτρονική μύτη ALPHA MOS.....	40
2.2.3.3 Συλλογή δεδομένων με την ανάλυση ηλεκτρονικής μύτης	41
2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	42
2.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης- Πρωτογενή μοντέλα	42
2.3.2 Επίδραση θερμοκρασίας στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης- Δευτερογενή μοντέλα	43
2.3.3 Γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (<i>Partial Least Squares - Regression, PLS-R</i>).....	43
2.3.4 Διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (<i>Partial Least Square: Discriminant Analysis, PLS:DA</i>).....	46
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΑΣΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ	48
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ	53
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ.....	56
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	58
3.4.1 Αποτελέσματα δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης.....	58
3.4.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (<i>Partial Least Square-Regression, PLS-R</i>) από την εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης.....	59
3.4.3 Αποτελέσματα δεδομένων της e-nose	64
3.4.4 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (<i>Partial Least Square-Regression, PLS-R</i>) από την εφαρμογή e-nose.....	66
.....	68

3.4.5 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (PLS-DA), από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης.....	69
3.4.6 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (PLS-DA), από την εφαρμογή της e-nose.....	71
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

Γλωσσάριο Ορολογίας

MAP: Modified Atmosphere Package, συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρα

LAB: Lactic Acid Bacteria, γαλακτικά βακτήρια

MSI: MultiSpectral Image analysis

ROI: Region of Interest, περιοχή ενδιαφέροντος

R: Reflectance, ανάκλαση σε nm

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

yend: φυσικός λογάριθμος του μέγιστου πληθυσμού σε $\ln CFU/gr$

y_0 : φυσικός λογάριθμος του αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού σε $\ln CFU/gr$

h_0 : έργο που καταναλώνεται κατά τη προσαρμογή των μικροοργανισμών στο περιβάλλον

μ_{max} = ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

b = συντελεστής συσχέτισης-παλινδρόμησης

T_{min} = ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης σε $^{\circ}C$

LVs: Latent Variables, κύριες συνιστώσες

SNV: Standard Normal Variables

r: correlation coefficient, συντελεστής συσχέτισης

RMSE: Root Mean Square Error, αποκλίσεις μέσης τετραγωνικής ρίζας σε $\log CFU/g$

R^2 : τετραγωνικός συντελεστής παλινδρόμησης

SD: Standard Deviation, τυπική απόκλιση

Bf: Bias Factor, συντελεστής μεροληψίας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σύσταση κρέατος κοτόπουλου

Το κρέας ορίζεται από τον Codex Alimentarius ως «Όλα τα μέρη ενός θηλαστικού που προορίζονται ή έχουν κριθεί ως ασφαλή και κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση». Σε αυτά περιλαμβάνεται ο μυϊκός ιστός και άλλοι σημαντικοί ιστοί, οι οποίοι καταναλώνονται έπειτα από επεξεργασία, όπως το λίπος, και τα ζωτικά όργανα όπως η γλώσσα, η καρδιά, το συκώτι, τα νεφρά, οι πνεύμονες, τα έντερα κ.α. Το κρέας αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες και αμινοξέα, μέταλλα, λίπη και λιπαρά οξέα, βιταμίνες και άλλα βιοδραστικά συστατικά, και πολύ μικρές ποσότητες υδατανθράκων. Από διατροφική άποψη, το κρέας έχει πολλή μεγάλη σημασία, καθώς διαθέτει υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνη, περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και έχει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα σε μέταλλα και βιταμίνες. Παράλληλα, το κρέας είναι πλούσιο σε βιταμίνη B12 και B6 και σίδηρο τα οποία δεν είναι άμεσα διαθέσιμα σε χορτοφαγικές δίαιτες. (FAO, 2021, Heinz & Hautzinger, 2007). Στο Πίνακα 1 και 2 παρουσιάζονται τα θρεπτικά συστατικά για τη περίπτωση του μυϊκού ιστού από μπούτι κοτόπουλο, από το οποίο έχει αφαιρεθεί το δέρμα. Η περιεκτικότητα σε λίπος είναι πολύ μικρή (<5%), η πρωτεΐνη ανέρχεται στα 20%, ενώ το νερό είναι περίπου 80%.

Πίνακας 1: Χημική σύσταση του νεπού μυϊκού ιστού από μπούτι κοτόπουλο χωρίς δέρμα.

Θρεπτικά	Εκτίμηση στα 100g	Μονάδες
Νερό	76.36	g
Ενέργεια	120.45	kcal
Πρωτεΐνη	19.20	g
Λίπη	4.22	g
Υδατάνθρακες	0.00	g
Ιχνοστοιχεία		
Ασβέστιο	10.00	mg
Σίδηρος	0.78	mg
Μαγνήσιο	22.95	mg
Φώσφορος	179.55	mg
Κάλιο	237.50	mg
Νάτριο	96.02	mg

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα του νεπού μυϊκού ιστού από μπούτι κοτόπουλο σε βιταμίνες, αμινοξέα και λιπαρά οξέα (USDA, 2021)

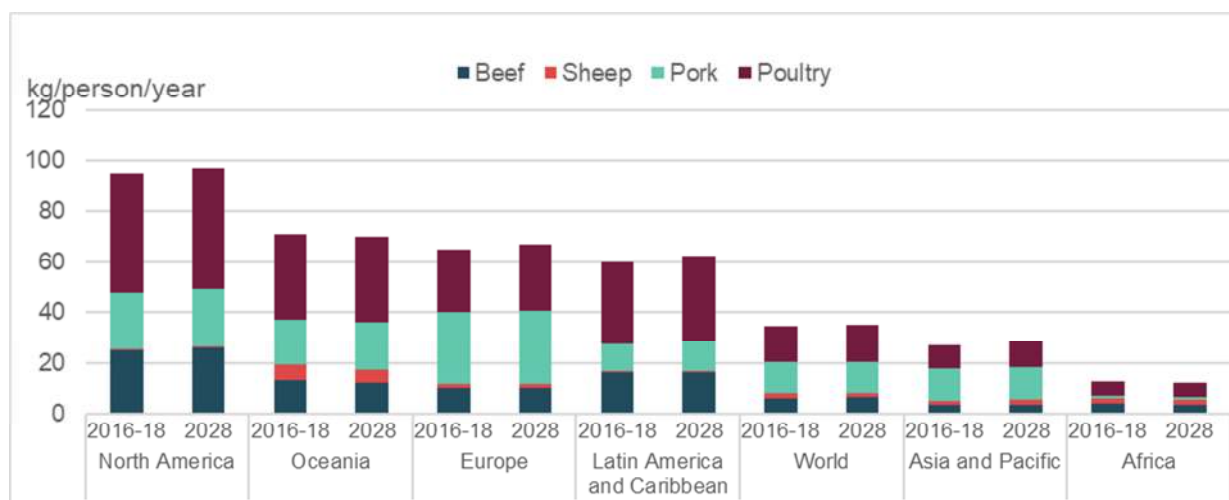
Βιταμίνες	Εκτίμηση σε g ανά 100g	Αμινοξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100g
Θειαμίνη	0.088	Τρυπτοφάνη	0.217
Ριβοφλαβίνη	0.180	Θρεονίνη	0.895
Νιασίνη	5.580	Ισολευκίνη	0.926
Βιταμίνη Β6	0.406	Λευκίνη	1.614
Φολικά άλατα (σύνολο)	0.004	Λυσίνη	1.784
Χολίνη	48.636	Μεθειονίνη	0.545
Βιταμίνη Β12	0.001	Κυστίνη	0.226
Βιταμίνη Α	0.010	Φαινυλαλανίνη	0.765
Βιταμίνη Ε (αλφα-τοκοφερόλη)	0.180	Τυροσίνη	0.711
Λιπαρά οξέα		Βαλίνη	0.933
Λαυρικό	0.005	Αργινίνη	1.318
Μυριστικό	0.020	Ιστιδίνη	0.574
Παλμιτικό	0.757	Αλανίνη	1.135
Παλμιτολεϊκό (cis)	0.178	Ασπαρτικό οξύ	1.864
Στεατικό	0.250	Γλουταμινικό οξύ	3.102
Ελαϊκό	1.022	Γλυκίνη	0.886
Ελαϊδικό	1.205	Προλίνη	0.774
Λινελαϊκό	0.753	Σερίνη	0.785
Λινολενικό (α, γ)	0.067		
Αραχιδικό	0.002		
Αραχιδονικό	0.098		
Εικοσαπενταενοϊκό	0.005		
Εικοσιπενταενοϊκό	0.011		
Εικοσιδιεξαενοϊκό	0.013		
Χοληστερόλη	0.091		

Η μετατροπή των ζώων σε κρέας, περιλαμβάνει διάφορες διεργασίες όπως είναι ο χειρισμός και η φόρτωσή τους στη φάρμα, η μεταφορά τους σε σφαγεία, η εκφόρτωση και η εκμετάλλευσή τους και η σφαγή. Οι κακές λειτουργικές τεχνικές και εγκαταστάσεις σε οποιαδήποτε από τις παραπάνω διεργασίες, οδηγούν σε τραυματισμούς των ζώων που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση και τη μείωση της ποιότητας του κρέατος (Chambers & Grandin, 2001). Μετά από μερικές ώρες από τη σφαγή των ζώων, οι μύες γίνονται άκαμπτοι, μια κατάσταση γνωστή ως νεκρική ακαμψία. Λόγω της παύσης της αιματικής κυκλοφορίας και της απομάκρυνσης του αίματος (αφαίμαξη), η παροχή του οξυγόνου στου μύες μειώνεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του μηχανισμού της αναπνευστικής αλυσίδας (σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (δέσμευση της ενέργειας που παράγεται κατά την αερόβια γλυκόλυση), γεγονός που οδηγεί στην αδυναμία ανασύνθεσης του ATP από τους μηχανισμούς αυτούς και στη διέγερση της

αναερόβιας γλυκόλυσης. Κατά την αναερόβια γλυκόλυση, η γλυκόζη που παράγεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου, μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Λόγω της κατάρρευσης του αιμοποιητικού συστήματος, το παραγόμενο γαλακτικό οξύ δεν μπορεί να απομακρυνθεί, γεγονός που οδηγεί στην πτώση του pH και την οξίνιση του μύος. Η διαδικασία της νεκρικής ακαμψίας εξαρτάται από το στρές που προκαλείται στα ζώα κατά τη διαδικασία της σφαγής, πράγμα που έχει αρνητικές συνέπειες στη ποιότητα του νωπού κρέατος (Miller 2002). Ως εκ τούτου, είναι αναγκαίος ο σωστός χειρισμός και η πρόληψη της μόλυνσης μετά τη σφαγή και κατά τη διάρκεια της κοπής και της επεξεργασίας του κρέατος (Chambers & Grandin, 2001). Απαραίτητη είναι επίσης και η αποθήκευση του σφαγίου σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 4 ° C αμέσως μετά τη σφαγή (εντός 4 ωρών) και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και της αποθήκευσης (USDC, 1995), καθώς είναι κρίσιμο σημείο για την υγιεινή, την ασφάλεια, τη διάρκεια ζωής, την όψη και τη ποιότητά του (Zhou et al., 2010).

1.2 Κατανάλωση κοτόπουλου και Νομοθεσία

Η κατανάλωση κρέατος κοτόπουλου αυξάνεται σταθερά σε παγκόσμια κλίμακα, με τα τελευταία διαθέσιμα δεδομένα να δείχνουν ότι έχει φτάσει τα 14.9 κιλά κατά κεφαλή το 2020 (OECD, 2021). Το Ισραήλ και οι αναπτυγμένες δυτικές χώρες και συγκεκριμένα οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, είναι οι μεγαλύτεροι καταναλωτές, με 64.4 και 51 κιλά κατά κεφαλή αντίστοιχα (OECD, 2021). Η ίδια τάση κατανάλωσης παρατηρείται και στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η οποία προβλέπεται να αυξηθεί από 24.6 κιλά το άτομο το 2018 σε 26.2 κιλά κατά άτομο έως το 2028 (OECD/FAO, 2019) (Σχήμα).



Σχήμα 1.1: Παγκόσμια κατανάλωση κρέατος κατά κεφαλή το χρονικό διάστημα 2016-2018 σε σύγκριση με το 2028 (OECD/FAO, 2019)

Λόγω της αυξημένης αυτής ζήτησης και κατανάλωσης, η διασφάλιση της μικροβιακής ασφάλειας των προϊόντων κρέατος πουλερικών είναι ένα σημαντικό ζήτημα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) καθοδήγησαν τους παραγωγούς, διανομείς και εργαζόμενους σε χώρους εστίασης, με σκοπό τη προστασία των καταναλωτών από τροφιμογενείς επιδημίες (Nychas et al., 2016). Μέσω της θέσπισης των κανονισμών υγιεινής HACCP στα τρόφιμα (EC 852/2004) και στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (EC 853/2004), απαιτείται η συμμόρφωση των συμμετεχόντων στο τομέα των τροφίμων με συγκεκριμένες απαιτήσεις, με στόχο την εξάλειψη πιθανών φυσικών βιολογικών και χημικών κινδύνων (EC 852/2004). Στα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα που παρατίθενται στο κανονισμό EC 2073/2005, για το κρέας κοτόπουλου ορίζονται κριτήρια μόνο για το βακτήριο *Salmonella enterica*, του οποίου η απουσία απαιτείται σε 25g ομαδοποιημένου δείγματος δέρματος λαιμού.

Το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας έχει αφιερωθεί στην ανίχνευση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών (κυρίως του γένους *Salmonella* και *Campylobacter*) και στην επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου συντήρησης στην ανάπτυξη των τελευταίων, κατά τη συντήρηση και διανομή των ζωικών τροφίμων (EFSA Journal, 2014). Έχει, όμως, μελετηθεί και αξιολογηθεί και η ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε νωπό κρέας κοτόπουλου για διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου/θερμοκρασίας (EFSA Journal, 2016), ώστε να αποφευχθεί η άσκοπη απόρριψη κρέατος και η όποια οικονομική ζημία αποφέρει αυτή στις βιομηχανίες κρέατος και παρασκευασμάτων (Nychas et al., 2016, Nychas et al., 2008).

1.3 Αλλοίωση κοτόπουλου

Ένα ζωικό τρόφιμο χαρακτηρίζεται ως αλλοιωμένο, όταν αλλάζουν τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, και το καθιστούν μη αποδεκτό από τους καταναλωτές. Η ανεπιθύμητη οσμή, η δημιουργία γλίτσας, χρωματισμών, αλλά και άλλων χαρακτηριστικών που αλλοιώνουν τη δομή και τη γεύση του κρέατος, είναι οι κύριοι παράγοντες για να κριθεί μη αποδεκτό από τους καταναλωτές (Ellis et al., 2002, Nychas et al., 2007).

Η αλλοίωση του κρέατος καθορίζεται από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, ωστόσο η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο. Στη περίπτωση του νωπού κρέατος η μείωση της φρεσκάδας και η πρόοδος της αλλοίωσης μπορούν να αναχθούν στην ανάπτυξη και την αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας διαφορετικών μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων (Gallo et al., 1988, Horváth et al., 2007, Ercolini et al., 2009), αν και υπάρχουν και ζύμες σε ουσιαστικό αλλά πολύ μικρότερο αριθμό στο νωπό και αλλοιωμένο κρέας (Viljoen et al., 1998, Ismail et al., 2000).

Το κρέας αντιπροσωπεύει ένα φυσικό οικοσύστημα, ιδανικό για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, καθώς έχει βέλτιστο pH (5.8-6.8), υψηλή ενεργότητα ύδατος ($a_w = 0.99$) και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, λιπίδια, μέταλλα, βιταμίνες και υδατάνθρακες. Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται ενέργεια για το μεταβολισμό τους, απαραίτητες ουσίες τις οποίες δεν μπορούν να συνθέσουν μόνοι τους και συστατικά για τη σύσταση των κυττάρων τους. Όλα αυτά τα απαραίτητα στοιχεία συλλέγονται από το περιβάλλον του τρόφιμου και η παρουσία τους επιτρέπει την αποτελεσματική επιβίωση των τροφιμογενών στελεχών κατά τη στατική φάση ανάπτυξης. Οι πλεονεκτικές ή μειονεκτικές αυτές συνθήκες καθορίζουν την επιβίωση και την ανάπτυξη ορισμένων ειδικών στελεχών μικροοργανισμών (Lawrie and Ledward 2006).

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η μικροβιολογική δραστηριότητα είναι μακράν ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει τις αλλαγές που προκαλούν αλλοίωση στο κρέας. Ωστόσο, είναι σημαντικό στην αλλοίωση του κρέατος να συμπεριληφθούν και οι αλληλεπιδράσεις της μικροβιακής ανάπτυξης με την ενζυμική τους δραστηριότητα, που έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταβολικών προϊόντων (Nychas et al., 2007). Τέλος, σημαντική είναι και η συμβολή των μη ενζυμικών χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στους μύες του κρέατος κοτόπουλου (Nychas et al., 2007, Dainty, 1996).

1.3.1 Μικροβιακή Αλλοίωση κρέατος κοτόπουλου

Οι μύες των υγιών ζώων είναι απαλλαγμένοι από μικροοργανισμούς λόγω των αμυντικών μηχανισμών που σχετίζονται με: το δέρμα και τους βλεννογόνους, το τρίχωμα και τα πούπουλα, τα γαστρικά υγρά, τα έντερα και τα ούρα, τις φλεγμονώδεις διαδικασίες και τα αντισώματα. Οι μικροοργανισμοί αποκτούν πρόσβαση στο κρέας κατά τη σφαγή, όταν οι παρεμποδιστικοί αυτοί μηχανισμοί διασπώνται και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (Nychas & Skandamis, 2005, Ayres, 1955). Μετά από την επεξεργασία του κρέατος, το 75

με 85 % του μικροβιακού πληθυσμού που βρίσκεται στο κοτόπουλο αποτελείται από χρωμογόνα βακτήρια, μύκητες, και σποριογόνους μικροοργανισμούς. Ωστόσο τη στιγμή της αλλοίωσης οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν είναι τα βακτήρια. Έτσι, η καταμέτρηση των βακτηριακών μονάδων χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αλλοίωσης του κρέατος (Ayres, 1960). Ο αρχικός συνολικός αερόβιος βακτηριακός πληθυσμός των σφαγίων πουλερικών κυμαίνεται από 10^2 έως 10^6 CFU/g, αλλά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τη προέλευση των πουλερικών, τις συνθήκες υγιεινής του χώρου εκτροφής, σφαγής, επεξεργασίας και αποθήκευσης, τη τεχνολογία επεξεργασίας και την εξωτερική θερμοκρασία (Geornaras et al., 1995, Gill, 2005, Serraino et al., 2012). Η αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού ελέγχεται κυρίως με τις θερμοκρασίες αποθήκευσης, επομένως πληθυσμοί ψυχοτρόπων μικροοργανισμών περιορίζονται κατά τη διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης του κρέατος (Lucianez, Holmes, and Tucker 2010). Ωστόσο, ένα πολύ μικρό ποσοστό της τάξης του 10 % των μικροοργανισμών του μικροβιώματος, έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψύξης και να καταφέρει να αλλοιώσει το μυϊκό ιστό (Lu et al., 2003, Rouger et al., 2017) . Οι μικροοργανισμοί αυτοί, που ξεκινούν τη διαδικασία της αλλοίωσης ονομάζονται ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (SSO) (Boziaris & Parlapani, 2017).

Αν και το pH του στήθους κοτόπουλου (pH 5.7 με 5.9) διαφέρει από αυτό του μυϊκού ιστού του μπουτιού (pH 6.4 με 6.7), οι οργανισμοί που προκαλούν αλλοίωση είναι περίπου οι ίδιοι. Σε αυτούς περιλαμβάνονται τα γένη *Pseudomonas* (τα οποία και κυριαρχούν σε αερόβιες συνθήκες) και *Aeromonas*, ενώ μεταξύ των εντεροβακτηρίων τα γένη που κυριαρχούν είναι το *Hafnia*, *Serratia*, *Rahnella*, *Yersinia*, και *Buttiauxella* (Mohareb et al., 2015, Wickramasinghe et al., 2019, Säde et al., 2013, Belluco et al., 2016, Arnaut-Rollier et al., 1999). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές καταγραφές γαλακτικών βακτηρίων, και συγκεκριμένα έχουν ανακαλυφθεί νέα είδη *Enterococcus* και *Lactobacillus*, όπως ο *Enterococcus Viikkiensis*, ο *Enterococcus saigonensis*, και ο *Lactobacillus oligofermentans* σε κρέας κοτόπουλου (Rahkila et al., 2011, Koort et al., 2005, Harada et al., 2016). Το βακτηριακό είδος *Brochothrix thermosphacta* (Illikoud et al., 2019, Xu et al., 2010) είναι επίσης παρόν στη μικροχλωρίδα του κρέατος κοτόπουλου.

1.3.1.1 *Pseudomonas* spp.

Η ψευδομονάδα αποτελεί ένα από τα πιο κοινά γένη βακτηρίων και ανήκει στους ψυχρότροφους, αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς. Τα βακτήρια του γένους

Pseudomonas είναι αερόβιοι ή προαιρετικά αερόβιοι, μη σποριογόνοι, με ραβδοειδή μορφολογία μικροοργανισμοί. Τα είδη στα οποία συνήθως οφείλεται η αλλοίωση των ζωικών ιστών είναι η *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. lundensis*, *P. miguale*, *P. putida*, *P. Syringae*, *P. Viridiflava*, *P. aeruginosa*, *P. Cichorii* (Wickramasinghe et al., 2019, Mohareb et al., 2015). Σε προϊόντα φρέσκου κοτόπουλου τα κύρια αλλοιογόνα στελέχη είναι η *P. fluorescens*, η οποία είναι κυρίαρχος κατά τα πρώτα στάδια αλλοίωσης του κοτόπουλου, με τη *P. fragi* να έρχεται δεύτερη και τελικά να καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό. Καθόλη τη διάρκεια της αλλοίωσης υπάρχει σημαντικό ποσοστό του *P. lundensis* στο οποία παρατηρείται μία μικρή αύξηση στο τέλος και ελάχιστα στελέχη *P. aeruginosa* τα οποία παρατηρούνται μόνο κατά τις πρώτες ημέρες αποθήκευσης (Sundheim et al., 1998). Οι ψευδομονάδες είναι πολύ ανθεκτικές και ικανές να αντέξουν σε συνθήκες στρες, που διαφορετικά θα ανέστέλλαν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, γι' αυτό και αποτελούν τη κυρίαρχο αλλοιογόνο μικροχλωρίδα, με τελικό πληθυσμό να φτάνει τα 10.37 logCFU/g σε στήθος κοτόπουλου (Alexandrakis et al., 2012), και να ξεπερνάει τα 8 logCFU/g σε χοιρινό κιμά (Fengou et al., 2019) σε αερόβιες συνθήκες στους 4 °C. Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων έχει παρακολουθηθεί στενά από αισθητηριακές αλλαγές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Koutsoumanis et al., 2006). Στα πουλερικά η αλλοίωση εντοπίζεται κυρίως στο δέρμα, στο δέρμα συνδεδεμένο με λίπος και στα εξωτερικά μέρη των μυών, γιατί το λίπος στα είναι διαμοιρασμένο κάτω από το δέρμα και τη κοιλιακή κοιλότητα. Σε πολύ προχωρημένα στάδια αλλοίωσης, με τη πρόσπτωση υπεριώδους ακτινοβολίας, οι επιφάνειες φθορίζουν λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού στελεχών *P. Fluorescens* (Arnaut-Rollier et al., 1999).

Η παραγωγή οσμών (putrid, sulphid), η δυσάρεστη γεύση και η εμφάνιση γλοιώδους υφής είναι ένα χαρακτηριστικό της αερόβιας αλλοίωσης του κρέατος από *Pseudomonas* spp. (Ercolini et al., 2006). Οι αλλοιώσεις αυτές οφείλονται στη πρωτεολυτική, λιπολυτική και σακχαρολυτική ικανότητα της *Pseudomonas* spp. η οποία αφού εξαντλήσει τη γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ του υποστρώματος ξεκινά να μεταβολίζει αζωτούχες ενώσεις και αμινοξέα (Raposo, 2017). Αποτέλεσμα αυτής της ικανότητας είναι: αμίνες, πτητικά και δύσοσμα δισουλφίδια, εστέρες, αλδεΐδες και αλκοόλες (Raposo, 2017). Οι εστέρες λιπαρών οξέων μικρής αλύσου, που παράγονται από τη *P. fragi*, είναι υπεύθυνοι για την «φρουτώδη μυρωδιά», ενώ οι αλδεΐδες προσδίδουν λιπαρή γεύση. Οι μικρής αλύσου αλδεΐδες τείνουν να είναι αρκετά αιχμηρές και όξινες και η λιπαρότητα αυξάνεται με το μήκος και το βαθμό

ακορεστότητας αλυσίδας (Insausti et al., 2002, Soncin et al., 2007). Το διμεθυλοσουλφίδιο είναι υπεύθυνο για τη οσμή «λάχανου» του χαλασμένου κρέατος (Stanborough et al., 2018).

Το επικρατέστερο επιλεκτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* και έχει δοκιμαστεί σε δείγματα κοτόπουλου (Mead and Adams 1977) είναι το CFC (Cephaloridine Fucidin Ceftrimide) Agar ή αλλιώς *Pseudomonas* Agar Base. Το υπόστρωμα αυτό επιτρέπει αποκλειστικά την ανάπτυξη έγχρωμων και άχρωμων αποικιών *Pseudomonas* διαμέτρου 2-5 mm, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη άλλων Gram θετικών βακτηρίων (Mead 1985) όπως τα *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Streptococcus*.

1.3.1.2 Enterobacteriaceae

Τα βακτήρια, της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, είναι αρνητικά κατά Gram, ευθέα ραβδία. Είναι μη σποριογόνα και έχουν μεταβολισμό ζυμωτικό και οξειδωτικό και ως προς το χαρακτήρα αυτό διαφέρουν από τα *Pseudomonas* spp. Η οικογένεια *Enterobacteriaceae* περιλαμβάνει ψυχρότροφα, μεσόφιλα και θερμοανθεκτικά είδη. Σχετικά με τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο, μπορούν να αναπτύσσονται και σε αερόβιες, αλλά και σε αναερόβιες συνθήκες και είναι όλα χημειοεταίροτροφα, θετικά στη καταλάση και αρνητικά στην οξειδάση (Μπαλατσούρας, 2006). Η κύρια αιτία επιμόλυνσης του νωπού κοτόπουλου με εντεροβακτήρια είναι η ανεπαρκής ή ανθυγιεινή επεξεργασία, ο ακατάλληλος χειρισμός και οι συνθήκες αποθήκευσης που πραγματοποιούνται στα σφαγεία. Για το λόγο αυτό οι μετρήσεις του αριθμού αποικιών των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και πιο συγκεκριμένα της *E. coli* λειτουργούν ως κριτήριο ποιότητας της επεξεργασίας, της υγιεινής και της αποθήκευσης (Abu-Ruwaida et al., 1994, ICMSF, 1980). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το *E. coli* αναγνωρίστηκε ως χρήσιμος δείκτης οργανισμός για την επαλήθευση της επάρκειας της ανάλυσης κινδύνου και των σχεδίων HACCP που εφαρμόζονται σε σφαγεία βοοειδών, χοίρων και πουλερικών (USDA-FSIS, 1996). Στο νωπό κρέας κοτόπουλο, τα κύρια γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που παρατηρούνται είναι το *Hafnia* (*Hafnia alvei*, *Hafnia paralvei*), *Serratia* (*Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteamaculans*, και *Serratia quinivorans*), *Rahnella*, *Yersinia*, *Buttiauxella*, *Escherichia* (*E. Coli*) και *Salmonella* (Säde et al., 2013, Belluco et al., 2016). Έχει παρατηρηθεί σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες, ότι το κυρίαρχο γένος εντεροβακτήριου σε ωμό κοτόπουλο είναι το *Serratia* spp. το οποίο ακολουθείται από το *Yersinia* spp., *Hafnia*

spp. και *Rahnella spp.*, ενώ σε μαριναρισμένο κοτόπουλο εμφανίζονται περισσότερα στελέχη *Hafnia spp.*, που ακολουθούνται με τη σειρά από *Serratia spp.* *Rahnella spp.* και *Yersinia spp.* (Säde et al., 2013). Η κατάψυξη, δεν αποτελεί αποτελεσματικό μέσο αναστολής τους, γιατί παρόλο που είναι ευαίσθητα σε αυτή και απενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης, υπάρχουν κύτταρα που επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών, γεύσεων και οι αλλαγές στο χρώμα του κρέατος είναι ενδείξεις αλλοίωσης από τη δραστηριότητα των *Enterobacteriaceae*. Το υδρόθειο (H_2S) είναι το μεταβολικό προϊόν το οποίο παράγεται από τη κυστεΐνη έπειτα από περιορισμό της γλυκόζης και του οξυγόνου στο υπόστρωμα και στο οποίο οφείλεται η δυσάρεστη μυρωδιά σήψης (putrid, sulphid) (Egan, Shay, and Rogers 1989). Είναι επίσης υπεύθυνο, υπό αερόβιες συνθήκες, για τη μεταβολή του χρώματος των μυών σε πράσινη θειομυσοσφαιρίνη (Dainty et al., 1989).

Η καταμέτρηση των *Enterobacteriaceae* γίνεται συνήθως με το θρεπτικό υπόστρωμα ενσωμάτωσης VRBGA (Violet Red Bile Glucose agar), το οποίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37 °C για 24 ώρες. Οι αποικίες τους έχουν μωβ - κόκκινο χρώμα περιτριγυρισμένες από ένα πιο διάφανο στεφάνι. (Fengou et al., 2019).

1.3.1.3 Γαλακτικά βακτήρια- LAB

Τα γαλακτικά είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, μη σποριογόνα σε σχήμα ράβδων ή κόκκων, στη πλειοψηφία τους προαιρετικά αναερόβια και αυστηρά ζυμωτικά (Adams and Moss 2007). Είναι τα κυρίαρχα βακτήρια της φυσικής μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού και αναπνευστικού συστήματος των ζωντανών οργανισμών. Τα γαλακτικά βακτήρια αναγνωρίζονται ως σημαντικοί ανταγωνιστές των άλλων μικροοργανισμών που σχετίζονται με την αλλοίωση του κρέατος αποθηκευμένου σε κενό ή τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Castellano et al., 2004, Nychas & Skandamis, 2005). Σε προϊόντα κοτόπουλου έχουν εντοπιστεί γαλακτικά βακτήρια των γενών *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Streptococcus* (Borch et al., 1996, Lu et al., 2003, Gong et al., 2002, Barakat et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα, από το περιβάλλον συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρα ψητού κοτόπουλου, έχουν απομονωθεί μικροοργανισμοί του είδους *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus*, *Enterococcus gilvus* και *Enterococcus Viikkiensis* (Rahkila et al., 2011) ενώ ο *Enterococcus saigonensis* έχει απομονωθεί και

χαρακτηριστεί με μοριακές μεθόδους, από νωπό κρέας και συκώτι κοτόπουλου (Harada et al., 2016). Σε άλλη έρευνα, η δοκιμασία PCR σε πραγματικό χρόνο για τα είδη *Carnobacterium* και *Lactococcus* που απομονώθηκαν από νωπό, κατεψυγμένο και συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα κοτόπουλο, χαρακτήρισε τα *C. divergens*, *C. piscicola*, *L. raffinolactis*, και *L. garvieae*. (Barakat et al., 2000). Ένα νέο είδος, το *Lb. oligofermentans*, βρέθηκε να σχετίζεται με την αλλοίωση μαριναρισμένου κρέατος κοτόπουλου σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Koort et al., 2005). Τα *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus cillus* και *Le. gasicomitatum*, βρέθηκαν να είναι οι κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί σε ωμό, μαριναρισμένο με ντομάτα υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα κοτόπουλο (Bjorkroth et al., 2000).

Χαρακτηριστικές ενδείξεις αλλοιωμένου κρέατος κοτόπουλου από γαλακτικά βακτήρια είναι η κακή οσμή και γεύση, ο σχηματισμός αερίου και λάσπης και ο αποχρωματισμός, όταν ο πληθυσμός τους είναι πάνω από 10^7 CFU/g. Τα ελαττώματα αυτά γίνονται εμφανή μετά από την παραμονή των βακτηρίων στη στατική φάση ανάπτυξης (Korkeala et al., 1989). Η έντονη βουτυρώδης/όξινη γεύση οφείλεται στο γαλακτικό και οξικό οξύ που παράγεται κατά τη λογαριθμική και στατική φάση, ενώ ο σχηματισμός του αερίου (η αύξηση συγκέντρωσης του CO₂ σε συσκευασίες κατά την αποθήκευση) αποδίδεται σε μεταβολικά παραπροϊόντα των ετεροζυμωτικών *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. (Björkroth and Korkeala 1997). Τα *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. είναι επίσης υπεύθυνα για τη παραγωγή πράσινου χρώματος, εξαιτίας του σχηματισμού H₂O₂, το οποίο οξειδώνει το νιτρομυοχρωμογόνο σε αερόβιες συνθήκες (Dušková et al., 2013).

Γενικά τα «γαλακτικά» χρειάζονται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να αναπτυχθούν συγκριτικά με άλλες ομάδες μικροοργανισμών και έχουν μικρότερο μέγεθος αποικιών από τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Γι' αυτό, το υλικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τη καταμέτρηση των γαλακτικών βακτηρίων είναι το MRS (Man, Rogosa and Sharpe) άγαρ, στο οποίο εμβολιάζονται με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης και επωάζονται για 72 ώρες. Οι αποικίες τους έχουν λευκο-γκρί ανοιχτό χρώμα και είναι ημιδιαφανείς. Κάποια *Leuconostoc* spp. μπορεί να σχηματίσουν, λεπτές αποικίες οι οποίες ενδέχεται να εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων αποικιών, προκαλώντας έτσι υποεκτίμηση του αριθμού των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (ISO 15214, 1998).

1.3.1.4 Ενδείξεις μικροβιακής αλλοίωσης

Ο αρχικός δείκτης ένδειξης της αλλοίωσης στο κρέας πουλερικών είναι οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Όταν τα πουλερικά υφίστανται αλλοίωση, πρώτα αναπτύσσονται δυσάρεστες οσμές και στη συνέχεια δημιουργείται ένα στρώμα γλοιώδους ουσίας. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι οι οσμές αναπτύσσονται όταν το ολικό μικροβιακό φορτίο κυμαίνεται από 7.2 έως 8 log cfu/cm², ενώ η γλοιώδης επιφάνεια μαζί με μία «φρουτώδη» μυρωδιά εμφανίζονται όταν το φορτίο φτάσει και ξεπεράσει τους 8 με 9 log cfu/cm², εξαιτίας του μεταβολισμού των ελεύθερων αμινοξέων (Ayres, 1960).

- Δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών: βακτήρια όπως τα *Pseudomonas* και τα γαλακτικά βακτήρια προσδίδουν στο τρόφιμο οσμή σάπιου.
- Σχηματισμός βλέννας: οι μικροοργανισμοί που σχηματίζουν βλέννα είναι τα *Lactic Acid Bacteria* και κυρίως τα γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* και *B. thermosphacta*.
- Δημιουργία πράσινου χρώματος: προκαλείται συνήθως από την παραγωγή H₂O₂ και H₂S στα φρέσκα και επεξεργασμένα προϊόντα από τα βακτήρια, *Weissella viridescens*, *Leuconostoc*, *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis*. Είναι αποτέλεσμα της οξειδωσης των δακτυλίων της πορφυρίνης, το οποίο οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος από κόκκινο σε πράσινο. Τότε σχηματίζεται ένα πράσινο τμήμα είτε στην επιφάνεια του τροφίμου είτε σ' όλο το τρόφιμο.
- Κιτρίνισμα: εμφανίζεται σε κοτόπουλα που είναι επιμολυσμένα με το βακτήριο *Enterococcus casseliflavus*. Αυτό το είδος αποχρωματισμού ξεκινά με την μορφή μικρών κίτρινων κηλίδων σε προϊόντα αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύξης και συνήθως γίνεται εμφανής μετά από 3 με 4 ημέρες αποθήκευσης. Ο μικροοργανισμός που τον προκαλεί δεν μπορεί να επιβιώσει στους 71 °C για 30 min, γεγονός που δείχνει ότι μη επαρκείς συνθήκες θερμικής επεξεργασίας ενδέχεται να αποτελέσουν πρόβλημα.
- Οξίνιση: προκαλείται σε αποθηκευμένα, επεξεργασμένα κρέατα εξαιτίας της ανάπτυξης βακτηρίων όπως τα γαλακτικά βακτήρια, *B. thermosphacta* ή *Enterococci*, που προκαλούν ζύμωση διαφόρων σακχάρων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν τους υδατάνθρακες ως πηγή ενέργειας και τους μετατρέπουν σε οξέα, τα οποία προκαλούν την οξίνιση.

- Παραγωγή αερίων: σε φέτες κρέατος συσκευασμένων σε κενό αναπτύσσονται συνήθως τα βακτήρια της οικογένειας των *Clostridium*.

Οργανοληπτικές μεταβολές που σχετίζονται με τη δράση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (Nychas et al., 2008)

Οργανοληπτική μεταβολή	Αλλοιογόνα βακτήρια
H ₂ S (παραγωγή)	<i>Vibrio</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
H ₂ O ₂ , πράσινο χρώμα	<i>Weissella</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
H ₂ S, πράσινο χρώμα	<i>Shewanella</i> spp.
Οσμή σουλφιδίου	<i>Clostridium</i> spp., <i>Hafnia</i> spp.
Γλοιώδης επιφάνεια (slime)	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Weissella</i> spp., <i>Brochothrix</i> spp.
Μαύρισμα στα κόκαλα	<i>Clostridium</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.

1.3.2 Χημική αλλοίωση

Η χημική αλλοίωση του κρέατος αποδίδεται στη συνεργιστική δράση των ενδογενών ενζύμων του (πρωτεάσες, λιπάσες) με τα ένζυμα που προκύπτουν από τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, η οποία λαμβάνει χώρα στα υδατοδιαλυτά συστατικά του (Dainty 1996). Ταυτόχρονα οφείλεται και σε άλλες μη ενζυμικές αντιδράσεις όπως η αυτοξείδωση των λιπιδίων, η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και η απώλεια άλλων πολύτιμων μορίων (Dave & Ghaly, 2011, Dainty, 1996). Ωστόσο, ο ρόλος των ενδογενών ενζύμων στην αλλοίωση του κρέατος φαίνεται να είναι μόνο η πτώση του pH στο 5.4-5.5, εξαιτίας της μεταθανάτιας γλυκόλυσης που προκαλούν και η παραγωγή ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (γλυκόζη, γαλακτικό οξύ). Μετά τη πτώση του pH η συνεισφορά τους στην αλλοίωση είναι αμελητέα σε σχέση με τη μικροβιακή δραστηριότητα (Nychas & Tassou, 1997, Nychas et al., 2007). Οι ενώσεις που προκύπτουν από τη γλυκολυτική πορεία (γλυκογόνο, γλυκόζη, 6-P-γλυκόζη, γαλακτικό κ.α.), τα μεταβολικά προϊόντα (γλυκονικό οξύ, πυρουβικό οξύ, 6-P-γλυκονικό κ.α.) και οι νιτρογενείς ενώσεις (αμινοξέα, πρωτεΐνες κ.α.), είναι υποστρώματα που μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς, διευκολύνοντας

τη δράση των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων. (Nychas & Tassou, 1997). Επιπλέον, μετά τη σφαγή, λαμβάνει χώρα η οξείδωση των λιπαρών οξέων των ιστών κατά την αντίδρασή τους με το οξυγόνο, με αποτέλεσμα τη παραγωγή υπεροξειδίων, αλδευδών, κετονών και μικρής αλύσου λιπαρών οξέων· ενώσεων που προσδίδουν δυσάρεστο χρώμα, οσμή και γεύση (Nychas et al., 2007, Dave & Ghaly, 2011). Παράλληλα, οι πρωτεΐνες της αίμης, όπως η αιμοσφαιρίνη, η μυογλοβίνη, η οξυμυογλοβίνη και το κυτόχρωμα, οι οποίες είναι ευαίσθητες στην οξείδωση, παράγουν υδροϋπεροξειδία μέσω μη ενζυμικής υδρόλυσης. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη κατάλυση της αίμης ο Fe^{2+} οξειδώνεται και σχηματίζονται ενώσεις με Fe^{3+} , καθορίζοντας το χρώμα του νωπού κρέατος (Dave & Ghaly, 2011, Hawkins et al., 2014).

1.3.2.1 Μεταβολισμός αλλοιογόνων μικροοργανισμών υπό αερόβιες συνθήκες

Η ανάπτυξη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων μειώνεται σημαντικά υπό αερόβιες συνθήκες (Nychas et al., 2008), αλλά η απουσία οξυγόνου ευνοεί την ανάπτυξη θετικών κατά gram βακτηρίων όπως τα γαλακτικά (Björkroth and Korkeala 1997) και ο *Brochothrix thermosphacta* (Pin et al., 2002). Η αεροβική αλλοίωση του λευκού κρέατος, οφείλεται κυρίως σε ενώσεις που προκύπτουν από τη μεταβολική δραστηριότητα των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp., και οδηγούν στο σχηματισμό πράσινου χρώματος, γλοιώδους επιφάνειας και μυρωδιάς σήψης (Raposo et al., 2017, Ercolini et al., 2006, Gram et al., 2002). Οι μεταβολές αυτές γίνονται αντιληπτές όταν οι ψευδομονάδες έχουν εξαντλήσει τη γλυκόζη, το πυρουβικό και το γαλακτικό οξύ του υποστρώματος και ξεκινούν να μεταβολίζουν νιτρογενείς ενώσεις, όπως τα αμινοξέα. Οι μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για αυτές τις αλλαγές είναι κυρίως θειούχες ενώσεις όπως το υδρόθειο και το διμεθυλοσουλφίδιο, όπου το πρώτο προκύπτει από το καταβολισμό της κυστεΐνης, της κυστίνης και μεθειονίνης, ενώ το δεύτερο από το καταβολισμό τη μεθανοθειόλης και της μεθειονίνης (Gram et al., 2002, Nychas et al., 2007, Stanborough et al., 2018). Σε αερόβιες συνθήκες η *P. Fragi* είναι ο κύριος και ίσως ο μόνος παραγωγός αιθυλεστέρων μεταξύ των αερόβιων μικροοργανισμών, και είναι υπεύθυνος για τη γλυκιά και φρουτώδη μυρωδιά στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης (Edwards et al., 1987, Nychas & Arkoudelos, 1990, Casaburi et al., 2015). Ιδιαίτερη φαίνεται να είναι η προτίμηση των *Pseudomonas* spp. στη κατανάλωση της D-γλυκόζης και του L και D-γαλακτικού οξέος, διαδοχικά, με την οξείδωση της γλυκόζης και της 6-P γλυκόζης μέσω του εξωκυτταρικού μονοπατιού να οδηγεί σε

παροδική συσσώρευση D-γλυκονικού και αύξηση της συγκέντρωσης 6-P γλυκονικού (Nychas & Arkoudelos, 1990, Casaburi et al., 2015).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, και συγκεκριμένα τα *Lactobacillus* spp. σε αερόβιες συνθήκες, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (αλλάζοντας το μεταβολισμό τους από ομοζυμωτικό σε ετεροζυμωτικό), μπορούν να οξειδώσουν το γαλακτικό και το πυροσταφυλικό σε οξικό οξύ (Borch et al., 1996), προσδίδοντας στο κρέας μία αιχμηρή γεύση ξιδιού (Samelis 2006). Επιπλέον, χαρακτηριστική ένωση που συμβάλλει στη όξινη και τυρώδη γεύση είναι η ακετοΐνη, που παράγεται από τα γαλακτικά βακτήρια, και είναι μία από τις κυρίαρχες ενώσεις που βρίσκονται σε προϊόντα κρέατος αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης. Παράγωγα των ομοζυμωτικών λακτοβάκιλλων είναι το γαλακτικό, το οξικό οξύ η ακετοΐνη και το H_2O_2 , ενώ των ετεροζυμωτικών το D- και L- γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ και H_2O_2 . Άλλο παράγωγο, κυρίως των στελεχών *Leuconostoc*, είναι η αιθανόλη (Borch and Molin 1989). Ο *Lactobacillus sakei* σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου και γλυκόζης, καταβολίζει τη κυστεΐνη και παράγει H_2S , το οποίο μετατρέπει το χρώμα του μυϊκού ιστού σε πράσινη σουλφομυογλοβίνη (Borch et al., 1996).

Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* δείχνουν τη προτίμησή τους να χρησιμοποιούν πρωτίστως τη διαθέσιμη γλυκόζη του υποστρώματος, την 6-P γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ, και έπειτα να καταβολίσουν τα αμινοξέα (Nychas et al., 2008, Casaburi et al., 2015). Το αποτέλεσμα είναι η γεύση και η μυρωδιά σήψης, εξαιτίας της παραγωγής H_2S , διαμινών και ινδολίου (Dainty 1996). Ενώσεις όπως αλδεΐδες, κετόνες και πτητικά λιπαρά οξέα είναι επίσης παράγωγα των εντεροβακτηρίων (Gill 1996).

1.4 Επίδραση εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών

κατά τη διαδικασία αλλοίωσης του κοτόπουλου.

Η ανάπτυξη των μικροβίων εξαρτάται από εξωγενείς (extrinsic) και ενδογενείς (intrinsic) παράγοντες, όπως η θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου, η υγρασία, η σύνθεση της ατμόσφαιρας, τα συστατικά του υποστρώματος, η ενεργότητα του νερού (a_w), το pH, η παρουσία συντηρητικών (π.χ. αλατιού, νιτρικών, σορβικών), το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh), η παρουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας και ο χρόνος (Adams and Moss 2007). Με το μεμονωμένο έλεγχο κάθε παράγοντα, μπορεί να μειωθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η μικροβιακή σταθερότητα και ασφάλεια των περισσότερων τροφίμων

βασίζεται σε ένα συνδυασμένο έλεγχο των παραπάνω παραγόντων (τεχνολογία εμποδίων) (Leistner and Gorris 1995) ο έλεγχος των οποίων χρησιμοποιείται για να περιορίσει ή και να αποτρέψει τη μικροβιακή ανάπτυξη, να εξασφαλίσει τη σταθερότητα των οργανοληπτικών, θρεπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου (Leistner, 2000), καθώς και το χρόνο ημι-ζωής του (Kilcast & Subramaniam, 2000) , η διακοπή της ομοιόστασης των μικροοργανισμών είναι το βασικό φαινόμενο της συντήρησης των τροφίμων (Leistner, 2000). Συνεπώς, η τεχνολογία πολλαπλών εμποδίων συνίσταται στην εφαρμογή ενός συνδυασμού επιλεγμένων και έξυπνων εμποδίων, περισσότερων από δύο κα χαμηλής έντασης το καθένα, τα οποία προσβάλλουν τους μηχανισμούς ομοιόστασης των μικροοργανισμών.

Η επίδραση της θερμοκρασίας, των τροποποιημένων ατμοσφαιρών, των αντιμικροβιακών ουσιών και της σχετικής υγρασίας, έχει μελετηθεί επανειλημμένα, τόσο για την ανάπτυξη αλλοιογόνων, όσο και για την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών σε πολλά είδη κρέατος (Bjorkroth et al., 2000, Ercolini et al., 2006, Nychas et al., 2008, Björkroth, 2005, Mahrouf et al., 2003, Doulgeraki et al., 2012). Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης, στην ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε μαριναρισμένο σουβλάκι από μπούτι κοτόπουλο. Τα συστατικά της εμπορικής μαρινάδας που χρησιμοποιεί η εταιρεία KOTINO A.E.B.E είναι: αλάτι, οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, ένζυμο τρυφεροποίησης και ασκορβικό οξύ.

1.4.1 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποθήκευσης θεωρείται ο παράγοντας που διαδραματίζει το σημαντικότερο ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος επηρεάζοντας τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag phase), το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και τον τελικό αριθμό κυττάρων (Doulgeraki et al., 2012, Labuza & Fu, 1993). Έτσι ο διεξοδικός έλεγχος της θερμοκρασίας των ιστών και των χώρων συντήρησης και αποθήκευσης σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας του νωπού κρέατος, αλλά και η τήρηση των κανόνων ορθής υγιεινής, όπως ορίζονται από τους 852/2004 και 853/2004, είναι αναγκαίες απαιτήσεις για την ελαχιστοποίηση των πιθανοτήτων επιμόλυνσης, αλλά και της περεταίρω ανάπτυξης των παθογόνων και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Nychas et al., 2008). Τα δύο κρίσιμα σημεία στη διαχείριση των σφαγίων είναι οι θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν κατά τη σφαγή, (η θερμοκρασία των μονάδων είναι συνήθως περίπου 10 °C), και κατά την αποθήκευση (στην οποία

συνεκτιμάται η ρήξη της ψυκτικής αλυσίδας από τη στιγμή της πώλησης ως το ψυγείο του καταναλωτή, όπου η θερμοκρασία εκτιμάται να είναι πάνω από 4 °C) (EFSA Journal, 2014).

Σύμφωνα με τους Gill και Newton (1978), σε συνθήκες ψύξης κρέατος (-1 έως 5), παρατείνεται σε σημαντικό βαθμό η φάση προσαρμογής (lag phase) των μικροοργανισμών σε σχέση με την αντίστοιχη που καταγράφεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ενώ με τη ψύξη ευνοείται η ανάπτυξη κυρίως των ψυχρότροφων και ψυχρόφιλων μικροοργανισμών. Πιο ειδικά, κατά την αερόβια συντήρηση του κρέατος πουλερικών υπο συνθήκες ψύξης, οι κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί έναντι άλλων ψυχρότροφων στη μικροχλωρίδα τους είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* συνοδευόμενα από χαμηλότερους πληθυσμούς Gram αρνητικών βακτηρίων όπως *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* αλλά και Gram θετικών όπως τα *Lactic Acid Bacteria* (Wickramasinghe et al., 2019, Ercolini et al., 2006, Gram et al., 2002, Mead, 2004, Chouliara et al., 2007). Τα πουλερικά που διατηρούνται στους 10 °C ή χαμηλότερα αλλοιώνονται κυρίως από *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas putida*), *Alcaligenes*, *Acinetobacter*. Πάνω από τους 10 °C, τα *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella* και *Micrococcus* είναι αυτά που ευνοούνται, ενώ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30°C παρατηρείται ανάπτυξη κυρίως των μεσόφιλων *Acinetobacter* και *Enterobacteriaceae*. Σε παγωμένα πουλερικά βρίσκονται συχνά οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί *Alcaligenes* και *Pseudomonas* (Wiley, 2016). Μία έρευνα έδειξε ότι κατά την αποθήκευση νωπού κρέατος πουλερικών στους 20 °C το 87 % της μικροχλωρίδας ανήκε σε μικροοργανισμούς, εκτός των ψευδομονάδων, που περιλάμβαναν τα *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* spp., *E.coli* και ανθεκτικά στο κρύο κολοβακτηρίδια (Pooni and Mead 1984). Τα αποτελέσματα αυτά αντιτίθενται σε αυτά αντίστοιχης έρευνας σε μοσχάρι, όπου το 60 % της αλλοιογόνου χλωρίδας αποτελούταν από *Pseudomonas* spp., ενώ μόνο το 5 % αντιστοιχούσε σε *Enterobacteriaceae* (Gill and Newton 1980). Επίσης, η ανάπτυξη της *Pseudomonas* spp. παρατηρείται και σε ψύξη κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, αλλά δε θεωρείται ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός. Σε αυτή τη περίπτωση η αλλοίωση του κρέατος αποδίδεται κυρίως στους LAB και *Brochothrix thermosphacta*, απ' τους οποίους ευνοείται ο πρώτος όταν το ποσοστό οξυγόνου είναι χαμηλό, ενώ ο δεύτερος όταν είναι υψηλό (Castellano et al., 2004, Nychas & Skandamis, 2005, Bjorkroth et al., 2000, Barakat et al., 2000). Σύμφωνα με τους Kreyenschmidt and Ibald (2012), μικρές θερμοκρασιακές καταχρήσεις μπορούν να αυξήσουν σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών (SSO). Πιο συγκεκριμένα,

παρατηρήθηκε ότι θερμοκρασιακές αλλαγές ύψους 11 °C και χρονικής διάρκειας λιγότερης από το 5 % του συνολικού χρόνου αποθήκευσης μειώνουν τη διάρκεια ζωής φρέσκων πουλερικών κατά 20 % (Kreyenschmidt & Ibald 2012).

Πέρα από τις συμβατικές μικροβιολογικές έρευνες έχει γίνει και εφαρμογή της ποσοτικής μικροβιολογίας, με στόχο την ερμηνεία της επίδραση της θερμοκρασίας στην αλλοίωση του κρέατος κατά τη συντήρηση και τη δύναμή του (McMeekin 2007). Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες χρησιμοποιώντας ισοθερμοκρασιακά η και δυναμικά προφίλ θερμοκρασίας, ώστε να ερευνηθεί ο αντίκτυπος της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε πολλά είδη κρέατος με βάση διάφορα πρωτογενή και δευτερογενή κινητικά μοντέλα (Koutsoumanis & Taoukis, 2005, Ross & Dalgaard, 2004, Zwietering et al., 1993). Έχει επιβεβαιωθεί ο καθοριστικός ρόλος της θερμοκρασίας στο ρυθμό ανάπτυξης της *Pseudomonas* spp. μέσα από τη δημιουργία μοντέλου, το οποίο ερευνούσε την επίδραση πολλών ενδογενών παραγόντων (pH, aw, σύσταση υποστρώματος) και της θερμοκρασίας για την αλλοίωση φρέσκου χοιρινού κρέατος και κοτόπουλου υπο αερόβιες συνθήκες. Το μοντέλο κατασκευάστηκε με το συνδυασμό του μοντέλου Gompertz ως πρωτογενούς και του μοντέλου Arrhenius ως δευτερογενούς μοντέλου και βασίστηκε σε 5 ισοθερμοκρασιακά (από τους 2 °C έως τους 15 °C) και 9 δυναμικά προφίλ. Το μοντέλο, παρότι παρουσίασε υποεκτίμηση τις πρώτες 50 ώρες για τα πουλερικά, στο τέλος προέβλεψε πληθυσμό της *Pseudomonas* spp στα 7.5 log CFU/g, ο οποίος σχετίζεται με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος (Bruckner et al., 2012a, 2012b, 2013, Bruckner, 2010). Δύο άλλα δυναμικά μαθηματικά μοντέλα που κατασκευάστηκαν για τη πρόβλεψη της ανάπτυξης της *Pseudomonas* spp. σε πουλερικά, υπο αερόβιες συνθήκες και για χαμηλές μετατοπίσεις της θερμοκρασίας, βασίζονται στη χρήση των πρωτογενών μοντέλων Baranyi και Roberts και του τροποποιημένου Gompertz και του δευτερογενούς μοντέλου τετραγωνικής ρίζας του Ratkowsky. Το ένα χρησιμοποιεί δύο θερμοκρασιακά δυναμικά προφίλ και προβλέπει την ανάπτυξη στο εύρος θερμοκρασιών 2 °C με 20 °C (Gospavic et al. 2008), ενώ το άλλο στο εύρος -2 °C με 25 °C από όπου φαίνεται ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp είναι χαμηλότερος μεταξύ 3 °C και 15 °C (Dominguez and Schaffner 2007). Επίσης έχει γίνει συσχέτιση της θερμοκρασίας με το χρόνο ημι-ζωής σε κοτόπουλο, μέσω ενός μοντέλου κατά Ratkowsky, όπου προσδιορίζεται ο πληθυσμός των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και των *Pseudomonas* spp. (Pooni and Mead 1984). Ακόμη, το μοντέλο τροποποιημένης μορφής του Arrhenius που δημιούργησαν οι Koutsoumanis et al. (2006), έχει δημιουργηθεί από δεδομένα για ισοθερμοκρασιακές συνθήκες και επιβεβαιωθεί με

οργανοληπτικά και μικροβιολογικά αποτελέσματα από δυναμικά προφίλ. Στο μοντέλο αυτό, φαίνεται η καταλυτική δράση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp, *Brochothrix thermosphacta*, LAB και *Enterobacteriaceae* σε μοσχαρίσιο και χοιρινό κρέας (Koutsoumanis et al. 2006). Ακόμη, έχει αναπτυχθεί και επαληθευτεί με μικροβιολογικό και οργανοληπτικό έλεγχο, μοντέλο, για το ρυθμό ανάπτυξης του αερόβιου μικροβιακού πληθυσμού των *Pseudomonas* spp. και LAB, για μαριναρισμένο στήθος κοτόπουλο (Lytou et al., 2016).

Καταλήγοντας, βάσει των παραπάνω, είναι αναγκαία η τήρηση χαμηλών θερμοκρασιών σε όλο το μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας, από τη πρώτη ψύξη του σφαγίου πριν την αφαίρεση του δέρματος, κατά το τεμαχισμό, την αποθήκευση, τη διανομή και τη συντήρησή του στα σημεία πώλησης, ως το ψυγείο του καταναλωτή (Nychas et al., 2008). Η επιστημονική επιτροπή της EFSA, για το λόγο αυτό, κατασκεύασε μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp. και LAB σε χοιρινό, μοσχαρίσιο και κρέας κοτόπουλου, με στόχο το προσδιορισμό των βέλτιστων συνδυασμών θερμοκρασίας ψύξης- χρόνου αποθήκευσης και διανομής, ώστε να αποφεύγεται η σύντομη μικροβιακή αλλοίωση του κρέατος (EFSA Journal, 2016).

1.4.2 Μαρινάδα

Το μαρινάρισμα αποτελεί μία παραλλαγή της συντήρησης σε άλμη, με τη διαφορά ότι το αλάτι αντικαθίσταται από ξύδι, κρασί ή μίγμα τους, χυμούς φρούτων ή εκχυλίσματα φυτών, ή από λάδι. Στη βιομηχανία τα μίγματα αυτά βασίζονται σε ασθενή οξέα όπως οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ, με την προσθήκη NaCl και έχουν κυρίως ως στόχο τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κρέατος. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η μαρινάδα επιλέγεται και για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων στα προϊόντα κρέατος (Björkroth, 2005). Ωστόσο, έχει γίνει περιορισμένη έρευνα που να περιγράφει την εξέλιξη και τελική σύσταση της βακτηριακής χλωρίδας στο μαριναρισμένο κρέας (Schirmer et al., 2009).

Η αλλοίωση στα μαριναρισμένα πουλερικά που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες προκαλείται κυρίως από αρνητικά κατά Gram ψυχρότροφα βακτήρια, κυρίως ψευδομονάδων (Carlos and Harrison 1999). Η ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών εξαρτάται από τις ουσίες που περιέχονται σε όξινα διαλύματα, για παράδειγμα η προσθήκη 1% γαλακτικού οξέος σε διάλυμα μαρινάδας μειώνει σημαντικά τα στελέχη τους (Smaoui et al., 2011). Το

μαρινάρισμα με διαλύματα φωσφορικού άλατος αυξάνει το pH και πιθανώς διευκολύνει τη μικροχλωρίδα της αλλοίωσης, με βέλτιστη ανάπτυξη σε αλκαλικό pH (González-Fandos et al., 2009). Αντίθετα, τα όξινα διαλύματα μαρινάδας μειώνουν το pH και καταστέλλουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Ο λόγος αυτής της αναστολής είναι η παρουσία ασθενών οργανικών οξέων (οξικό, γαλακτικό) ή των αλάτων τους (γαλακτικά, οξικά) και NaCl (Yusop et al. 2010).

Έχει προταθεί ότι η ανάπτυξη του *Pseudomonas* spp. εξαρτάται από την παρουσία βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Gerez et al., 2009). Η αύξηση των βακτηρίων που συνθέτουν H₂S, όπως τα *Pseudomonas* spp., αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία του γαλακτικού οξέος - ένα προϊόν των LAB (González-Fandos et al., 2009), με αποτέλεσμα, η ποσότητα του απελευθερούμενου υδρόθειου και άλλων θειούχων ενώσεων να μειώνεται και ο χρόνος αποθήκευσης να αυξάνεται. Έχει διαπιστωθεί ότι μεταξύ μαριναρισμένων και μη μαριναρισμένων νωπών κοτόπουλων σε συνθήκες MAP (60 % N₂ και 40 % CO₂), αποθηκευμένων στους 6 °C, διπλασιάζεται ο μέγιστος αριθμός στελεχών των γαλακτικών βακτηρίων. Μοριακές μέθοδοι επιβεβαίωσαν ότι μεταξύ των LAB, η μαρινάδα ευνόησε το *Leuconostoc* και το ειδικότερα *L. gasicomitatum*, και μείωσε το *B. thermosphacta*, *Clostridium* spp., και τα *Enterobacteriaceae* (Nieminen et al., 2012). Σε έρευνα σε νωπά, μαριναρισμένα με ντομάτα πουλερικά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, παρατηρήθηκε σχηματισμός αερίου, πιθανώς λόγω της αποκαρβοξυλίωσης των υπολειμμάτων των αμινοξέων. Από αυτά απομονώθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *L. gasicomitatum*, *Carnobacterium divergens*, *L. sakei*, *L. curvatus* και προτάθηκε ότι συνήθως οι μικροβιακές αλλοιώσεις προκαλούνται από τον *L. gasicomitatum* (Björkroth, 2005). Σύμφωνα με τη μελέτη των Yusop et al., 2010 κατά το μαρινάρισμα (διάρκειας 180 min) φιλέτου κοτόπουλου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραμέτρου α του χρώματος με αντίστοιχη μείωση της παραμέτρου L. Παράλληλα, ο αυξανόμενος χρόνος μαρινάρισματος διαπιστώθηκε ότι παρήγαγε τελικά προϊόντα μεγαλύτερης αποδεκτότητας με αυξανόμενες βαθμολογίες για το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του pH συναρτήσει του pH του διαλύματος μαρινάρισματος (Yusop et al., 2010).

1.5 Σύγχρονοι μέθοδοι ανάλυσης για το προσδιορισμό αλλοίωσης στο κρέας

Όπως αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 1.2 η παραγωγή, η ζήτηση και η κατανάλωση του κρέατος κοτόπουλου ανέρχεται σε εκατομμύρια τόνους το χρόνο. Λόγω της ταχείας

αλλοίωσης του κρέατος, αναδύεται η ανάγκη εύρεσης νέων ταχέων, μη επεμβατικών και οικονομικά σύγχρονων τεχνικών προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης, ώστε να αποφεύγεται η άσκοπη σπατάλη του.

Ως τώρα, το σύστημα διαχείρισης και ασφάλειας τροφίμων βασίζεται σε ευρέος φάσματος επιθεωρήσεις και καθεστώτα δειγματοληψίας, όπου τα προϊόντα ελέγχονται με χημικές και συμβατικές ή μοριακές μικροβιολογικές αναλύσεις. Οι αναλύσεις αυτές, ωστόσο, παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα, καθώς είναι χρονοβόρες δίνοντας αναδρομικά αποτελέσματα, έχουν υψηλό κόστος, μερικές απαιτούν υψηλής τεχνολογίας μοριακά εργαλεία και εξειδικευμένο προσωπικό και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν πάνω στη γραμμή παραγωγής επειδή καταστρέφουν το προς ανάλυση προϊόν (Nychas et al., 2016, Papadopoulou et al., 2011). Επιπλέον στη περίπτωση των μοριακών εργαλείων, επειδή αυτά εστιάζουν στους παθογόνους και όχι σε συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών που συμβάλλουν στην αλλοίωση και βασίζονται στις συνθήκες συσκευασίας και αποθήκευσης, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι παραπλανητικά. (Doulgeraki et al., 2012, Ropodi et al., 2016). Ως εκ τούτου, έχουν γίνει προσπάθειες αντικατάστασης, τόσο των συμβατικών όσο και των μοριακών μικροβιολογικών αναλύσεων, με ανίχνευση βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν στα τρόφιμα, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της αλλοίωσης ή της ασφάλειας των τροφίμων (Ropodi et al. 2016).

Γι' αυτό το λόγο, πρόσφατα, έγιναν υποσχόμενες αναλυτικές προσεγγίσεις που προωθούν την ταχεία και ποσοτική παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων μέσα από τη δημιουργία ενός δικτύου PAT (Process Analytical Technology) (Nychas et al., 2016). Η βασική ιδέα του PAT είναι ο συνδυασμός πολυπαραγοντικών δεδομένων που προέρχονται από αναλυτικές μεθόδους σε πραγματικό χρόνο με πολυπαραγοντικές αναλύσεις δεδομένων για συνεχή ανατροφοδότηση και συσσώρευση πληροφοριών. Αυτές οι προσεγγίσεις βασίζονται σε μη επεμβατικές μεθόδους φασματοσκοπίας, όπως η φασματοσκοπία δονήσεων (NIR-φθορισμού, Raman, FT-IR) (Papadopoulou et al. 2011)(Argyri, Panagou, and Nychas 2014) και η υπερ-φασματική και πολύ-φασματική απεικόνιση (hyper/multispectral imaging) (Feng et al., 2018, Manthou et al., 2020, Pu et al., 2015, Panagou et al., 2014), και βιομημητικοί αισθητήρες οσμής και γεύσης (e-nose και e-tongue) (Loutfi et al., 2015, Rajamäki et al., 2006, Ellis et al., 2002). Επιπλέον, ο συνδυασμός των αναλυτικών αυτών τεχνικών με τις μικροβιολογικές, χημικές, βιοχημικές αναλύσεις, τους ποιοτικούς παράγοντες και τα εργαλεία μηχανικής εκμάθησης, επιτρέπει τη κατανόηση της όλης διεργασίας, το

προσδιορισμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCPs) και τέλος την εφαρμογή της γνώσης στον έλεγχο της διεργασίας (Nychas et al., 2016).

1.5.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (MultiSpectral Image Analysis, MSI)

Η πολυφασματική απεικόνιση είναι μία τεχνολογία με την οποία μπορούν να αποκτηθούν τόσο φασματικές όσο και χωρικές πληροφορίες των χημικών στόχων. Αυτή η χημική τεχνική απεικόνισης είναι ένας συνδυασμός της φασματοσκοπίας ορατού, της φασματοσκοπίας των δονήσεων και της υπολογιστικής όρασης (Computer vision). Η τεχνολογία αυτή είναι μία οπτική τεχνολογία που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του προσπίπτοντος φωτός στα μόρια του προς εξέταση δείγματος (Ropodi et al. 2016). Η φασματοσκοπία δονήσεων υπολογίζει την απορροφούμενη ενέργεια των περιστρεφόμενων-δονούμενων μορίων κατά τη πρόσπτωση δέσμης φωτός στο δείγμα (Dufour 2009). Για τη λήψη χωρικών πληροφοριών χρησιμοποιείται η τεχνολογία του Computer vision το οποίο μιμείται την αρχή της ανθρώπινης όρασης χρησιμοποιώντας τρεις ζώνες (κόκκινο, πράσινο και μπλε) ώστε να αναπτύξει τα χαρακτηριστικά του τροφίμου (σχήμα το χρώμα το μέγεθος και την υφή), δουλεύοντας στο ορατό φάσμα φωτός. Οι φασματικές περιοχές στη υπερφασματική απεικόνιση είναι από περίπου 200 nm (υπεριώδες) έως 2500 (NIR). Επειδή όμως τα κύρια δομικά στοιχεία των τροφίμων αποτελούνται κυρίως από λειτουργικές ομάδες όπως C- H (οργανικές ενώσεις), N-H (πρωτεΐνες και αμινοξέα), και O-H (νερό, υδατάνθρακες και λίπη), οι οποίες συνδέονται πιο στενά με τους ήχους και τις μπάντες συνδυασμού στη περιοχή του NIR, το εύρος φάσματος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση τροφίμων είναι τα 380-800nm ή 400-1000nm (Pu et al., 2015, Feng et al., 2018, Gowen et al., 2015, Dufour 2009).

Ένα πολυφασματικό όργανο απεικόνισης αποτελείται κυρίως από μία πηγή φωτός (δέσμη φωτός) για την, έναν αισθητήρα φωτός, ένα φασματογράφο, ένα φακό, ένα μετατροπέα σήματος και έναν υπολογιστή στον οποίο είναι εγκατεστημένο λογισμικό για τον έλεγχο της διαδικασίας λήψης και επεξεργασίας των εικόνων (Feng et al. 2018). Τα δεδομένα που λαμβάνονται είναι ένας τρισδιάστατος κύβος εικόνας που παρέχει τόσο φασματικές όσο και χωρικές πληροφορίες. Με τον όρο «χωρικές» πληροφορίες, εννοείται η ένταση των pixel κατά την επιλογή ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος, ενώ οι «φασματικές» πληροφορίες υποδηλώνουν την ένταση κάθε pixel σε διαφορετικές φασματικές ζώνες (μπάντες). Αυτές οι πληροφορίες είναι εξαιρετικά ενημερωτικές άλλα παράλληλα είναι και πολύ ευαίσθητες στο θόρυβο και σε άλλες περιττές πληροφορίες. Για το λόγο αυτό υπάρχει ένα σύστημα

επεξεργασίας της εικόνας, κατά το οποίο γίνεται τμηματοποίηση της εικόνας ώστε να επιλεγεί μόνο η περιοχή ενδιαφέροντος (ROI) και να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες περιοχές όπως π.χ. το φόντο της εικόνας, το τριβλίο, το λίπος κ.α. (Teena et al., 2013). Η MSI είναι μία ταχεία, μη επεμβατική μέθοδος, εύκολη στην εφαρμογή εφόσον δεν απαιτεί επεξεργασία του δείγματος, οπότε είναι κατάλληλη για τη παρακολούθηση της γραμμής παραγωγής σε μια μονάδα επεξεργασίας κρεάτων (Nychas et al., 2016).

1.5.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Με την προηγούμενη γνώση ότι η αλλοίωση είναι η αποτέλεσμα της αποσύνθεσης και του σχηματισμού μεταβολιτών που προκαλείται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών, αυτή η πληροφορία μπορεί να αξιοποιηθεί μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης. Επομένως, από το να μετράται αποκλειστικά η παρουσία βακτηρίων καθαυτή στην επιφάνεια του κρέατος, μπορούν να ανιχνεύονται οι βιοχημικές αλλαγές του υποστρώματος με τη χρήση φασματοσκοπίας δόνησης, η οποία ενισχύει και επιταχύνει την ανίχνευση της μικροβιακής αλλοίωσης. Η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) παρατηρεί τις δονήσεων των μορίων που διεγείρονται από μια υπέρυθρη ακτίνα, και το αποτέλεσμα της είναι ένα υπέρυθρο φάσμα απορρόφησης, το οποίο αντιπροσωπεύει ένα «δακτυλικό αποτύπωμα» που είναι χαρακτηριστικό κάθε χημικής ή βιοχημικής ουσίας (Ellis et al., 2002). Η διαφορά της από τη συμβατική φασματοσκοπία υπέρυθρων (IR) είναι ότι βασίζεται στην ιντερφερομετρία και κάνει χρήση του πλήρους φάσματος πηγής και όχι των μεμονωμένων μηκών κύματος (van de Voort 1992).

Με βάση το περιεχόμενο χημικών πληροφοριών, το εύρος μήκους κύματος μεταξύ 2.5 και 20 μm έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αυτή η περιοχή αναφέρεται ως μεσαίο υπέρυθρο. Σύμφωνα με την κβαντική μηχανική, το μόριο μπορεί να λάβει μια ποσότητα ενέργειας για να φτάσει στη πρώτη διεγερμένη δονητική κατάσταση. Ένα μόριο που ακτινοβολείται με συνεχές φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας μπορεί να απορροφήσει κβάντα φωτός τα οποία έχουν αυτήν την ενέργεια. Το φάσμα της υπολειπόμενης ακτινοβολίας εμφανίζει μια ζώνη απορρόφησης, σε μια συχνότητα (ν_s), που ανήκει στις σύνθετες δονητικές και περιστροφικές κινήσεις των μορίων. Οι δονήσεις αυτές είναι ορατές στο υπέρυθρο φάσμα. Διακρίνονται διαφορετικές μορφές δονήσεων, οι οποίες προκύπτουν από διαφορετικές ελκτικές δυνάμεις και γωνίες των ατόμων σε ένα μόριο. Έτσι, τα σύνθετα μόρια εμφανίζουν πολλές εσωτερικές δονήσεις.

Αυτές οι ζώνες δόνησης που μπορούν να συσχετιστούν με τους δεσμούς και τις λειτουργικές ομάδες ενός μορίου, εκφράζονται σε κυματαριθμούς (cm^{-1}). Οι λειτουργικές ομάδες των μορίων απορροφούν σε εύρος μεταξύ 4000 και 1500 cm^{-1} ενώ το εύρος κάτω των 1500 cm^{-1} είναι χαρακτηριστικό των δονήσεων παραμόρφωσης, κάμψης και δακτυλίου, το οποίο αναφέρεται ως “δακτυλικό αποτύπωμα” (Schmitt and Flemming 1998).

Ένα σύστημα FT-IR αποτελείται από τρία βασικά μέρη: μια πηγή ακτινοβολίας, ένα ιντερφερόμετρο και έναν ανιχνευτή. Το ιντερφερόμετρο διαιρεί τις ακτινοβολίες των ακτινών, δημιουργεί μια διαφορά οπτικών διαδρομών μεταξύ των ακτινών και δημιουργεί παρεμβάλλοντα σήματα τα οποία μετρούνται ως συνάρτηση της διαφοράς οπτικών διαδρομών από τον ανιχνευτή. Όπως υποδηλώνει το όνομά του, το ιντερφερόμετρο παράγει σήματα παρεμβολών, που περιέχουν υπέρυθρες φασματικές πληροφορίες που δημιουργούνται μετά από διέλευση μέσα από το δείγμα. Το ιντερφερόμετρο (π.χ. το ιντερφερόμετρο Michelson) χρησιμοποιεί ένα διαιρετή δέσμης (beamsplitter) για να διαχωρίσει την ακτινοβολία της πηγής σε δύο μέρη ανακλώμενα σε ένα σταθερό και ένα κινούμενο καθρέφτη, αντίστοιχα. Οι διακυμάνσεις της έντασης που παράγονται από το φαινόμενο παρεμβολών μετρούνται από τον ανιχνευτή, ψηφιοποιούνται σε πραγματικό χρόνο και καταλήγουν σε ένα ιντερφερόγραμμα που περιέχει όλες τις φασματικές πληροφορίες που σχετίζονται με το δείγμα. Για να ληφθούν ερμηνεύσιμες πληροφορίες, το ψηφιακό ιντερφερόγραμμα μετατρέπεται σε συμβατικό φάσμα εκπομπής IR, με τη βοήθεια του υπολογιστή από τεχνικές μετασχηματισμού κατά Fourier με μαθηματικούς αλγορίθμους (van de Voort, 1992, Schmitt & Flemming 1998).

Κλείνοντας, η φασματοσκοπία FT-IR, σε συνδυασμό με κατάλληλες μεθόδους μηχανικής εκμάθησης και σε συνδυασμό με τη τεχνολογία ATR (Attenuated Total Reflectance) ως αναλυτικό εργαλείο, παρουσιάζεται ως νέα μέθοδος για τη ποσοτική ανίχνευση αλλοίωσης των τροφίμων. Με τη χρήση του FT-IR, μπορεί να αποκτηθεί μεταβολικό στιγμιότυπο και να ποσοτικοποιηθεί, μη επεμβατικά, το μικροβιακό φορτίο, με ακρίβεια και ταχύτητα, απευθείας από την επιφάνεια του δείγματος (Ellis et al., 2002).

1.5.3 Ηλεκτρονική μύτη (e-nose)

Οι ηλεκτρονικές μύτες είναι όργανα που περιλαμβάνουν μία σειρά ηλεκτροχημικών αισθητήρων με μερική εξειδίκευση σε συνδυασμό με ένα κατάλληλο σύστημα αναγνώρισης που επιτρέπει την αναγνώριση απλών ή πολύπλοκων οσμών (Gardner and Bartlett 1994). Για

να ταξινομήσει τα δείγματα, μια ηλεκτρονική μύτη συνδυάζει τα προφίλ απόκρισης των διάφορων αισθητήρων, που αντιδρούν σε διαφορετικούς τύπους πτητικών ενώσεων στο αέριο δείγμα. Το λογισμικό ανάλυσης δεδομένων της ηλεκτρονικής μύτης, αναλύει το σήμα με στατιστικές μεθόδους αναγνώρισης προτύπων, όπως η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (Discriminant Factorial Analysis, DFA) και Ανάλυση Συστάδων (Cluster Analysis), καθώς και Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks), Μηχανές Υποστήριξης Διανυσμάτων (Support Vector Machines), Τυχαία Δάση (Random Forest) (Pavón et al., 2006, Peris and Escuder-Gilabert 2009, Tian et al., 2013). Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις είναι απαραίτητο ένα αισθητήριο πάνελ για τον καθορισμό της επιθυμητής ποιότητας του προϊόντος, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την εκπαίδευση του συστήματος ηλεκτρονικής μύτης (Schaller, Bosset, and Escher 1998). Το δείγμα θερμοστατείται σε ειδικό σφραγισμένο φιαλίδιο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε τα πτητικά συστατικά να διαχυθούν στο διάκενο χώρο (headspace). Τα πτητικά λαμβάνονται με ειδική σύριγγα από την υπερκείμενη αέρια φάση και εισάγονται στην ηλεκτρονική μύτη. Η ανταπόκριση των αισθητήρων στις πτητικές ενώσεις μεταφράζεται ως αλλαγή των ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων, με αποτέλεσμα τη παραγωγή ενός σήματος από κάθε αισθητήρα. Έτσι σχηματίζεται ένα πτητικό «δακτυλικό αποτύπωμα» για το δείγμα, από το συνδυασμένο μοτίβο των αλλαγών-σημάτων όλων των αισθητήρων (Creed 2010).

Έχουν ποικίλες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, όπως (i) παρακολούθηση διεργασιών, (ii) προσδιορισμό της διάρκειας ζωής, (iii) αξιολόγηση αλλοίωσης, (iv) αξιολόγηση της αυθεντικότητας και (v) ποιοτικό έλεγχο (Peris and Escuder-Gilabert 2009b). Μερικές εφαρμογές της ηλεκτρονικής μύτης έχουν αναφερθεί για την αξιολόγηση της ποιότητας του κρέατος πουλερικών. Οι Arnold και Senter (1998) μελέτησαν βακτηριακά είδη που απομονώθηκαν από επεξεργασμένα πουλερικά, οι Siegmund και Pfannhauser (1999) ανίχνευσαν αλλαγές στο πτητικό κλάσμα μαγειρεμένου κρέατος κοτόπουλου κατά τη διάρκεια ψύξης, και οι Boothe και Arnold (2002) έδειξαν ότι μία ηλεκτρονική μύτη είναι σε θέση να ανιχνεύσει αλλαγές στα δείγματα κρέατος κοτόπουλου λόγω του χρόνου αποθήκευσης και της θερμοκρασίας.

1.6 Σκοπός μελέτης

Η συγκεκριμένη διπλωματική, πειραματική μελέτη έχει ως στόχο την έγκαιρη ανίχνευση της αλλοίωσης κρέατος κοτόπουλου υπο αερόβιες συνθήκες, με απώτερο σκοπό τη συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων, από πειράματα αλλοίωσης σε σουβλάκι από μαριναρισμένο μπούτι κοτόπουλου, με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις σύγχρονες μεθόδους της πολυφασματικής απεικόνισης και της ηλεκτρονικής μύτης. Επιπρόσθετα, γίνεται αξιοποίηση των δεδομένων που προκύπτουν από τις συμβατικές μικροβιολογικές αναλύσεις, για την ανάπτυξη και την ερμηνεία πρωτογενών και δευτερογενών κινητικών μοντέλων ανάπτυξης της μικροχλωρίδας του μαριναρισμένου προϊόντος κοτόπουλου.

2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Δείγματα από νωπό, μαριναρισμένο με αλάτι, οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, ένζυμο τρυφεροποίησης και ασκορβικό οξύ, σουβλάκι από μπούτι κοτόπουλου, άνευ κόκκαλων και δέρματος, προμηθεύτηκαν από τη KOTINO A.E.B.E, συσκευάστηκαν (αερόβιες συνθήκες) ανά δύο σε δίσκο πολυστυρενίου με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου οικιακής χρήσης διαπερατή στο O₂, κάτω από ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε θαλάμους συντήρησης (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan), σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10 °C, καθώς και σε θάλαμο με δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ελεγχόταν με τη χρήση ηλεκτρονικών καταγραφικών (COX TRACER®, Cox Technologies Inc., Belmont, NC, USA), τα οποία είχαν τοποθετηθεί στο εσωτερικό των θαλάμων συντήρησης. Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (Πίνακας 2.1), γινόταν λήψη δύο δειγμάτων από κάθε θερμοκρασία, έτσι ώστε να μελετηθεί το μικροβιακό φορτίο τους με τις κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους καθώς και με τις σύγχρονες, γρήγορες μεθόδους φασματοσκοπικής ανάλυσης και πιο συγκεκριμένα, της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI), χρησιμοποιώντας το σύστημα VideometerLab και της ηλεκτρονικής μύτης (e-nose).

Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα αλλοίωσης (n=4), για τις θερμοκρασίες 0, 5 και 10 °C, διάρκειας 13^{ov} ημερών, και ένα πείραμα αλλοίωσης για το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (n=3), διάρκειας 13^{ov} ημερών. Το πρόγραμμα δειγματοληψιών παρατίθεται στον Πίνακα 2.1. Για το πείραμα αλλοίωσης στις σταθερές θερμοκρασίες συντήρησης, πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις και γινόταν κάθε φορά δειγματοληψία από δύο δείγματα κοτόπουλου, σε κάθε θερμοκρασία και χρόνο. Για το πείραμα αλλοίωσης στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας, πραγματοποιήθηκε μία επανάληψη και γινόταν κάθε φορά δειγματοληψία από τρία δείγματα κοτόπουλου. Συνεπώς κάθε σημείο (x) στο Πίνακα 2.1 αναφέρεται σε δύο δείγματα, ενώ κάθε σημείο (■) σε τρία δείγματα. Στο χρόνο μηδέν πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω αναλύσεις σε δύο και τρία τυχαία δείγματα για τις σταθερές θερμοκρασίες και το δυναμικό προφίλ αντίστοιχα.

Χρόνος (h)	Θερμοκρασία Συντήρησης			
	0°C	5°C	10°C	Δυναμικό
0		x		■
18		x	x	
24	x	x	x	■
42			x	
48	x	x	x	■
72	x	x	x	■
96	x	x	x	■
120	x	x	x	■
144	x	x	x	■
168	x	x	x	■

192	×	×	×	■	Πίνακας 2.1: Πρόγραμμα δειγματοληψιών για τις ισόθερμες συνθήκες και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας.
216	×	×		■	
240	×	×			
288	×				
312	×			■	

ματοληψιών για τις ισόθερμες συνθήκες και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας.

2.2 Πειραματική διαδικασία

Προτού γίνει η έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, παρασκευάστηκαν τα υλικά και τα υποστρώματα για τις μικροβιολογικές αναλύσεις. Αρχικά, παρασκευάστηκε το ισοτονικό διάλυμα Ringer (LAB108, LABM., U.K.), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση των δειγμάτων και για τις διαδοχικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες (9 ml). Έπειτα, για τη καταμέτρηση των μικροοργανισμών επιλέχθηκαν τα παρακάτω κατάλληλα θρεπτικά υλικά, βάσει της βιβλιογραφίας που υπάρχει για τους ενδογενείς πληθυσμούς μικροοργανισμών στο κοτόπουλο (Mead 1985, Mead 2004, Rouger et al. 2017), τα οποία και παρασκευάστηκαν και αποστειρώθηκαν με βάση τις οδηγίες που δόθηκαν από το κατασκευαστή:

- Plate Count Agar (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.L, Milan, Italy), το οποίο είναι γενικό θρεπτικό υπόστρωμα επίστρωσης για τη καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών. Μετά από τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιούταν στους 25 °C για 3 ημέρες.
- Pseudomonas Agar Base (LAB108, LAB M., U.K.), με τη προσθήκη του επιλεκτικού αντιβιοτικού Cetrimide-Fusidin-Cephaloridine (Modified C.F.C. X108, LABM, UK) το οποίο είναι επιλεκτικό υπόστρωμα επίστρωσης για την απαρίθμηση των *Pseudomonas* spp. Οι σχηματιζόμενες αποικίες των ψευδομονάδων είναι ωχρές-κίτρινες και έχουν στρογγυλό και λείο σχήμα. Μετά τον εμβολιασμό, η επώαση των τρυβλίων γινόταν στο 25 °C για 2 ημέρες.

- Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Italiana, S.r.L, Milan, Italy), το οποίο είναι ένα υπόστρωμα ενσωμάτωσης για την απαρίθμηση των βακτηρίων του γένους Enterobacteriaceae. Οι αποικίες των εντεροβακτηρίων έχουν χρώση ρόζ-βιολετί. Πετά την ενσωμάτωση η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 37 °C για 24 ώρες.
- MRS Agar ISO Formulation (Biolife, Italiana, S.r.L, Milan, Italy), ένα υπόστρωμα ενσωμάτωσης για την καταμέτρηση των γαλακτικών βακτηρίων (LAB). Η επώαση γινόταν στους 30 °C για 72 ώρες.
- Columbia Agar Base (NCM0038A, NEOGEN® Culture Media, USA, Canada), το οποίο είναι ένα υπόστρωμα επίστρωσης για τη καταμέτρηση των Campylobacter. Η επώαση γινόταν στους 37 °C για 24 ώρες.

Κατά την επιφανειακή επίστρωση, στα τρυβλία με τα αποστειρωμένα υποστρώματα PCA, CFC, TBX και Columbia, το εμβόλιο ήταν 0.1ml αραιωμένου δείγματος, ενώ στα υποστρώματα ενσωμάτωσης MRS και VRBGA ο εμβολιασμός γινόταν με 1ml αραιωμένου δείγματος.

2.2.1 Μικροβιολογική ανάλυση

Κατά τη μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων, μετά τη παραλαβή τους από τους θαλάμους συντήρησης, παραλαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας και νυστεριού 25 g και τοποθετούταν σε σακούλα ομογενοποίησης (BagLigth, INTERSCIENCE, France). Έπειτα τοποθετούταν στη σακούλα 225 ml διαλύματος Ringer (LAB108, LABM., U.K.) για την αραιώση του δείγματος και ακολουθούσε η ομογενοποίηση του με τη χρήση της συσκευής Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για ένα λεπτό. Από το σχηματιζόμενο διάλυμα μεταφερόταν ποσότητα 1ml, με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας, σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 ml διαλύματος Ringer και στη συνέχεια γινόταν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις.

Κατόπιν, γινόταν ο εμβολιασμός των θρεπτικών υποστρωμάτων. Στα υποστρώματα επιφανειακής επίστρωσης, PCA, CFC, Columbia και TBX, μεταφερόταν όγκος εμβολίου 0.1 ml, με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας, από τους δοκιμαστικούς σωλήνες από τη πιο αραιή στη πιο πυκνή αραιώση, υπο ασηπτικές συνθήκες και στη συνέχεια με τη χρήση αποστειρωμένου τριγώνου απλωνόταν το εμβόλιο ομοιόμορφα στο κάθε τρυβλίο. Για τα θρεπτικά υποστρώματα ενσωμάτωσης, τα οποία διατηρούταν σε υγρή μορφή με τη βοήθεια του

υδατόλουτρου, τα οποία ήταν το VRBGA και το MRS, μεταφερόταν όγκος εμβολίου 1 ml σε κενό τρυβλίο και έπειτα προστίθεντο δύο επιστρώσεις από το αντίστοιχο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό, με μία μικρή διαφορά χρόνου, ώστε να στεγνώσει η πρώτη στρώση. Μετά το πέρας των εμβολιασμών, τα εμβολιασμένα τρυβλία επωαζόταν στους κλιβάνους, για ανάλογο χρονικό διάστημα και σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας που απαιτεί το κάθε υπόστρωμα. Αφού περνούσε το κατάλληλο χρονικό διάστημα, γινόταν η παρατήρηση και η καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε τρυβλίο και κατόπιν η κατασκευή των λογαριθμικών διαγραμμάτων ανάπτυξής τους, με τη χρήση των μέσων όρων των log cfu/g και τις τυπικές αποκλίσεις των δύο επαναλήψεων για τα δύο δείγματα, ώστε τελικά να προσδιοριστεί το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού. Τέλος έγινε η κατασκευή των μαθηματικών μοντέλων.

2.2.2 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (MultiSpectral Imaging, MSI)

Για την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι το σύστημα VideometerLab της Videometer A/S (Carstensen and Hensen, 2003), το οποίο μας παρέχει πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος μεταξύ της UV (405 nm) και του NIR (970 nm) καταγράφοντας τις αντανάκλασεις της επιφάνειας με μια τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (charge coupled device chip, CCD chip). Ένα δείγμα κρέατος κοτόπουλου τοποθετήθηκε μέσα σε μια σφαίρα Ulbricht, (βαμμένη λευκή στο εσωτερικό ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιογενής διάχυση και ανάκλαση του φωτός), πάνω στην οποία είναι τοποθετημένη μια κάμερα τύπου Point Grey Scorpion, η οποία και περιέχει την CCD. Στο χείλος της σφαίρας, είναι τοποθετημένες και διανεμημένες ομοιόμορφα και περιμετρικά, δίοδοι εκπομπής φωτός (lightemitting diodes, LEDs), οι οποίες παρέχουν φωτισμό στα ακόλουθα μήκη κύματος: 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm (Carstensen and Hensen, 2003). Τα LED ανάβουν διαδοχικά και η αντανάκλαση από το συγκεκριμένο μήκος κύματος καταγράφεται από τη κάμερα και δίνει μια μονοχρωματική εικόνα με ακρίβεια 32-bit για κάθε τύπο LED, καταλήγοντας στο τέλος σε έναν υπερφασματικό κύβο διαστάσεων 1280 × 960 × 18 (Efsthios Z. Panagou et al. 2014).

Πριν από τη χρήση του συστήματος VideometerLab είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση του ραδιομετρικά και γεωμετρικά (light set up), με στόχο τη προετοιμασία των διοδίων εκπομπής φωτός με βάση τον τύπο του αντικείμενου προς απεικόνιση (Folm-Hansen 1999). Πιο συγκεκριμένα κατά τη πρώτη χρήση του VideometerLab για το συγκεκριμένο αντικείμενο

δημιουργείται ένα αρχείο με τη πρώτη απεικόνιση του αντικειμένου (διαδικασία autolight), το οποίο κατά το light set up ανακαλείται. Αφού γίνει το light set up, ακολουθεί η βαθμονόμηση με απόλυτη ανάκλαση, όπου χρησιμοποιείται μία ανοιχτόχρωμη και μία σκούρα πλάκα αναφοράς και η γεωμετρική του ευθυγράμμιση με μία διάστικτη πλάκα. Το ομοιογενές διάχυτο φως, σε συνδυασμό με τη βαθμονόμηση, εξασφαλίζει ένα βέλτιστο δυναμικό εύρος φωτός και ελαχιστοποιεί τα φαινόμενα σκίασης, κατοπτρικής αντανάκλασης κ.α. (Panagou et al. 2014, Folm-Hansen 1999).

Οι εικόνες περιλαμβάνουν πληροφορίες που δε σχετίζονται με την ανάλυση, όπως το τρυβλίο Petri και τα περίχωρά του, καθώς και το λίπος ή ο συνδετικός ιστός του κρέατος κοτόπουλου. Για να διασφαλιστεί ότι οι πληροφορίες αυτές θα παρεμβαίνουν στην ανάλυση, είναι αναγκαίο ένα βήμα προ επεξεργασίας, ώστε να επιτρέπεται η απομόνωση του τμήματος της εικόνας που περιέχει μόνο πληροφορίες του ιστού του κρέατος κοτόπουλου (main region of interest, ROI) (Tsakanikas, et al. 2015). Η προ επεξεργασία εφαρμόστηκε μεγιστοποιώντας την αντίθεση μεταξύ του δείγματος (ιστός κρέατος κοτόπουλου) και των άλλων μη σχετικών αντικειμένων, επιτρέποντας έτσι μία λειτουργία κατωφλίου (Daugaard et al. 2010). Αυτές οι διαδικασίες μετασχηματισμού και τμηματοποίησης εφαρμόστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα του VideometerLab (έκδοση 2.12.39), το οποίο ελέγχει τη λειτουργία του οργάνου. Η αρχή στην οποία βασίζεται το πρόγραμμα, είναι η κανονική διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminal Analysis, CDA), γνωστή και ως διακριτική ανάλυση ρου Fisher, η οποία χωρίζει τις εικόνες σε περιοχές ενδιαφέροντος παράγοντας τμηματοποιημένες εικόνες για τα δείγματα κρέατος, με το απομονωμένο τμήμα του ιστού ως τη κύρια περιοχή ενδιαφέροντος (ROI) η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή των φασματικών δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω στη στατιστική ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, η CDA εντοπίζει τον μεγαλύτερο δυνατό διαχωρισμό δύο ή περισσότερων κλασμάτων βάσει του αριθμού των ανεξάρτητων μεταβλητών (Εξίσωση 1), τις οποίες αποτελούν τα κλάσματα των εικονοστοιχείων (pixels) (Daugaard et al. 2010).

$$R(a) = \frac{a^T \Sigma_S a}{a^T \Sigma_N a} \quad \text{(Εξίσωση 1)} \quad \text{(Carstensen et al. 2013)}$$

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

Αφού γίνει αυτός ο διαχωρισμός, υπολογίζεται η μέση φασματική ανάκλαση για κάθε εικόνα σε κάθε μήκος κύματος, όπως αυτή προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των pixels της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI) ενώ παράλληλα υπολογίζεται και η τυπική

απόκλιση της έντασης των εικονοστοιχείων ανά μήκος κύματος. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τους παραπάνω υπολογισμούς είναι 18 μέσοι όροι ανάκλασης, 18 τυπικές αποκλίσεις και τα 18 αντίστοιχα μήκη κύματος (Estelles-Lopez et al. 2017), τα οποία χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή μοντέλων μηχανικής εκμάθησης.

2.2.3 Εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης

2.2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Σε συνέχεια της δειγματοληψίας για την μικροβιολογική ανάλυση, τοποθετούνταν 2g από το δείγμα σε αλουμινόχαρτο και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία κατάψυξης. Οι μετρήσεις, για τη συλλογή δεδομένων από την ηλεκτρονική μύτη, πραγματοποιηθήκαν στο τέλος όλων των μικροβιολογικών και φασματοσκοπικών αναλύσεων, ενώ τέσσερα (4) δείγματα από κάθε χρονικό σημείο για τα ισοθερμοκρασιακά προφίλ αναλύθηκαν με την ηλεκτρονική μύτη και τρία (3) δείγματα για το δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ.

2.2.3.2 Ηλεκτρονική μύτη ALPHA MOS

Ο προσδιορισμός του πτητικού προφίλ των δειγμάτων έγινε με την βοήθεια της ηλεκτρονικής μύτης Alpha-Fox 3000 (ALPHA MOS, Toulouse FR). Το όργανο αποτελείται από μια συσκευή εισόδου του δείγματος, μια συστοιχία αισθητήρων και ένα λογισμικό (Alpha Soft v.12) για την καταγραφή και ανάλυση των δεδομένων. Η συστοιχία αισθητήρων απαρτίζεται από 12 αισθητήρες από οξειδία μετάλλων, που χωρίζονται σε δύο θερμοκρασιακά ελεγχόμενους θαλάμους, με υψηλή θερμοκρασία και μηδενική υγρασία αλλά και μια γεννήτρια αέρα για την παραγωγή του φέροντος αερίου, που αποσκοπεί στον καθαρισμό των αισθητήρων. Η συστοιχία αισθητήρων αποτελείται από T, P και LY αισθητήρες και ανταποκρίνονται σε πολύ μεγάλη ποικιλία πτητικών οργανικών ενώσεων. Στον Πίνακα 2.4. αναγράφονται οι αισθητήρες που χρησιμοποιήθηκαν και η αντίστοιχη λειτουργία τους.

Πίνακας 2.2. Αισθητήρες ηλεκτρονικής μύτης FOX3000 (Xu et al. 2014).

<i>Αριθμός</i>	<i>Όνομα</i>	<i>Βασική εφαρμογή</i>
<i>SI</i>	LY2/LG	Οξειδωτικό αέριο

S2	LY2/G	Αμμωνία, μονοξείδιο του άνθρακα
S3	LY2/AA	Αιθανόλη
S4	LY2/GH	Αμμωνία/ οργανική αμίνη
S5	LY2/gCTL	Υδρόθειο
S6	LY2/gCT	Προπάνιο/ βουτάνιο
S7	T30/1	Οργανικοί διαλύτες
S8	P10/1	Υδρογονάνθρακες
S9	P10/2	Μεθάνιο
S10	P40/1	Φθόριο
S11	T70/2	Αρωματικές ενώσεις
S12	PA/2	Αιθανόλη, αμμωνία/ οργανική αμίνη

2.2.3.3 Συλλογή δεδομένων με την ανάλυση ηλεκτρονικής μύτης

Δείγματα από σουβλάκι μαριναρισμένου κοτόπουλου ($2g \pm 0.05g$) τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 20 ml τα οποία σφραγίστηκαν ερμητικά με καπάκια αλουμινίου, που είχαν διάφραγμα από πολυτετραφθοροαιθυλενίο (PTFE). Το δείγμα τοποθετήθηκε στο κάτω μέρος και καταλάμβανε περίπου το 1/5 του φιαλιδίου, έτσι ώστε να δημιουργείται αρκετό και σταθερό κενό ανάμεσα στο δείγμα και το καπάκι (headspace). Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους $4^{\circ}C$, για να αποκτήσουν ομοιόμορφη θερμοκρασία πριν την ανάλυση. Κάθε δείγμα θερμάνθηκε 20 λεπτά στους $50^{\circ}C$, έτσι ώστε να παραχθούν και να εξισορροπηθούν οι πτητικές ενώσεις του στο "headspace". Στη συνέχεια γίνεται η ένεση που διαπερνά το διάφραγμα το φιαλιδίου και λαμβάνεται όγκος 0.5 ml από τις πτητικές ενώσεις που συσσωρεύονται στο φιαλίδιο. Κατόπιν, το δείγμα εμβολιάζεται στην ηλεκτρονική μύτη.

Ανά τρεις ενέσεις δείγματος, εμβολιαζόταν μια ένεση με αέρα, που λειτουργούσε ως φέρον αέριο για τον καθαρισμό της συστοιχίας αισθητήρων. Το δείγμα μεταφέρθηκε στον ανιχνευτή με σταθερό ρυθμό εντός 120s, που κρίθηκε αρκετός για την σταθεροποίηση των τιμών. Η απόκριση του αισθητήρα ορίζεται ως η σχετική αλλαγή στην τιμή της αντίστασης $\Delta R/R$, που σημαίνει αλλαγή στην αντίσταση των αισθητήρων MOS σε σχέση με την αρχική τους τιμή (Upadhyay et al., 2017). Μετά την ολοκλήρωση κάθε μέτρησης, πραγματοποιείται διαδικασία αναμονής 500s έτσι ώστε να καθαριστεί ο θάλαμος του ανιχνευτή μέχρι να

διασφαλιστεί η ανάκτηση των αισθητήρων στην αρχική τους αντίσταση πριν ξεκινήσει η ανάλυση του επόμενου δείγματος (baseline resistance). Όταν συλλεχθούν τα δεδομένα από κάθε αισθητήρα της συστοιχίας, το σύστημα ηλεκτρονικής μύτης απαιτεί κατάλληλη επεξεργασία για την ανάλυση και κατηγοριοποίηση των δεδομένων.

2.3 Ανάλυση δεδομένων

2.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης- Πρωτογενή

μοντέλα

Σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα των πειραμάτων αλλοίωσης στο μαριναρισμένο σουβλάκι από μπούτι κοτόπουλου σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης, έγινε ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης της OMX, των *Pseudomonas* spp., των *Enterobacteriaceae*, των LAB, του E.coli, και των *Campylobacter*, με βάση το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) (**Εξίσωση 2**). Για την εφαρμογή του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα DMFit (Institute of Food Research, Reading, UK), το οποίο είναι διαθέσιμο στο www.combase.cc. Από το μοντέλο υπολογίστηκαν: η φάση προσαρμογής λ (lag phase), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης μ_{max} , ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός y_0 και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός y_{end} , και του συντελεστή συσχέτισης R^2 .

Εξίσωση 2: $y(t) = y_0 + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{e^{m\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{m(y_{end} - y_0)}}\right)$ (Baranyi and Roberts 1994)

Οπού: $A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max}t} + e^{-h_0} + e^{-\mu_{max}t - h_0})$ η παράμετρος καθυστέρησης,

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

2.3.2 Επίδραση θερμοκρασίας στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης- Δευτερογενή

μοντέλα

Στα πλαίσια του πειράματος διερευνήθηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης της OMX και των *Pseudomonas* spp. με τη χρήση του δευτερογενούς μοντέλου του Ratkowsky (1982) (**Εξίσωση 3**). Για τη χρήση του μοντέλου αξιοποιήθηκαν τα αποτελέσματα του μ_{max} , ξεχωριστά για κάθε επανάληψη και δείγμα, ώστε να προσδιοριστούν οι παράμετροι b και η ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης T_{min} (Ratkowsky et al. 1982, Ross and Dalgaard 2004). Ο προσδιορισμός των παραμέτρων υπολογίστηκε με τη βοήθεια του STATGRAPHICS, και επαληθεύτηκε με τη βοήθεια του Excel.

Εξίσωση 3: $\sqrt{\mu_{max}} = b * (T - T_{min})$ (Ratkowsky et al. 1982)

Οπού: μ_{max} = ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

b = παράμετρος, συντελεστής συσχέτισης-παλινδρόμησης,

T_{min} = ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης (°C)

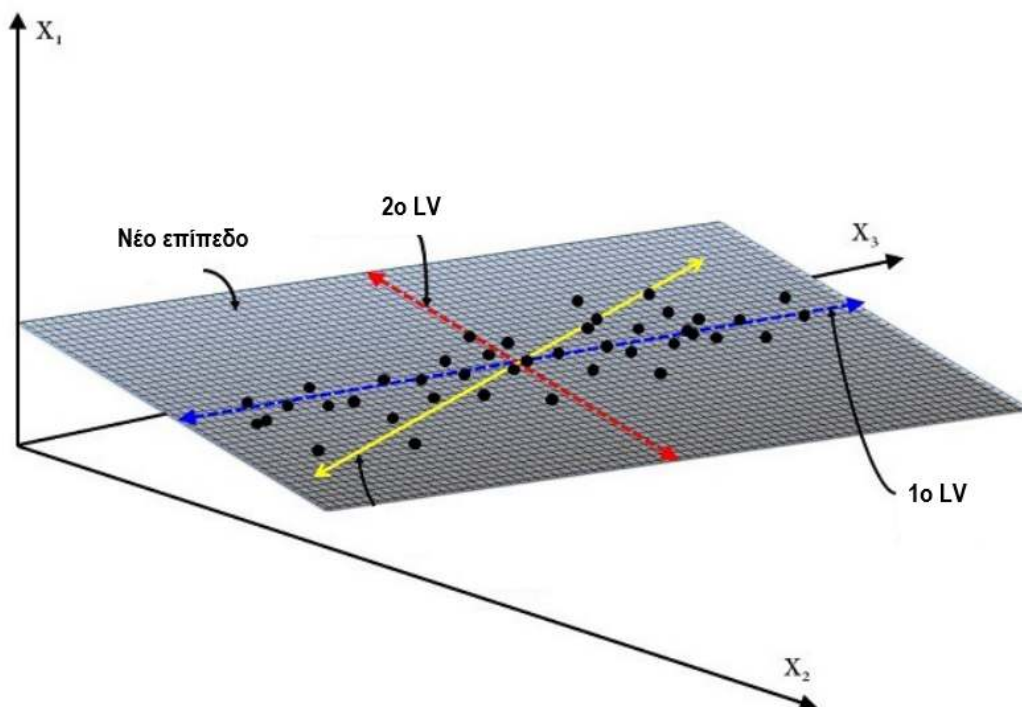
T = θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο κάθε μ_{max} (°C).

2.3.3 Γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial

Least Squares - Regression, PLS-R)

Η γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R), χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή μοντέλων για το ποσοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού της OMX των *Pseudomonas* spp. και των LAB. Η PLS-R είναι μία μέθοδος η οποία συσχετίζει τα δεδομένα από δύο σύνολα δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (εξαρτημένες μεταβλητές), με ένα γραμμικό πολυπαραγοντικό μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, και οι X και οι Y μήτρες αρχικά μετασχηματίζονται σε νέους χώρους με ορθογώνια διάταξη και τα ληφθέντα δεδομένα που ονομάζονται X -scores και Y -scores επιλέγονται και συσχετίζονται σε μια προσπάθεια μεγιστοποίησης της ερμηνείας των Y -scores από τα X -scores. Στη συνέχεια τα προβλεπόμενα Y -scores παράγουν τη πρόβλεψη του Y (Εικόνα 2.1). Ταυτόχρονα η PLS-R ορίζει έναν αριθμό κύριων συνιστωσών (Latent variables, LVs) για το νέο αυτό χώρο (Wold et al. 2001, Feng and Sun 2013, Panagou et al.

2014). Προκειμένου να προσδιοριστεί η σωστή πολυπλοκότητα του εμπειρικού μοντέλου και να ξεπεραστεί ο κίνδυνος του overfitting εξαιτίας των πολλών συσχετισμένων μεταβλητών X , η PLS-R δίνει τη δυνατότητα εκπαίδευσης του μοντέλου και της πρόβλεψης της σημαντικότητας κάθε παράγοντα, η οποία ονομάζεται διασταυρούμενη επικύρωση (Cross-validation). Η διασταυρούμενη επικύρωση λαμβάνει χώρα, χωρίζοντας τα δεδομένα σε ομάδες και έπειτα αναπτύσσοντας παράλληλα μοντέλα από τα λίγα πλέον δεδομένα που έμειναν με μία από τις ομάδες που διαγράφηκαν. Μετά από τη δημιουργία του μοντέλου καταμετρούνται οι διαφορές μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων Y , των οποίων το άθροισμα τετραγώνων δίνει μία εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου. Είναι απαραίτητη η επικύρωση κάθε μοντέλου πριν τη χρήση του για τη πρόβλεψη της μικροβιακής δραστηριότητας, με ανεξάρτητα και αντιπροσωπευτικά δείγματα. Ωστόσο, αν δεν υπάρχουν αυτά, υπάρχει η επιλογή της επανεκτίμησης του μοντέλου έπειτα από τυχαιοποίηση δεδομένων (Wold et al. 2001).



Εικόνα 2.1 Γεωμετρική απεικόνιση ενός μοντέλου PLS-R. Τα δεδομένα (μαύρες κουκκίδες) στον χώρο X προβάλλονται (ορθογώνια προβολή) στον υποχώρο που ορίζεται από τις δύο πρώτες λανθάνουσες μεταβλητές (LVs).

Η πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού, The Unscrambler© έκδ. 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway), οπού κατασκευάστηκαν μοντέλα ανάπτυξης της OMX, των *Pseudomonas* spp. και των LAB σε

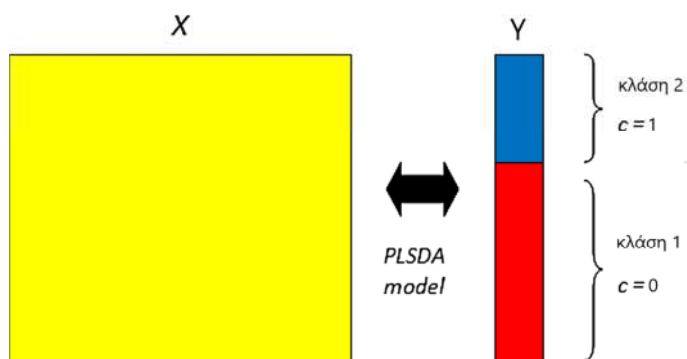
δείγματα μαριναρισμένου κρέατος από μπούτι κοτόπουλο σε αερόβιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα τα φασματοσκοπικά δεδομένα (18 Mean και 18 SD), που συλλέχθηκαν από το VideometerLab χρησιμοποιήθηκαν σαν ανεξάρτητες μεταβλητές (X), ενώ οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών (OMX, *Pseudomonas* spp. και LAB) σαν εξαρτημένες μεταβλητές (Y). Επίσης, μοντέλα για την OMX και τη *Pseudomonas* spp. κατασκευάστηκαν και με τη χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων από την e-nose (εντάσεις των 12 αισθητήρων), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν ανεξάρτητες μεταβλητές, ενώ οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών (OMX και *Pseudomonas* spp.) σαν εξαρτημένες μεταβλητές. Η PLS-R επιλέχθηκε γιατί είναι μια μέθοδος που μπορεί να αναλύσει δεδομένα με έντονα γραμμικές (συσχετισμένες), θορυβώδεις και πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές X, και ταυτόχρονα να μοντελοποιήσει αρκετές μεταβλητές απόκρισης-Y (εξαρτημένες) (Wold et al. 2001).

Για τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν με τη βοήθεια των φασματικών δεδομένων από την πολυφασματική απεικόνιση, τα δείγματα για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation) ήταν αυτά που συντηρήθηκαν στους 0, 5, και 10 °C και από τις δυο επαναλήψεις (n=136), ενώ για τη πρόβλεψη χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα από το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (n=33). Επίσης ως X ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα δεδομένα των μέσων όρων και τυπικών αποκλίσεων από τα 18 φάσματα (n=36), αφού πρώτα μετασχηματίστηκαν με το μετασχηματισμό τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV). Ο μετασχηματισμός αυτός μειώνει το 'θόρυβο' και ελαχιστοποιεί την αλληλεπικάλυψη των πληροφοριών μεταξύ των φασμάτων, τα οποία προκύπτουν από τη φυσική δομή των δειγμάτων (Feng and Sun 2013, Panagou et al. 2014).

Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από την εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης, χρησιμοποιήθηκαν επίσης για τη κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης της OMX και των *Pseudomonas* spp. πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation) ήταν αυτά που συντηρήθηκαν στους 0, 5, και 10 °C και από τις δυο επαναλήψεις (n=83), ενώ για τη πρόβλεψη χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα από το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (n=33). Ακόμη, ως X ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα δεδομένα των 12 αισθητήρων (n=12), αφού πρώτα μετασχηματίστηκαν με το μετασχηματισμό τυπικής κανονικής μεταβλητής (SNV), ο οποίος δίνει καλύτερα αποτελέσματα όπως προαναφέρθηκε (Feng and Sun 2013, Panagou et al. 2014).

2.3.4 Διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (Partial Least Square: Discriminant Analysis, PLS:DA)

Για το ποιοτικό χαρακτηρισμό των μαριναρισμένων δειγμάτων από μπούτι κοτόπουλο σε αερόβιες συνθήκες, κατασκευάστηκαν μοντέλα με τη βοήθεια της διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Η PLS-DA, είναι μια χημειομετρική τεχνική, που χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού διαφορετικών συνόλων δειγμάτων σε κλάσεις και μπορεί να χειριστεί πολλαπλές εξαρτημένες κατηγορικές μεταβλητές. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος είναι μια επέκταση της PLS-R, που προσδιορίζει ένα καινούριο γραμμικό υποχώρο για τις ανεξάρτητες X και τις εξαρτημένες Y μεταβλητές και προβλέπει τα Y βάσει ενός μειωμένου αριθμού κύριων λανθάνουσων συνιστωσών (LVs) στο νέο χώρο των X μεταβλητών (Gromski et al. 2014, 2015, Brereton and Lloyd 2014). Για παράδειγμα, εάν λάβουμε υπόψη τη διαίρεση των δειγμάτων σε δυο διαφορετικές κλάσεις, τότε η μεταβλητή Y θα αντιστοιχεί σε ένα άλλο ενιαίο διάνυσμα στη μήτρα, έπειτα από χρήση δυαδικής κωδικοποίησης, το οποίο θα έχει καταχώρηση 0 για όλα τα δείγματα της πρώτης κατηγορίας και καταχώρηση 1 για όλα τα δείγματα της δεύτερης κατηγορίας (ή αντίστροφα) όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2 (Gromski et al. 2015).



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση μοντέλου PLS-DA, για δύο κλάσεις (τροποποίηση από Brereton and Lloyd 2014)

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης, επιλέχθηκαν δύο κλάσεις για το διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση το μικροβιολογικό τους φορτίο όσο αφορά στην OMX. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα της 1^{ης} κλάσης ορίστηκαν ως φρέσκα-αποδεκτά με πληθυσμό OMX μικρότερο από 7 logCFU/g και τα δείγματα της 2^{ης} κλάσης ορίστηκαν ως αλλοιωμένα-μη αποδεκτά για πληθυσμό πάνω από 7 logCFU/g (Zhang et al. 2012, Höll et al. 2016). Η ανάλυση των δεδομένων που αποκτήθηκαν από το VideometerLab και από την E-nose, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού, The Unscrambler© έκδ.

9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway). Τα δεδομένα από τη πολυφασματική απεικόνιση (18 mean και 18 SD ανά δείγμα) και από την ηλεκτρονική μύτη (12 εντάσεις) χρησιμοποιήθηκαν αφού προ επεξεργάστηκαν αναλόγως.

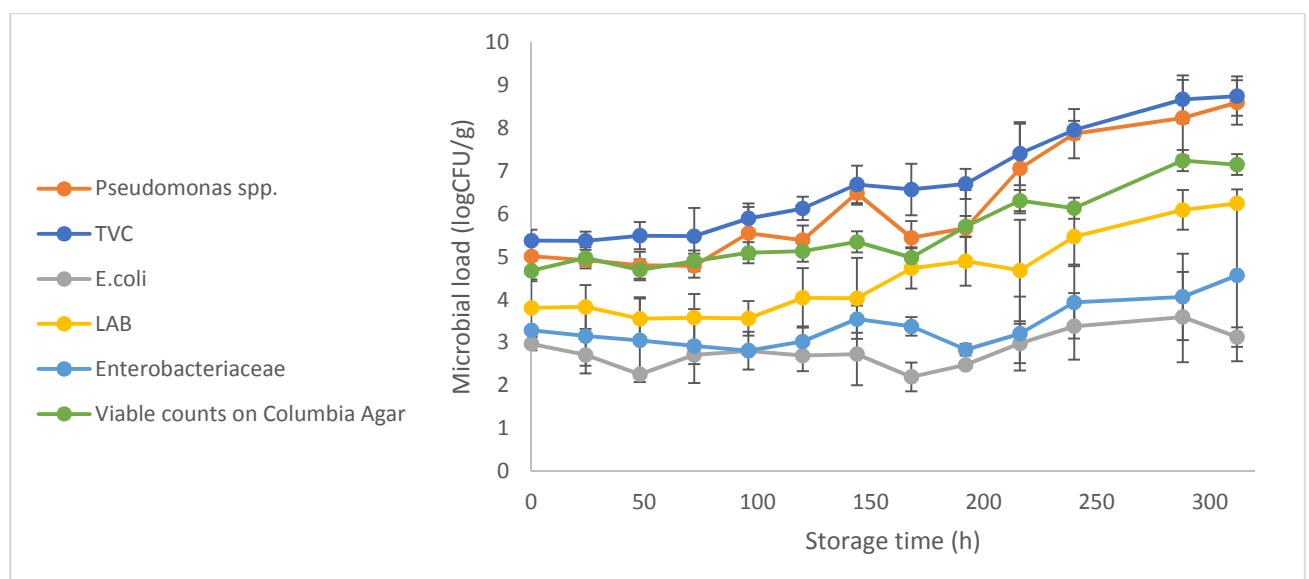
Πιο συγκεκριμένα, στη περίπτωση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης, για την ανάπτυξη (calibration) και την εσωτερική επικύρωση (cross-validation), τα δείγματα που αξιοποιήθηκαν ήταν αυτά που συντηρήθηκαν στους 0, 5, και 10 °C και από τις δυο επαναλήψεις (n=136), ενώ για τη πρόβλεψη του μοντέλου (prediction) χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα από το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας των τριών επαναλήψεων (n=33). Ακόμη, ως X μεταβλητές ορίστηκαν τα δεδομένα των 18 μέσων όρων και των 18 τυπικών αποκλίσεων (n=36), έπειτα από την εφαρμογή της τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV). Επίσης, ως μεταβλητές Y (n=2) ορίστηκαν οι δύο κλάσεις 1 και 2 του φρέσκου και αλλοιωμένου, αφού πρώτα μετατράπηκαν σε κατηγορικές και στη συνέχεια με βάση το δυαδικό σύστημα.

Για τη περίπτωση των δεδομένων που αποκτήθηκαν από την εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης, τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 0, 5, και 10 °C και από τις δυο επαναλήψεις (n=136) αξιοποιήθηκαν για την ανάπτυξη (calibration) και την εσωτερική επικύρωση (cross-validation), και τα δείγματα των τριών επαναλήψεων του δυναμικού προφίλ (n=33) χρησιμοποιήθηκαν για τη πρόβλεψη του μοντέλου (prediction). Επίσης, οι μεταβλητές X ήταν τα δεδομένα των αποκρίσεων των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης (n=12), αφού εφαρμόστηκε μετασχηματισμός τυπικής κανονικής μεταβλητής (SNV). Τέλος, οι Y μεταβλητές του μοντέλου, όπως και για τη περίπτωση της πολυφασματικής απεικόνισης, ήταν οι δύο κλάσεις 1 (φρέσκο) και 2 (αλλοιωμένο).

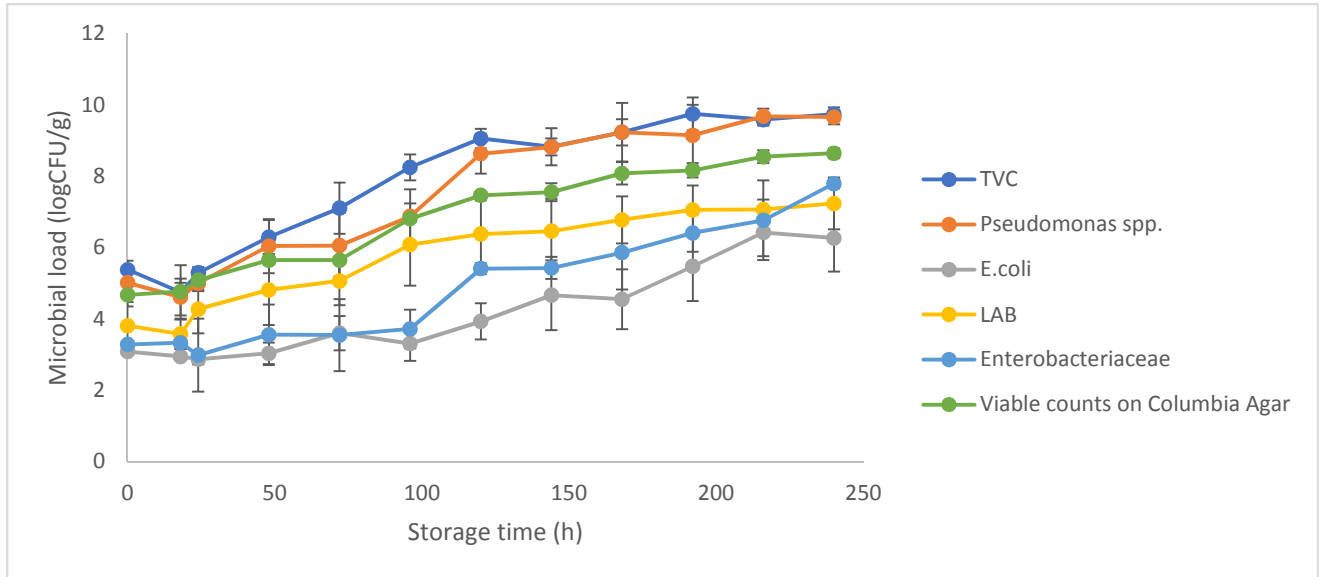
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων

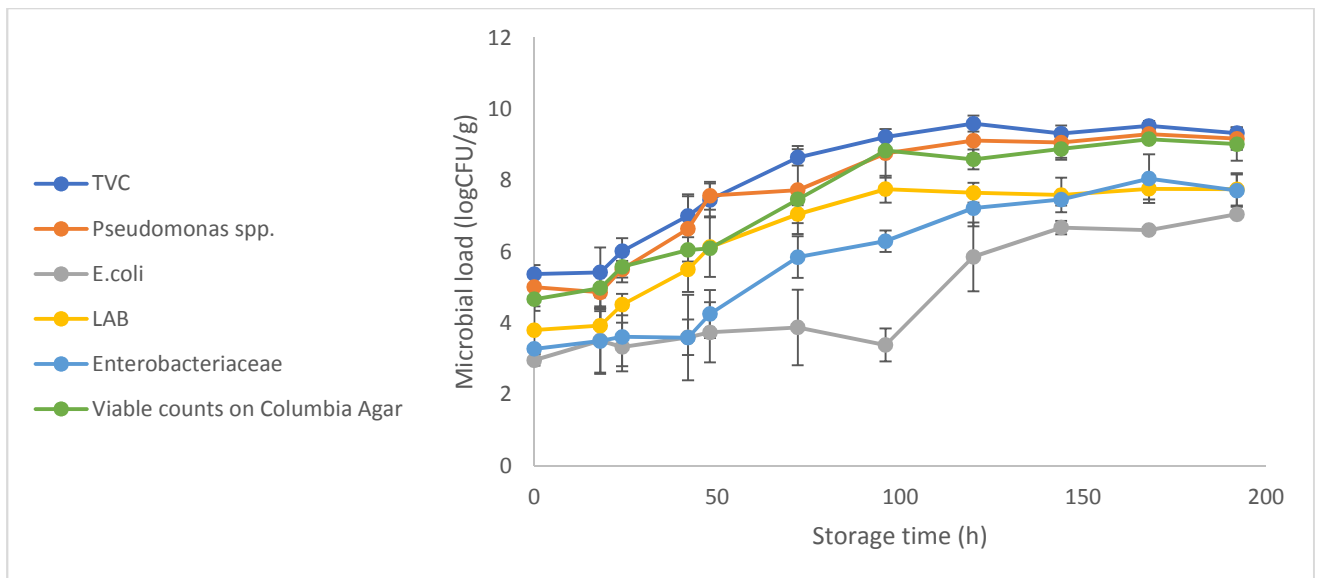
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στο μαριναρισμένο σουβλάκι από μπούτι κοτόπουλο, συντηρημένο υπο αερόβιες συνθήκες σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, έγινε με καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε αραιώση και αναγωγή στο αντίστοιχο αρχικό δείγμα. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η ανάπτυξη της OMX, των *Pseudomonas* spp., των *Enterobacteriaceae*, των LAB, του *E.coli*, και της χλωρίδας στο θρεπτικό υλικό Columbia Agar. Για τη κατασκευή των διαγραμμάτων ανάπτυξης των μικροοργανισμών στους 0, 5 και 10 °C, χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των λογαρίθμων και οι τυπικές αποκλίσεις και των δυο δειγμάτων από κάθε επανάληψη (n=4), ενώ για το δυναμικό προφίλ χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των λογαρίθμων και οι τυπικές αποκλίσεις των τριών δειγμάτων (n=3).



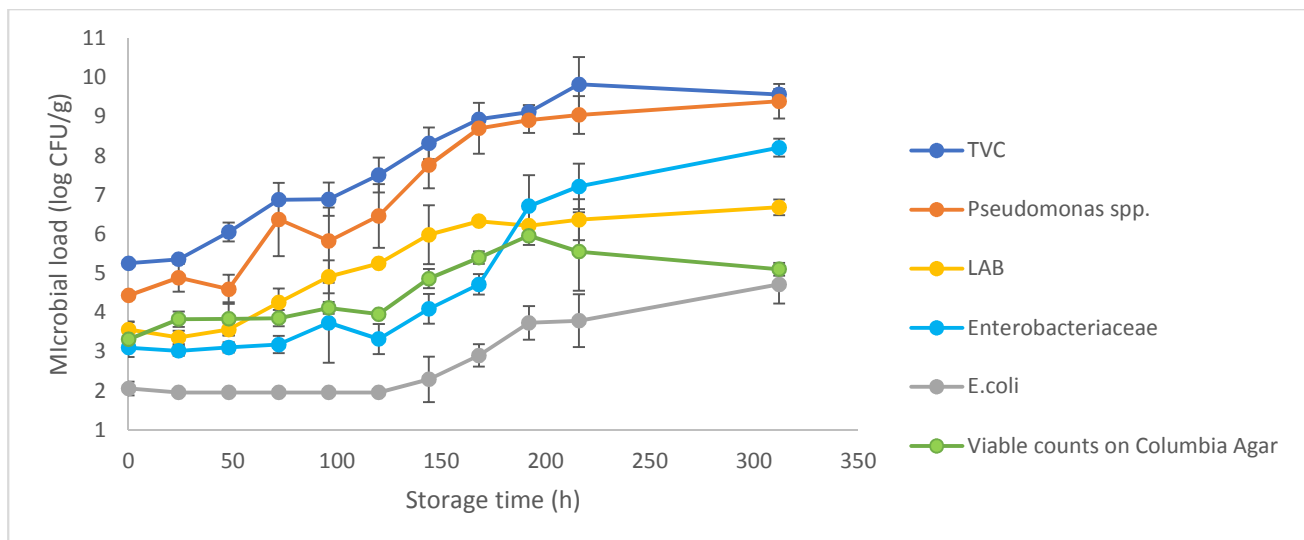
Διάγραμμα 3.1 : Καμπύλες ανάπτυξης για τη συντήρηση κρέατος κοτόπουλου στους 0 °C σε αερόβιες συνθήκες για τη OMX (TVC), τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp, LAB, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* και τη μικροβιακή χλωρίδα στο υπόστρωμα Columbia Agar.



Διάγραμμα 3.2 : Καμπύλες ανάπτυξης για τη συντήρηση κρέατος κοτόπουλου στους 5 οC σε αερόβιες συνθήκες για τη OMX (TVC), τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp, LAB, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* και τη μικροβιακή χλωρίδα στο υπόστρωμα Columbia Agar.



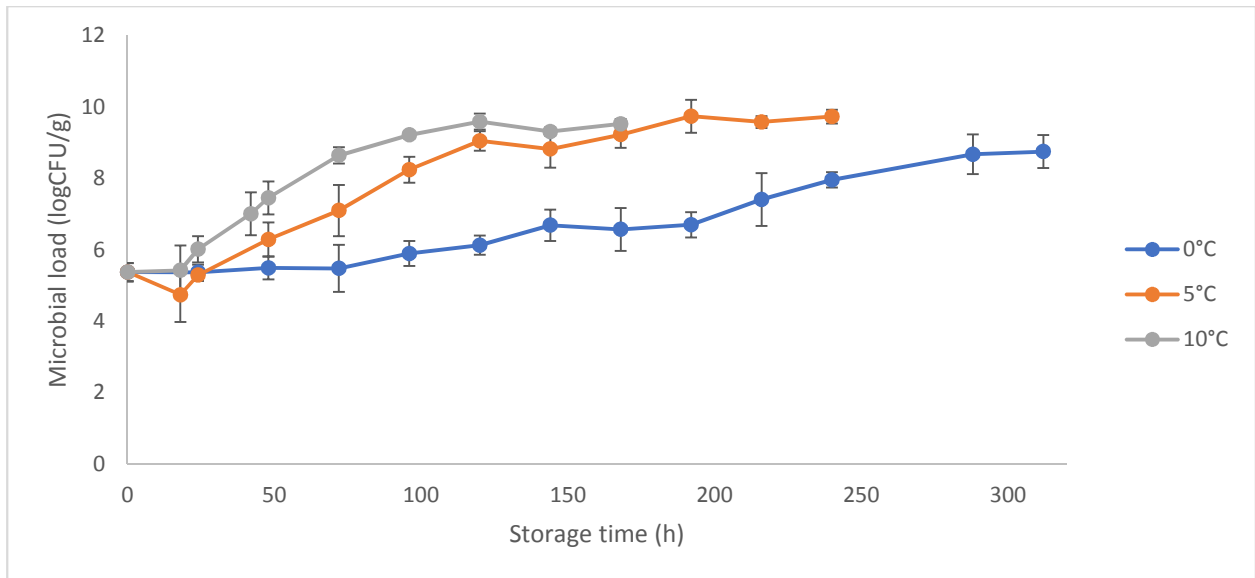
Διάγραμμα 3.3 : Καμπύλες ανάπτυξης για τη συντήρηση κρέατος κοτόπουλου στους 10 οC σε αερόβιες συνθήκες για τη OMX (TVC), τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp, LAB, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* και τη μικροβιακή χλωρίδα στο υπόστρωμα Columbia Agar.



Διάγραμμα 3.4 : Καμπύλες ανάπτυξης για τη συντήρηση κρέατος κοτόπουλου σε δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας, σε αερόβιες συνθήκες για τη OMX (TVC), τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp, LAB, Enterobacteriaceae, *E.coli* και τη μικροβιακή χλωρίδα στο υπόστρωμα Columbia Agar.

Από τα παραπάνω διαγράμματα ανάπτυξης φαίνεται ότι το επίπεδο της αρχικής OMX στις 0 ώρες ήταν στους 5.37 και 5.25 λογαριθμικούς κύκλους στα ισοθερμοκρασιακά και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας αντίστοιχα. Επίσης, μπορούμε να διακρίνουμε ότι για όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης, ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός είναι τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. (με αρχικό πληθυσμό 5.01 log CFU/g για τα ισοθερμοκρασιακά προφίλ και 4.43 log CFU/g για τις δυναμικές συνθήκες συντήρησης), αφού η ανάπτυξή τους καθ' όλο το διάστημα συντήρησης, ακολουθεί παρόμοια πορεία με αυτή της ανάπτυξης της OMX, κάτι το οποίο επαληθεύει την ως τώρα βιβλιογραφία, (Nychas et al. 2008, Dominguez and Schaffner 2007, Mohareb et al. 2015, Alexandrakis et al. 2012), ενώ ο τελικός πληθυσμός τους σχεδόν ταυτίζεται με αυτόν της OMX. Πιο συγκεκριμένα, ο τελικός πληθυσμός της OMX και των *Pseudomonas* spp. είναι αντίστοιχα 8.75 και 8.6 λογαρίθμους στους 0 °C, 9.73 και 9.65 λογαρίθμους στους 5 °C, 9.32 και 9.17 λογαρίθμους στους 10 °C και 9.56 και 9.39 λογαρίθμους στο δυναμικό προφίλ. Παράλληλα παρατηρείται ότι η καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής χλωρίδας στο Columbia Agar βρίσκεται ακριβώς κάτω από την καμπύλη ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp., και για τις τρεις ισόθερμες θερμοκρασίες, με αρχικό πληθυσμό στα 4.67 log CFU/g. Επιπλέον, η δεύτερη πληθυσμιακά μεγαλύτερη κατηγορία αλλοιογόνων μικροοργανισμών φαίνεται ότι ήταν τα γαλακτικά βακτήρια, με αρχικό

πληθυσμό 3.8 log CFU/g, τα οποία επωφελούνται από τη μαρινάδα (Nieminen et al. 2012, Lytu et al. 2016). Τα εντεροβακτήρια έρχονται αμέσως μετά, με αρχικό πληθυσμό 3.2 log CFU/g, τα οποία ακολουθεί η E.coli ξεκινώντας από τα 2.96 log CFU/g της οποίας η καμπύλη κινείται σχεδόν παράλληλα με αυτή των εντεροβακτηρίων.



Διάγραμμα 3.5 : Καμπύλες ανάπτυξης για τη συντήρηση κρέατος κοτόπουλου, σε αερόβιες συνθήκες για τη OMX, στους 0 °C στους 5 °C και τους 10 °C

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα ανάπτυξης για τις ισόθερμες θερμοκρασίες, διαπιστώνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στις καμπύλες κάθε μικροοργανισμού. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη όλων των ειδών των μικροοργανισμών. Η διαφορά του ρυθμού ανάπτυξης για την OMX σε κάθε θερμοκρασία φαίνεται καλύτερα στο διάγραμμα 3.5. (Στο Παράρτημα Α παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς). Παρατηρείται ότι όσο πιο μικρή είναι η θερμοκρασία συντήρησης, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος συντήρησης, καθώς στις μικρότερες θερμοκρασίες αναπτύσσονται πολύ αργά οι μικροοργανισμοί. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι στους 0 °C η OMX ξεπερνά τους 7 λογαριθμικούς κύκλους, στις 216 ώρες συντήρησης (7.41 log CFU/g), ενώ στους 5 °C τους ξεπερνά στις 72 ώρες (7.1 log CFU/g) και στους 10 °C στις 42 ώρες (7 log CFU/g), ενώ ο τελικός πληθυσμός της OMX στους 0 °C, τους 5 °C και τους 10 °C είναι 8.75 log CFU/g (302h συντήρησης), 9.73 log CFU/g (240h συντήρησης), 9.32 log CFU/g (192h συντήρησης), αντίστοιχα. Η τελική συγκέντρωση της OMX είναι μεγαλύτερη στους 5 °C από την αντίστοιχη στους 10°C, κάτι το οποίο συμβαίνει

λόγω της θανάτωσης των μικροοργανισμών εξαιτίας της κατανάλωσης όλου του θρεπτικού υποστρώματος, αφού στους 10 °C αυτή έχει ξεκινήσει (όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 3.2 και 3.3) από τις 120 ώρες αποθήκευσης, πολύ πιο νωρίς συγκριτικά με τους 5 °C, όπου φαίνεται να ξεκινάει στις 192 ώρες. Το ίδιο μοτίβο ακολουθεί και η ανάπτυξη των υπόλοιπων μικροοργανισμών των οποίων οι τελικοί πληθυσμοί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Συγκεντρωτικός πίνακας αρχικού και τελικού πληθυσμού για τη OMX (TVC), τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp, LAB, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* και τη μικροβιακή χλωρίδα στο υπόστρωμα Columbia Agar.

OMX		
T	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g)	Τελικός πληθυσμός (log CFU/g)
0	5.371	8.753
5	5.371	9.734
10	5.371	9.522
D	5.257	9.567
<i>Pseudomonas</i> spp.		
T	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g)	Τελικός πληθυσμός (log CFU/g)
0	5.010	8.601
5	5.010	9.652
10	5.010	9.295
D	4.435	9.391
LAB		
T	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g)	Τελικός πληθυσμός (log CFU/g)
0	3.801	6.202
5	3.801	7.232
10	3.801	7.761
D	3.566	6.686
<i>E. coli</i>		
T	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g)	Τελικός πληθυσμός (log CFU/g)
0	2.962	3.123
5	2.962	6.262
10	2.962	6.611
D	2.059	4.716
<i>Enterobacteriaceae</i>		
T	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g)	Τελικός πληθυσμός (log CFU/g)
0	3.283	4.562
5	3.283	7.794
10	3.283	8.052
D	3.103	8.207
Viable counts in Columbia Agar		
T	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g)	Τελικός πληθυσμός (log CFU/g)
0	4.672	7.154
5	4.672	8.643
10	4.672	9.156
D	3.317	5.103

Επιπρόσθετα σε όλα τα διαγράμματα ανάπτυξης παρατηρείται παρόμοια ανάπτυξη για όλους τους μικροοργανισμούς, με πολύ λίγες διαφοροποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων ξεπερνά τον πληθυσμό των LAB στις 240 ώρες συντήρησης στους 5 °C και στις 168 ώρες στους 10 °C (Διάγραμμα 3.2 και 3.3). Ακόμη, στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας, στο διάστημα των 168 με 192 ωρών συντήρησης, ο πληθυσμός των *Enterobacteriaceae* αυξάνεται κατά 2 λογαριθμικούς κύκλους ξεπερνώντας τον πληθυσμό των LAB. Πιθανώς η απότομη αυτή αύξηση να οφείλεται σε κάποια επιμόλυνση από το εξωτερικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας (Serraino et al. 2012).

Τέλος, παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις για την OMX, τα *Pseudomonas* spp., τα *Enterobacteriaceae*, τα LAB, το E.coli και τη μικροβιακή χλωρίδα στο Columbia Agar, γινόταν και εξέταση για το βακτήριο *Salmonella* στο θρεπτικό υπόστρωμα XLD. Ωστόσο, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά για όλες τις συνθήκες αποθήκευσης.

3.2 Αποτελέσματα πρωτογενών μοντέλων

Από την εφαρμογή των πρωτογενών κινητικών μοντέλων ανάπτυξης (Baranyi and Roberts 1994), για την OMX, την *Pseudomonas* spp., τα LAB, τα *Enterobacteriaceae*, το E.coli, και τη χλωρίδα στο θρεπτικό υλικό Columbia Agar, προέκυψαν οι κινητικές παράμετροι που φαίνονται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2). Στο Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται όλες οι κινητικές παράμετροι για τους παραπάνω μικροοργανισμούς στις θερμοκρασίες 0, 5, 10 °C, και στο δυναμικό προφίλ.

Πίνακας 3.2: Κινητικές παράμετροι ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε μαριναρισμένο σουβλάκι από μπούτι κοτόπουλου, κατά τη συντήρηση του υπο αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες 0 °C, 5 °C, 10 °C και σε δυναμικό προφίλ θερμοκρασιών, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο Baranyi και Roberts (1994).

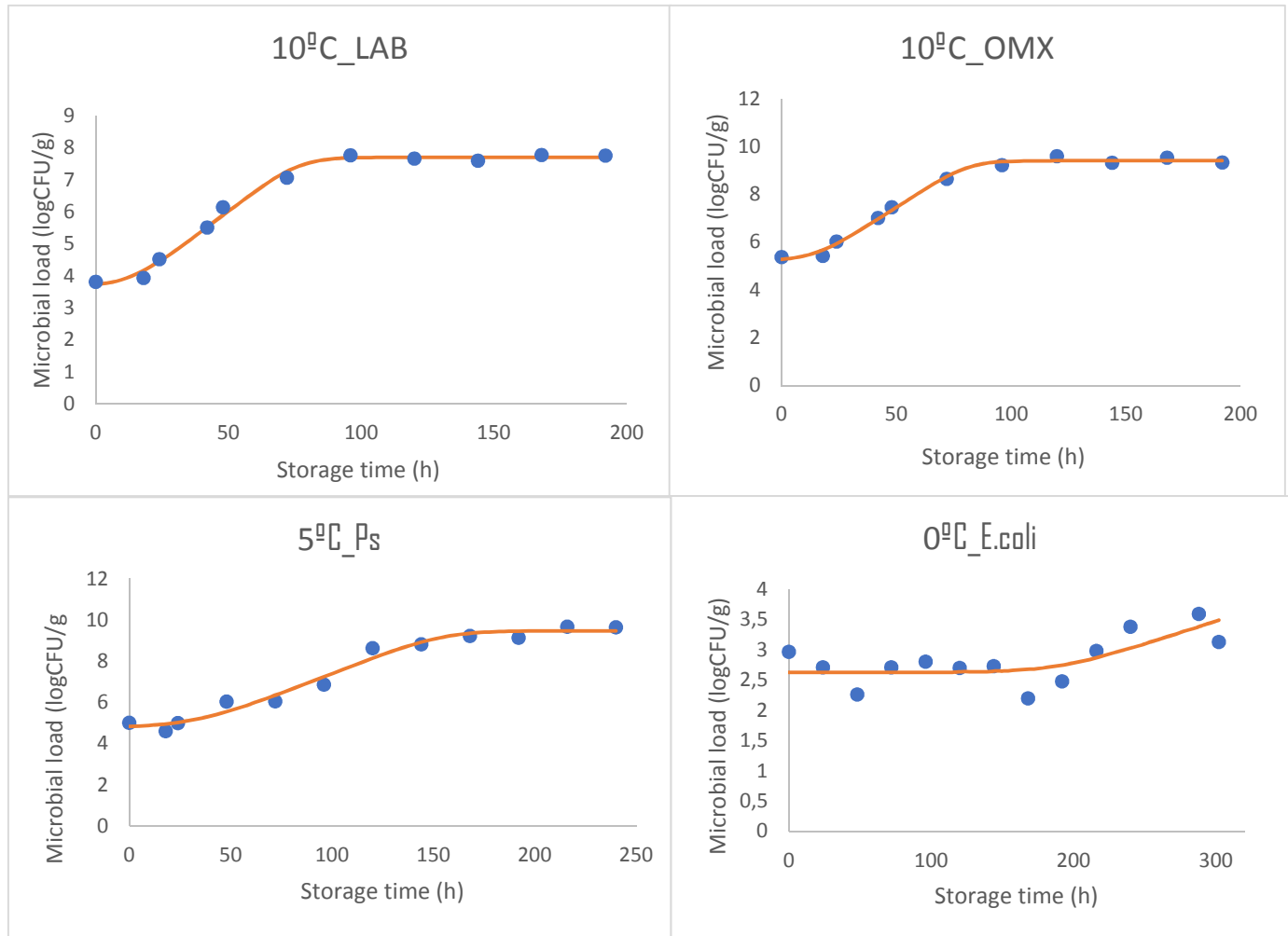
OMX						
T	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lag phase(h)	y_0 (log CFU/g)	y_{end} (log CFU/g)	R ²	RMSE (τυπικό σφάλμα) (log CFU/g)
0	0.0188	110.7	4.964	8.550	0.879	0.475
5	0.0458	26.5	5.029	9.449	0.967	0.344
10	0.0626	15.3	5.282	9.407	0.991	0.164
D	0.0248	19.2	5.209	9.708	0.98	0.231
<i>Pseudomonas</i> spp.						
T	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lag phase(h)	y_0 (log CFU/g)	y_{end} (log CFU/g)	R ²	RMSE (τυπικό σφάλμα)

0	0.0152	78.5	5.377	8.770	0.977	0.184
5	0.0386	33.5	4.828	9.474	0.967	0.362
10	0.0533	9.9	4.816	9.134	0.952	0.385
D	0.0311	42.9	4.546	9.311	0.942	0.456
LAB						
T	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lag phase(h)	$y_0(\text{log CFU/g})$	$y_{\text{end}}(\text{log CFU/g})$	R^2	RMSE (τυπικό σφάλμα)
0	0.0136	111.9	3.659	6.250	0.953	0.205
5	0.0233	4.8	3.656	7.050	0.964	0.254
10	0.0633	13.6	3.725	7.690	0.99	0.165
D	0.0265	45.1	3.415	6.430	0.982	0.173
E. coli						
T	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lag phase(h)	$y_0(\text{log CFU/g})$	$y_{\text{end}}(\text{log CFU/g})$	R^2	RMSE (τυπικό σφάλμα)
0	0.00765	189.5	2.630	3.490	0.426	0.303
5	0.0214	76.9	3.005	6.490	0.954	0.276
10	0.0312	60.2	3.337	7.450	0.871	0.568
D	0.0243	130.4	1.955	4.706	0.976	0.151
Enterobacteriaceae						
T	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lag phase(h)	$y_0(\text{log CFU/g})$	$y_{\text{end}}(\text{log CFU/g})$	R^2	RMSE (τυπικό σφάλμα)
0	0.0142	204.9	3.108	4.480	0.748	0.267
5	0.0244	56.7	3.166	7.640	0.96	0.326
10	0.047	28.7	3.286	7.759	0.974	0.309
D	0.026	87.4	3.009	8.840	0.898	0.607
Viable counts in Columbia Agar						
T	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lag phase(h)	$y_0(\text{log CFU/g})$	$y_{\text{end}}(\text{log CFU/g})$	R^2	RMSE (τυπικό σφάλμα)
0	0.0143	136.0	4.879	7.260	0.932	0.23
5	0.0234	11.2	4.624	8.530	0.976	0.233
10	0.0517	17.4	4.747	8.950	0.981	0.242
D	0.0356	115.2	3.773	5.528	0.868	0.318

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται ότι στους 0°C για όλους τους μικροοργανισμούς ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{\max}) είναι πολύ μικρότερος από αυτόν στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες, ενώ η φάση προσαρμογής (Lag phase) είναι τουλάχιστον κατά εκατό ώρες μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες στους 5 και 10 °C. Η μεγάλη φάση προσαρμογής και ο μικρός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά τη συντήρηση των δειγμάτων στους 0 °C, υποδηλώνουν τη μεγάλη παρεμπόδιση της ανάπτυξης όλων των μικροοργανισμών στους 0 °C, ενώ ακολούθησαν το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας και οι 5 °C. Από την άλλη πλευρά, οι τιμές της φάσης προσαρμογής ήταν χαμηλές ενώ του μ_{\max} ήταν αυξημένες, στα συντηρούμενα δείγματα στους 10 °C, κάτι το οποίο συμφωνεί και με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για τη θερμοκρασία αυτή (Διάγραμμα 3.3) και διαβεβαιώνει τη μη παρεμποδιστική δράση της θερμοκρασίας αυτής στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών

(Koutsoumanis et al. 2006, Lytou et al. 2016, Gospavic et al. 2008). Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, φαίνεται από το Πίνακα 3.2, ότι αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης, ενώ η Lag phase μειώνεται. Επίσης, παρατηρώντας το μέγιστο ειδικά ρυθμό ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp., φαίνεται ότι υπερτερεί των αντίστοιχων ρυθμών ανάπτυξης για τους άλλους μικροοργανισμούς σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης, με εξαίρεση τους 10 °C, όπου το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης τον κατέχουν τα γαλακτικά βακτήρια. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι για τα LAB και την χλωρίδα στο Columbia Agar, η φάση προσαρμογής δεν ακολουθεί το παραπάνω μοτίβο, αφού προέκυψε ότι είναι μικρότερη στους 5 °C από στους 10 °C. Πιο συγκεκριμένα για τα LAB η Lag phase είναι 4.864 και 13.686 ώρες στους 5 και στους 10 °C, ενώ η φάση προσαρμογής για τη χλωρίδα στο Columbia Agar είναι 11.256 και 17.491 ώρες για τους 5 και τους 10 °C αντίστοιχα. Ακόμη, πρέπει να επισημανθεί ότι κατά την εφαρμογή του μοντέλου το τυπικό σφάλμα παράμεινε αρκετά κάτω από τη μονάδα, με τη μεγαλύτερη τιμή να φτάνει το 0.607 για τα εντεροβακτήρια στο δυναμικό προφίλ, ενώ το R^2 παρέμεινε αρκετά κοντά στη μονάδα (έφτασε το 0.99 στη περίπτωση της OMX και των LAB στους 10 °C) για όλες τις συνθήκες και τους μικροοργανισμούς (πέρα από την E.coli στους 0 °C, όπου το R^2 είναι περίπου 0.4), πράγμα το οποίο υποδηλώνει τη καταλληλότητα του μοντέλου. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα προσαρμογής του πρωτογενούς μοντέλου στα πειραματικά μικροβιολογικά δεδομένα.

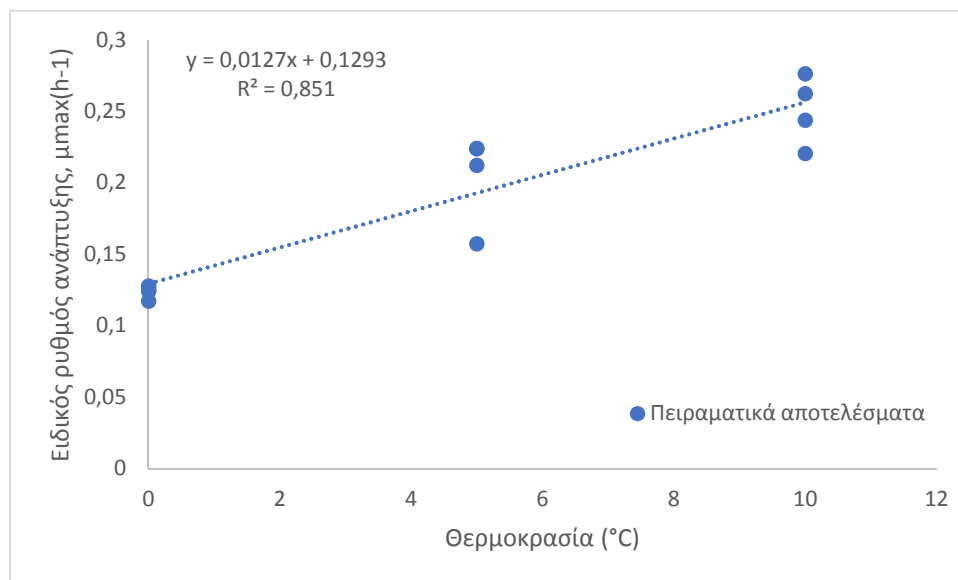
Διάγραμμα 3.6: Παραδείγματα προσαρμογής του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi και Roberts (1994) () στα πειραματικά δεδομένα () των LAB στους 10 °C (πάνω αριστερά) της OMX στους 10 °C (πάνω δεξιά), της E.coli στους 0 °C (κάτω αριστερά) και



της Pseudomonas spp. στους 5 °C (κάτω δεξιά).

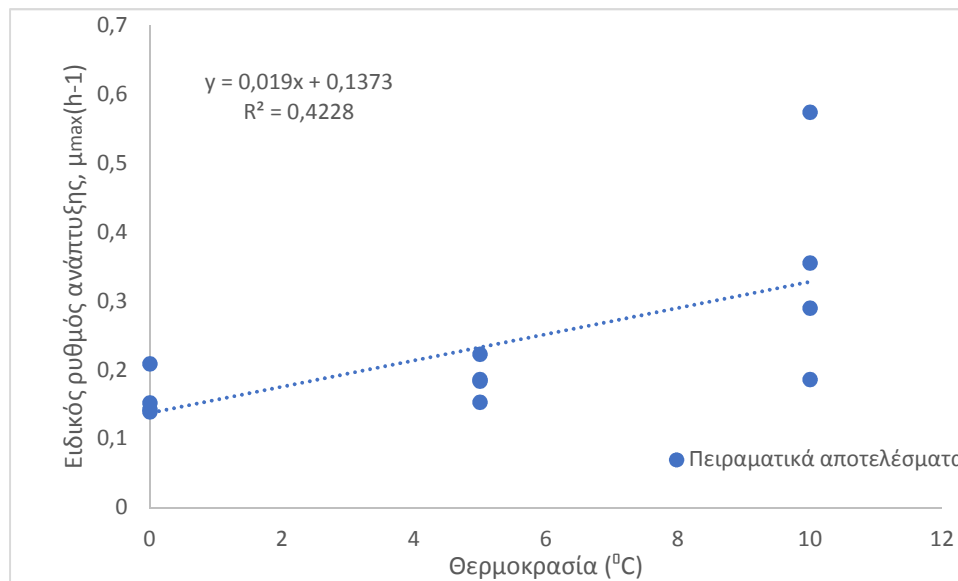
3.3 Αποτελέσματα δευτερογενών μοντέλων

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, όπως αναφέρθηκε και στο Υποκεφάλαιο 2.3.2, χρησιμοποιήθηκαν οι τετραγωνικές ρίζες του μ_{\max} ($n=12$, δύο δείγματα για δύο επαναλήψεις σε τρεις θερμοκρασίες) και με τη βοήθεια του δευτερογενούς μοντέλου του Ratkowsky (Ratkowsky et al. 1982) προσδιορίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων b και T_{\min} για την OMX και τα *Pseudomonas* spp. Ο προσδιορισμός έγινε με το πρόσθετο του Excel Ανάλυσης δεδομένων, αλλά και με το Statgraphics (Statgraphics 19® Centurion), για επιβεβαίωση, από όπου προέκυψε ότι οι τιμές ταυτίζονται πλήρως. Για την OMX, η παράμετρος $b=0.012705$ και η $T_{\min} = -10.1808$ °C με $R^2=0.851$ και $RMSE=0.0056$ log CFU/g αντίστοιχα, ενώ για τα *Pseudomonas* spp. η $b=0.019049$ και η $T_{\min} = -7.20792$ °C, με $R^2=0.4228$ και $RMSE = 0.09906$ log CFU/g αντίστοιχα. Από τα δευτερογενή μοντέλα, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα, που απεικονίζουν τη θερμοκρασία σε σχέση με τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{\max} (Διάγραμμα 3.7 και 3.8



αντίστοιχα).

Διάγραμμα 3.7: Επίδραση θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{\max} της OMX, σύμφωνα με την εξίσωση Ratkowsky.



Διάγραμμα 3.8: Επίδραση θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{\max} της *Pseudomonas* spp., σύμφωνα με την εξίσωση Ratkowsky.

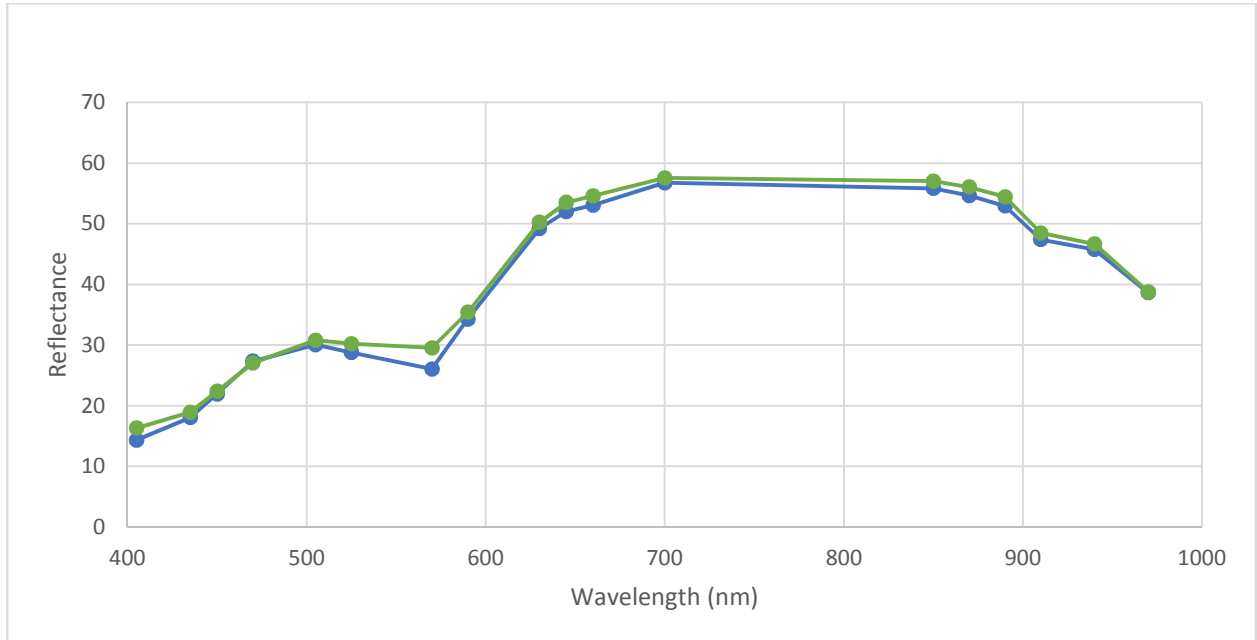
Από τα Διαγράμματα 3.7 και 3.8 είναι εμφανές ότι τα πειραματικά δεδομένα αποκλίνουν κατά πολύ από το δευτερογενές μοντέλο και για την OMX και για τα *Pseudomonas* spp., κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο αφού ο σκοπός του πειράματος ήταν η ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης για την εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος κοτόπουλου.

3.4 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

3.4.1 Αποτελέσματα δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης

Στο παρακάτω Διάγραμμα 3.9, απεικονίζονται τα φάσματα, στα 18 μήκη κύματος του Videometer-Lab, των φρέσκων και αλλοιωμένων δειγμάτων κατά τη συντήρησή τους υπο αερόβιες συνθήκες. Φαίνεται ότι η διαφοροποίηση του φρέσκου δείγματος κοτόπουλου από το αλλοιωμένο οφείλεται στις ουσίες που αντανακλούν στα μήκη κύματος 405 nm και από 525 ως 940. Οι διαφοροποιήσεις των ανακλάσεων στα 505, 570, 590, 630, 645, 660 και 700 nm, έχει προταθεί ότι οφείλονται στη μετατροπή και την υποβάθμιση των παραγώγων της μυοσφαιρίνης (οξυμυογλοβίνη, δεοξυμυογλοβίνη, μεταμυογλοβίνη), που καταλήγει σε σταδιακή αμαύρωση του ιστού του κρέατος (Efstathios Z. Panagou et al. 2014). Ακόμη, οι ενώσεις που αντιστοιχούν στα 940 και 890 σχετίζονται με το λίπος και αυτές που αντιστοιχούν στα 970 nm σχετίζονται με το νερό, ενώ αυτές στα 910 και 940 nm με τις

πρωτεΐνες και την οξείδωση αντίστοιχα. (Barlocco et al. 2006, Dissing, 2011, Elmasry et al. 2012)



Διάγραμμα 3.9: Φάσματα φρέσκου (—) και αλλοιωμένου (—) δείγματος μπουτιού κοτόπουλου.

3.4.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων

(Partial Least Square-Regression, PLS-R) από την εφαρμογή πολυφασματικής

απεικόνισης.

Για την αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης της OMX, των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* και των LAB, σε δείγματα από μαριναρισμένο μπουτί κοτόπουλου, με τη χρήση των δεδομένων που αποκτήθηκαν από τη πολυφασματική απεικόνιση, τα δεδομένα παρατίθενται στο Πίνακα 3.2. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη, την επικύρωση και τη πρόβλεψη του μοντέλου. Όπως προαναφέρθηκε και στο Υποκεφάλαιο 2.2.3 η πρόβλεψη του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με τα δεδομένα του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ. Οι συντελεστές συσχέτισης r_c , r_{cv} , r_p , και για τις τρεις κατηγορίες μικροοργανισμών είναι κοντά στο 0.9, εκτός από τον r_p για τα LAB ο οποίος πλησιάζει το 0.8, και υποδηλώνουν ότι υπάρχει υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ των

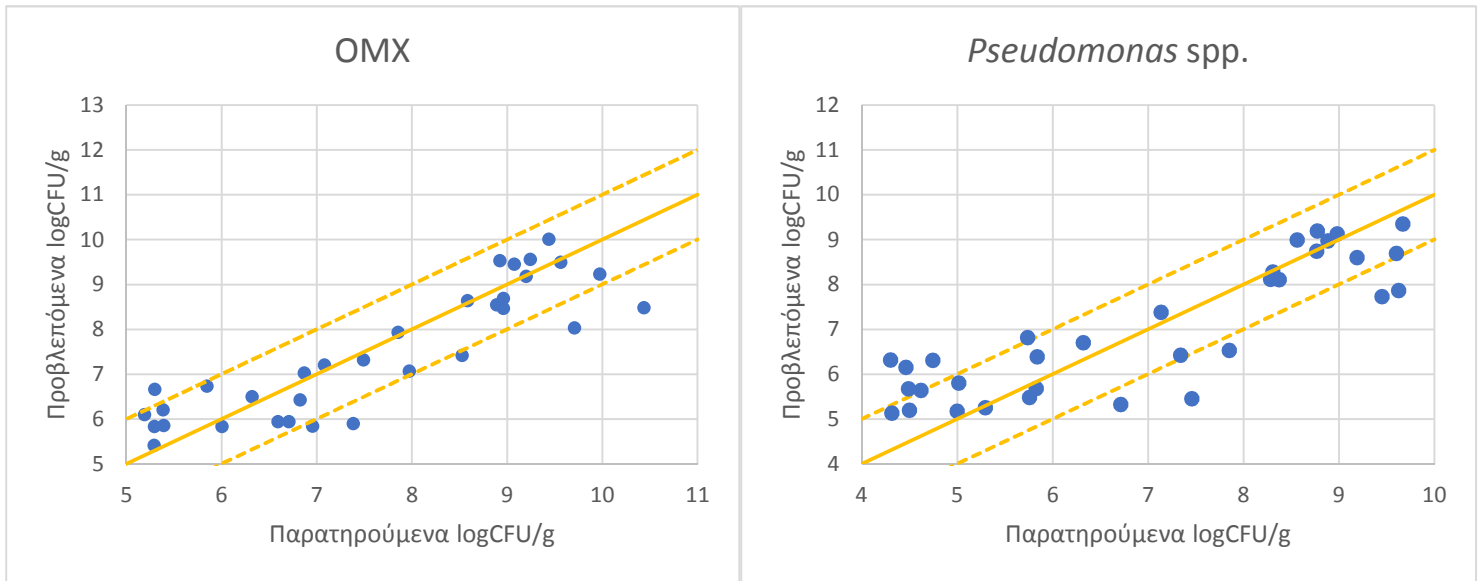
προβλεπόμενων και των παρατηρούμενων τιμών (Hinkle et al. 2003). Παράλληλα, οι αποκλίσεις της μέσης τετραγωνικής ρίζας σφάλματος (Root Mean Squared Error) RMSEc, RMSEcv, RMSEp οι οποίες κυμαίνονται από 0.734-0.988 log CFU/g υποδεικνύουν την αξιολόγηση της ακρίβειας του μοντέλου πρόβλεψης, όπου όσο πιο μικρές τιμές έχουν, τόσο υψηλότερη είναι η ακρίβεια (Feng et al. 2018, 2014). Επιπλέον, οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού (coefficient of determination) R^2c , R^2cv και R^2p κυμαίνονται από 0.670 έως 0.798, με εξαίρεση το R^2p των LAB το οποίο είναι 0.557, δείχνουν ότι κατά τη βαθμονόμηση υπάρχει καλή προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο μας, αφού πλησιάζουν τη μονάδα, ενώ για τη πρόβλεψη μας πληροφορούν ότι υφίσταται μια γραμμική σχέση μεταξύ των μεταβλητών X και Y και το μοντέλο που αναπτύχθηκε είναι αρκετά γραμμικό (Karoui et al. 2006). Ο συνδυασμός των τιμών των συντελεστών συσχέτισης, των αποκλίσεων τη μέσης τετραγωνικής ρίζας και των συντελεστών προσδιορισμού μας δείχνουν ότι τα φασματικά δεδομένα από τη πολυφασματική απεικόνιση συσχετίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX, τα *Pseudomonas* spp. και τα LAB. Τέλος, ο κατάλληλος αριθμός των λανθάνουσων συνιστωσών (LVs) που προσδιορίζουν τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων ήταν 7 για την OMX και 8 για τα *Pseudomonas* spp. και τα LAB, κάτι το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη ενός καλού μοντέλου πρόβλεψης. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.2, τη καλύτερη επίδοση έχει το μοντέλο για την OMX, ενώ τη λιγότερο καλή έχει αυτό των LAB.

Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο PLS-R, για τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, σε δείγματα από μαριναρισμένο μπουτί κοτόπουλου αποθηκευμένο σε αερόβιες συνθήκες.

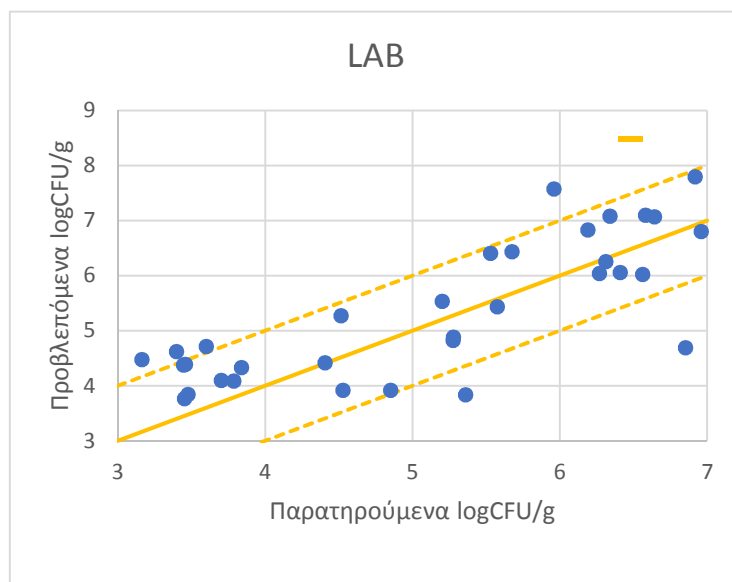
		OMX	<i>Pseudomonas</i> spp.	LAB
Εύρος βαθμονόμησης (log cfu/g)		5.189-10.436	4.301-9.668	3.163-6.959
Εύρος Πρόβλεψης (log cfu/g)		5.408-10.008	5.128-9.193	3.768-7.794
Λανθάνουσες συνιστώσες (LVs)		7	8	8
Ανάπτυξη	RMSEc	0.739	0.862	0.734
	r_c	0.894	0.876	0.879
	R^2c	0.798	0.768	0.774
Επικύρωση	RMSEcv	0.824	0.988	0.833
	r_{cv}	0.868	0.835	0.843
	R^2cv	0.753	0.670	0.714
Πρόβλεψη	RMSEp	0.779	0.981	0.832
	r_p	0.878	0.857	0.791

	R^2_p	0.763	0.725	0.557
--	---------	-------	-------	-------

Η επίδοση των μοντέλων αναπαραστάθηκε επίσης γραφικά μέσω της κατασκευής της ευθείας παλινδρόμησης για την OMX, τα *Pseudomonas* spp. και τα LAB, που παρουσιάζει τη κατανομή των δεδομένων πρόβλεψης γύρω από την ευθεία $y=x$ με ορατή τη γραμμική τάση των δεδομένων (Διάγραμμα 3.10).



Διάγραμμα 3.10: συσχέτισης των προβλεπόμενων () παρατηρούμενες



Διαγράμματα) με τις (•) τιμές για

την OMX, τα *Pseudomonas* spp. και τα LAB, για τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες. Οριοθέτηση ορίων αστοχίας πρόβλεψης στον \pm λογάριθμο (fail safe: +1, fail dangerous: -1).

Όπως παρατηρήθηκε από τα φάσματα του φρέσκου και του αλλοιωμένου μπουτιού κοτόπουλου (Διάγραμμα 3.9), δεν επηρεάζουν όλα τα μήκη κύματος στον ίδιο θετικό η αρνητικό βαθμό τη τελική πρόβλεψη του μοντέλου ως προς την OMX, τα *Pseudomonas* spp και τα LAB (Elmasry et al. 2012). Τα σημαντικά μήκη κύματος που είναι υπεύθυνα για την εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού, παρατηρήθηκαν με βάση τους σταθμισμένους συντελεστές παλινδρόμησης (regression coefficients, B), οι οποίοι υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού The Unscrambler. Έπειτα οι συντελεστές B χρησιμοποιήθηκαν για τη κατασκευή των συναρτήσεων ποσοτικού προσδιορισμού της OMX, των *Pseudomonas* spp και των LAB.

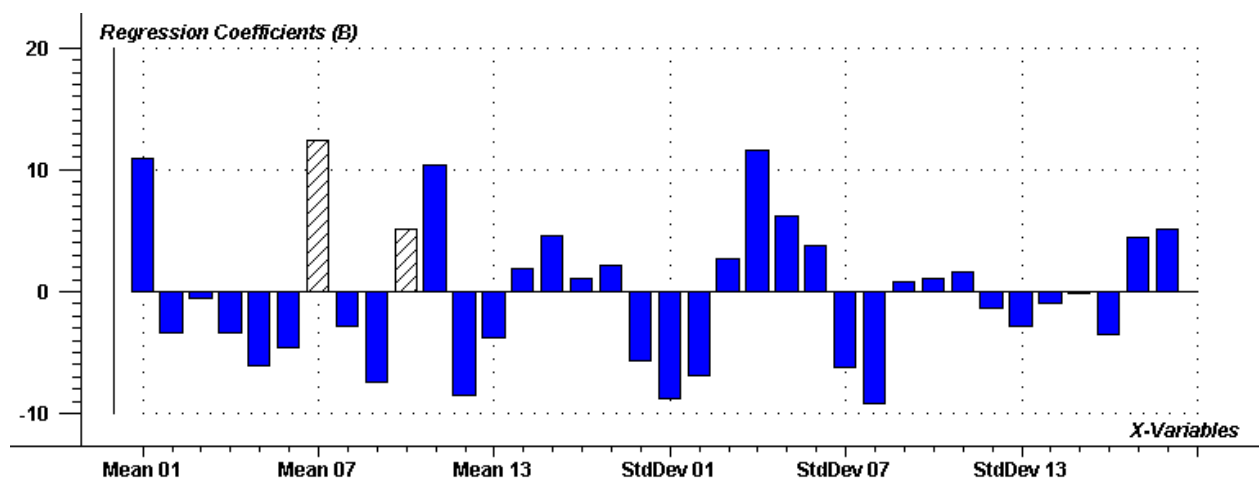
Παρατηρώντας το Διάγραμμα 3.11, φαίνεται ότι σημαντική είναι η επίδραση των φασμάτων των 570, 645 nm. Από αυτά τα μήκη κύματος κατασκευάστηκε η ποσοτική εξίσωση πρόβλεψης της OMX:

$$Y_{\text{OMX}} = 9.075 + 12.37 \cdot X_{570} + 5.16 \cdot X_{645} \quad (\text{Εξίσωση 3.1})$$

Οπού:

Y_{OMX} = προβλεπόμενος πληθυσμός της OMX (logCFU/g).

X_{nm} = απορρόφηση στο αντίστοιχο μήκος κύματος.



snv 136 tvc, (Y-var, PC): (TVC,7) B0 = 9.075905

Διάγραμμα 3.11: Οι συντελεστές B των δεδομένων των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων της OMX για τα 18 φάσματα. Οι μπάρες με το λευκό χρώμα αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά μήκη κύματος.

Αντίστοιχα, από το Διάγραμμα 3.12 φαίνεται ότι τα φάσματα που παίζουν σημαντικό ρόλο στη πρόβλεψη του μοντέλου για τα *Pseudomonas* spp. είναι τα 405, 570, και 645 nm. Έτσι προκύπτει η εξής εξίσωση ποσοτικού προσδιορισμού των *Pseudomonas* spp:

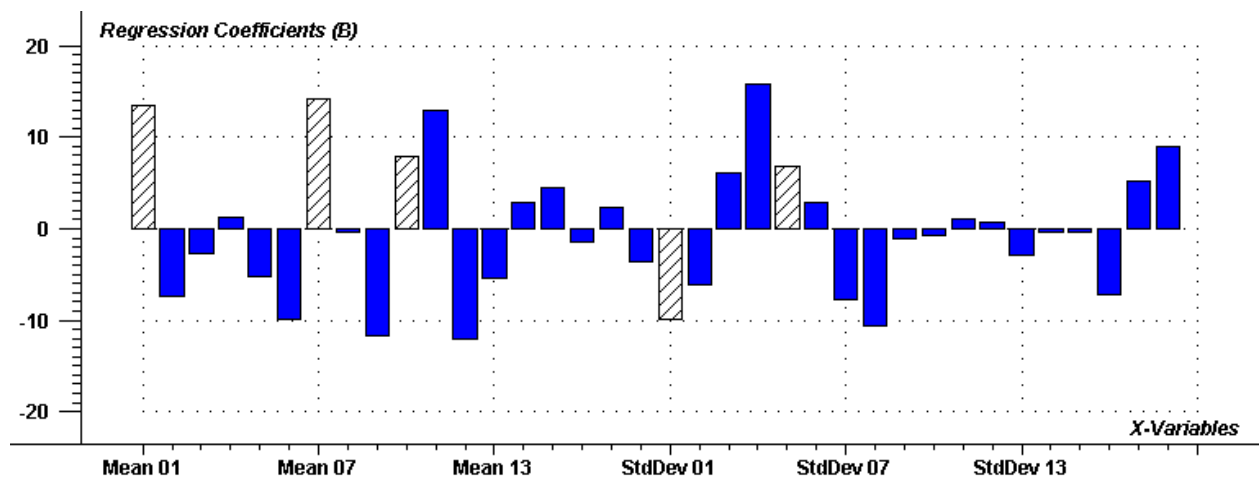
$$Y_{ps} = 15.94 + 13.46 \cdot X_{405} + 14.19 \cdot X_{570} + 7.84 \cdot X_{645} - 9.90 \cdot SD_{405} + 6.88 \cdot SD_{505} \quad (\text{Εξίσωση 3.2})$$

Οπού:

Y_{ps} = προβλεπόμενος πληθυσμός των *Pseudomonas* spp (logCFU/g).

X_{nm} = απορρόφηση στο αντίστοιχο μήκος κύματος.

SD_{nm} = τυπική απόκλιση του δείγματος για το συγκεκριμένο μήκος κύματος.



snw 136 P, (Y-var, PC): (P;B) B0 = 15.941702

Διάγραμμα 3.12: Οι συντελεστές B των δεδομένων των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων των *Pseudomonas* spp. για τα 18 φάσματα. Οι μπάρες με το λευκό χρώμα αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά μήκη κύματος.

Επίσης, από το Διάγραμμα 3.13, φαίνεται ότι σημαντική είναι η επίδραση των φασμάτων των 405, 570, 630 και 660 nm. Από αυτά τα μήκη κύματος κατασκευάστηκε η ποσοτική εξίσωση πρόβλεψης των LAB:

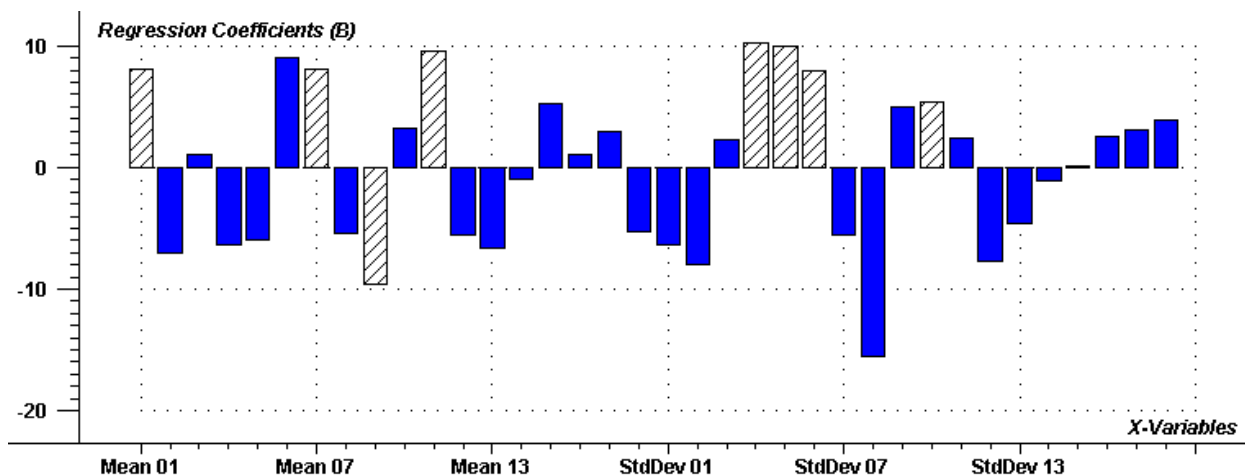
$$Y_{LAB} = 18.96 + 8.14 \cdot X_{405} + 8.13 \cdot X_{570} - 9.53 \cdot X_{630} + 9.58 \cdot X_{660} + 10.20 \cdot SD_{470} + 9.98 \cdot SD_{505} + 7.95 \cdot SD_{525} + 5.35 \cdot SD_{645} \quad (\text{Εξίσωση 3.3})$$

Οπού:

Y_{LAB} = προβλεπόμενος πληθυσμός των *Pseudomonas* spp (logCFU/g).

X_{nm} = απορρόφηση στο αντίστοιχο μήκος κύματος.

SD_{nm} = τυπική απόκλιση του δείγματος για το συγκεκριμένο μήκος κύματος.



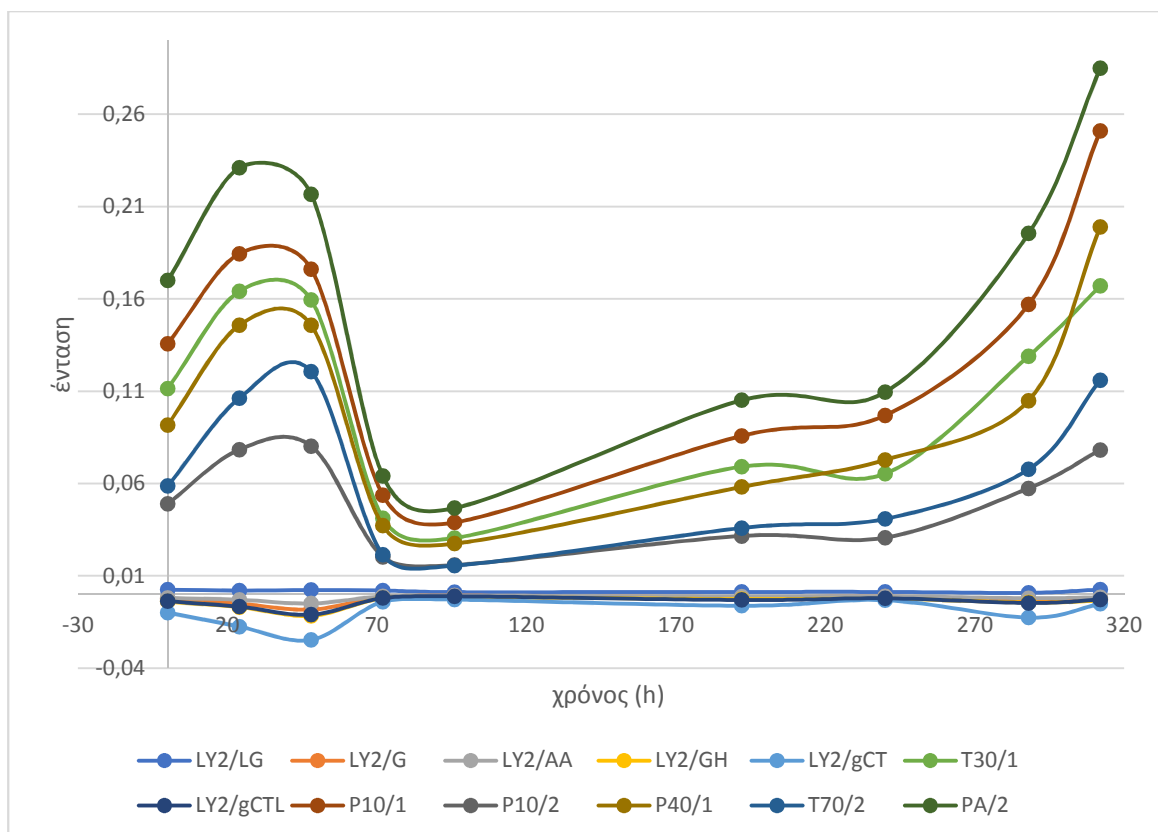
snv 136 lab kalo, (Y-var, PC): (LAB,8) B0 = 18.957582

Διάγραμμα 3.13: Οι συντελεστές B των δεδομένων των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων των LAB για τα 18 φάσματα. Οι μπάρες με το λευκό χρώμα αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά μήκη κύματος.

Συγκρίνοντας τα φάσματα του φρέσκου και του αλλοιωμένου με τα ευρήματα από την PLS-R, φαίνεται να υπάρχει μία συμφωνία ως προς τα φάσματα που δίνουν τις σημαντικές πληροφορίες για τη κατασκευή του μοντέλου. Πιο συγκεκριμένα, το φάσμα 570nm το οποίο έχει και τη μεγαλύτερη επίδραση στα μοντέλα πρόβλεψης της OMX, των *Pseudomonas* spp και των LAB, αποδίδεται στη μυογλοβίνη (570nm), στην οποία οφείλεται το βαθύ κόκκινο χρώμα των ιστών λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα. Επίσης, ο υψηλός συντελεστής παλινδρόμησης για τα 630nm, που εμφανίζεται στο μοντέλο πρόβλεψης για τα LAB υποδηλώνει την ύπαρξη της μεταμυογλοβίνης, η οποία σχηματίζεται λόγω της οξειδωσης της μυογλοβίνης, και είναι υπεύθυνη για το καφέ χρώμα των ιστών (Panagou et al. 2014, Spyrelli et al. 2021, Dissing 2011). Παράλληλα, φαίνεται η σημαντική επίδραση των μηκών κύματος στα 645 και 660 nm, τα οποία είναι επίσης αποτέλεσμα της απορρόφησης των παραγώγων της μυογλοβίνης (οξυμυογλοβίνη, δεοξυμυογλοβίνη, μεταμυογλοβίνη) εξαιτίας της οξειδωσης που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων σε αερόβιες συνθήκες (Panagou et al. 2014, Spyrelli et al. 2020).

3.4.3 Αποτελέσματα δεδομένων της e-nose

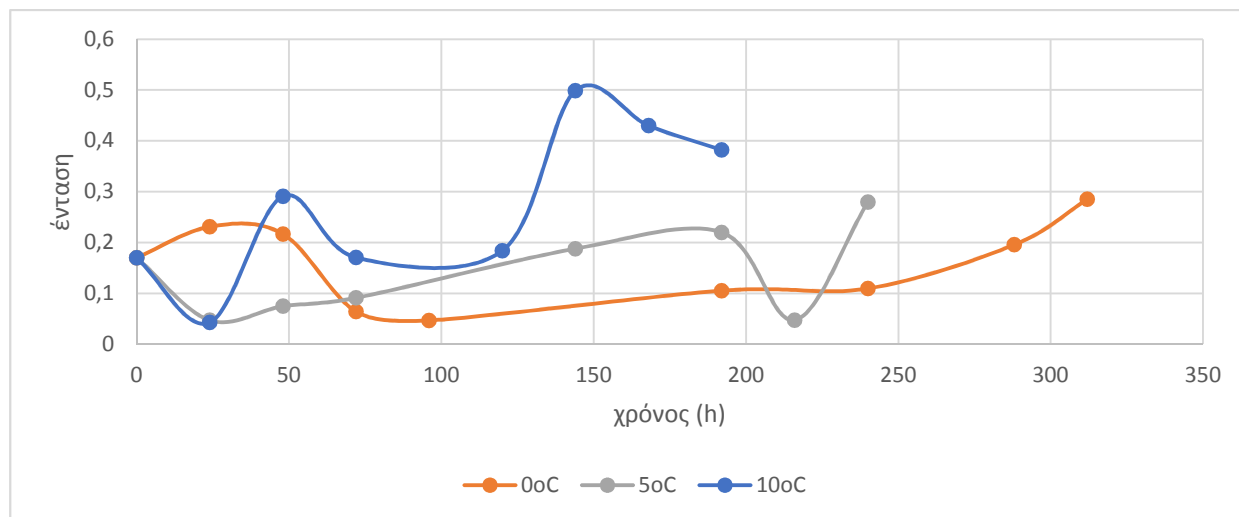
Η παραγωγή των πτητικών ουσιών στα δείγματα μαριναρισμένου μπουτιού κοτόπουλου, φαίνεται από την απόκριση των αισθητήρων της Alpha M.O.S, ενδεικτικά για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 0°C στο Διάγραμμα 3.14.



Διάγραμμα 3.14: Απεικόνιση της έντασης της απόκρισης των 12 μεταλλικών αισθητήρων σε σχέση με το χρόνο, για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 0°C.

Παρατηρήθηκε ότι η αντίσταση των αισθητήρων PA/2, P10/1, T30/1, P40/1, T70/2, P10/2, ήταν εμφανώς μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους υπόλοιπους 7 αισθητήρες. Να σημειωθεί ότι οι ίδιοι αισθητήρες αποκρίνονται και για τα δείγματα μαριναρισμένου μπουτιού κοτόπουλου που συντηρήθηκαν στους 5 και 10 °C (Παράρτημα Β), με τη μόνη διαφορά ότι στους 10 °C αποκρίνεται και ο αισθητήρας LY2/LG. Η απόκριση αυτών των αισθητήρων μας υποδηλώνει την ύπαρξη (σε φθίνουσα σειρά έντασης) αιθανόλης, αμμωνίας, υδρογονανθράκων, οργανικών διαλυτών, φθορίου, αρωματικών ενώσεων, μεθανίου και στη περίπτωση συντήρησης στους 10 °C, οξειδωτικού αερίου (Xu et al. 2014), τα οποία όπως έχει σημειωθεί και στα Υποκεφάλαια 1.3.1 και 1.3.2 είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας και της χημικής αλλοίωσης που λαμβάνει χώρα στους ιστούς του κρέατος. Ο αισθητήρας με τη μεγαλύτερη απόκριση ήταν ο PA/2, ο οποίος μετράει την αιθανόλη, την αμμωνία και την οργανική αμίνη, ενώσεις που είναι απόρροια της πρωτεολυτικής και σακχαρολυτικής δράσης των *Pseudomonas* spp., του κυρίαρχου μικροοργανισμού καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (Κεφάλαιο 3.1).

Αξίζει επίσης, να σημειωθεί η διαφοροποίηση της έντασης των αισθητήρων κατά τη συντήρηση του κρέατος κοτόπουλου στους 0, 5 και 10 °C. Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 3.15), συγκρίνονται οι εντάσεις του αισθητήρα PA/2 και για τις τρεις θερμοκρασίες συντήρησης. Διακρίνεται, ότι η αύξηση της έντασης του αισθητήρα είναι μικρή στους 0 °C, υψηλότερη στους 5 °C και ακόμη πιο υψηλή στους 10 °C, γεγονός που επαληθεύει την ταχύτερη αλλοίωση σε υψηλότερες θερμοκρασίες όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 3.5.



Διάγραμμα 3.15: Σύγκριση αποτελεσμάτων απόκρισης του αισθητήρα PA/2 κατά τη συντήρηση του κρέατος κοτόπουλου υπο αερόβιες συνθήκες στους 0, 5 και 10°C.

3.4.4 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square-Regression, PLS-R) από την εφαρμογή e-nose.

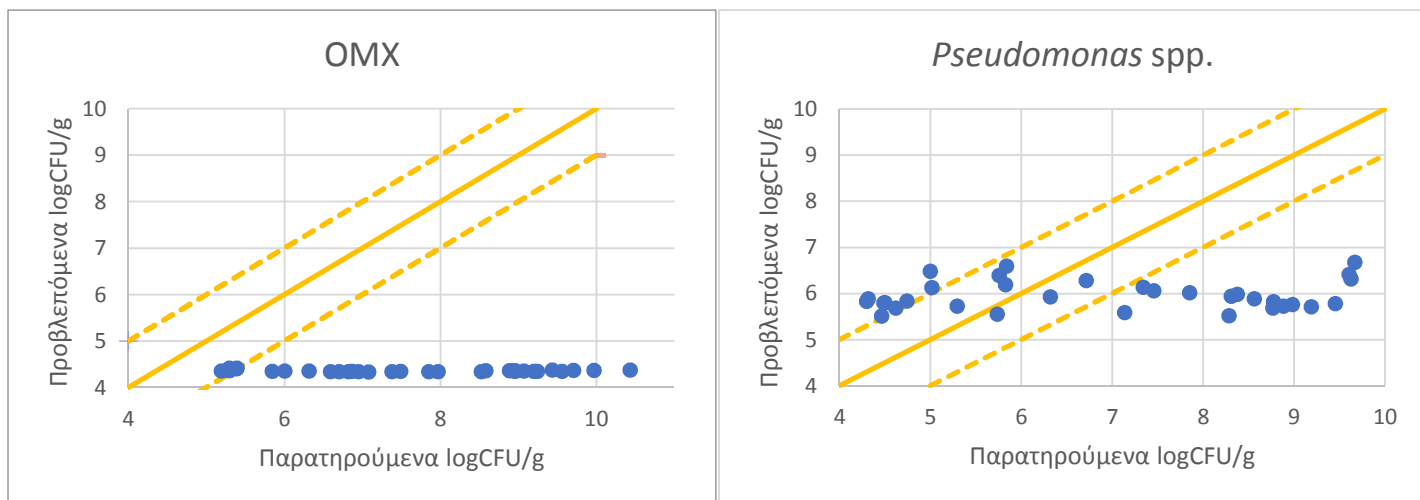
Έγινε προσπάθεια δημιουργίας και αξιολόγησης μοντέλων για το πληθυσμό της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp. σε δείγματα από μπούτι κοτόπουλου, με τη χρήση των δεδομένων που αποκτήθηκαν από την εφαρμογή της e-nose, η οποία όπως φαίνεται από τα δεδομένα που παρατίθενται στο Πίνακα 3.3, δεν είναι επιτυχημένη. Πιο συγκεκριμένα, στο Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται οι δείκτες απόδοσης για την εκπαίδευση, την επικύρωση και τη πρόβλεψη του μοντέλου, του οποίου η πρόβλεψη, όπως αναφέρθηκε και στο Υποκεφάλαιο 2.2.3, πραγματοποιήθηκε με τα δεδομένα του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ. Παρατηρείται ότι οι συντελεστές συσχέτισης r_c και r_{cv} κυμαίνονται μεταξύ του 0.5 και του 0.8, υποδηλώνοντας μέτρια ως υψηλή θετική συσχέτιση των προβλεπόμενων και των παρατηρούμενων τιμών, ενώ από την άλλη πλευρά οι τιμές των συντελεστών r_p για την OMX ($r_p = -0.196$) και για τα *Pseudomonas* spp ($r_p = 0.118$) δεν προβλέπουν σχεδόν καμία

συσχέτιση των προβλεπόμενων και των παρατηρούμενων τιμών για τη πρόβλεψη του μοντέλου (Hinkle et al. 2003). Επιπλέον η ακρίβεια του μοντέλου είναι πολύ μικρή, αφού οι αποκλίσεις της μέσης τετραγωνικής ρίζας RMSE_c, RMSE_{cv} και RMSE_p ξεπερνούν τη μονάδα (Feng et al. 2014, 2018), ενώ παράλληλα τα χαμηλά R²_c, R²_{cv} και R²_p δείχνουν την μη γραμμική σχέση των X και Y μεταβλητών.

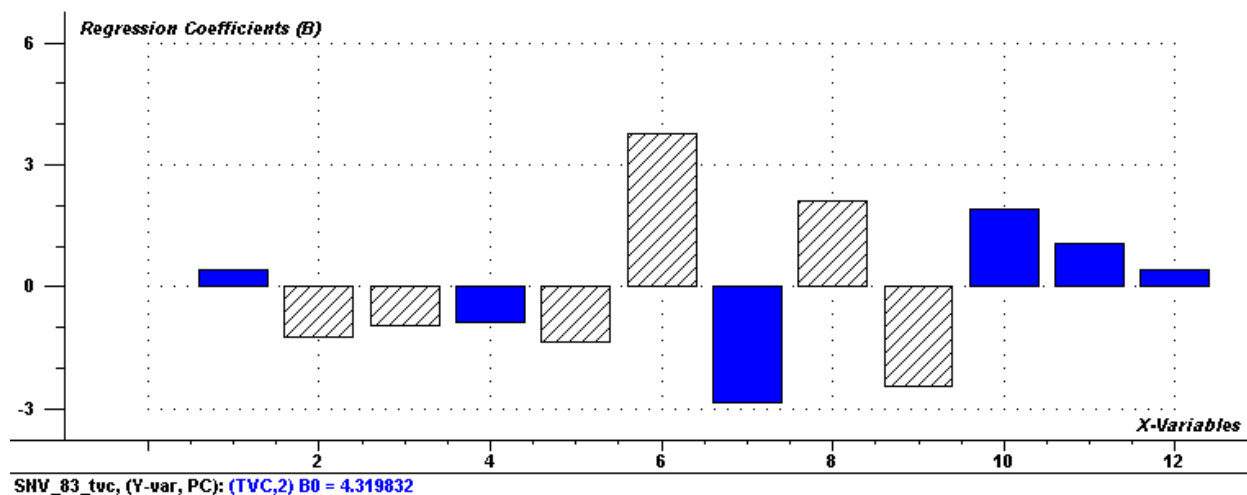
Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο PLS-R, για τα δεδομένα της e-nose , σε δείγματα από μπουτι κοτόπουλου αποθηκευμένο σε αερόβιες συνθήκες.

		OMX	<i>Pseudomonas spp.</i>
Εύρος βαθμονόμησης (log cfu/g)		5.189-10.436	4.301-9.668
Εύρος Πρόβλεψης (log cfu/g)		5.408-10.008	5.128-9.193
Λανθάνουσες συνιστώσες (LVs)		2	2
Ανάπτυξη	RMSE_c	1.080	1.205
	r_c	0.777	0.762
	R²_c	0.603	0.581
Επικύρωση	RMSE_{cv}	1.120	1.247
	r_{cv}	0.757	0.741
	R²_{cv}	0.584	0.559
Πρόβλεψη	RMSE_p	3.626	2.105
	r_p	-0.196	0.118
	R²_p	-4.14	-0.267

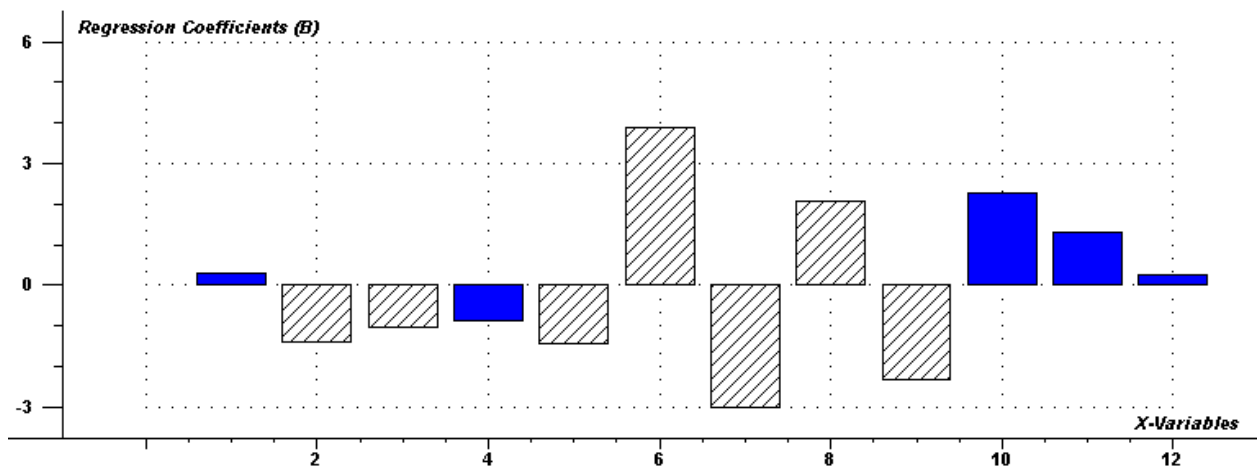
Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο PLS-R, αλλά και της επίδοσης των μοντέλων όπως φαίνεται γραφικά στο Διάγραμμα 3.16 από την εφαρμογή της e-nose, φαίνεται ότι τα μοντέλα πρόβλεψης δεν δίνουν καλά αποτελέσματα και δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το ποσοτικό προσδιορισμό της OMX και των *Pseudomonas spp.* Παρόλα αυτά στα Διαγράμματα 3.17 και 3.18 παρουσιάζονται οι σημαντικοί συντελεστές B των αποκρίσεων των αισθητήρων της e-nose για την OMX και τα *Pseudomonas spp.* και παρατηρείται ότι και για τις δυο κατηγορίες μικροοργανισμών, αυτοί σχεδόν ταυτίζονται. Πιο συγκεκριμένα για την OMX αποκρίνονται οι LY2/G, LY2/AA, LY2/gCTL, LY2/gCT, P10/1, P10/2, ενώ για τα *Pseudomonas spp.* αποκρίνεται επιπλέον και ο T30/1. Ωστόσο, όπως θα δούμε παρακάτω (Υποκεφάλαιο 3.4.6), τα αποτελέσματα της e-nose, δίνουν πολύ καλύτερα ποιοτικά αποτελέσματα για την αλλοίωση των δειγμάτων κοτόπουλου.



Διάγραμμα 3.16: Διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων (—) με τις παρατηρούμενες (•) τιμές για την OMX και τα *Pseudomonas* spp, για τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες. Οριοθέτηση ορίων αστοχίας πρόβλεψης στον \pm λογάριθμο (fail safe: +1, fail dangerous: -1).



Διάγραμμα 3.17: Οι συντελεστές B των δεδομένων των αποκρίσεων της OMX για τους 12 αισθητήρες. Οι μπάρες με το λευκό χρώμα αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά μήκη κύματος.



SHV_83_ps, (Y-var, PC): (Ps,2) B0 = 3.683544

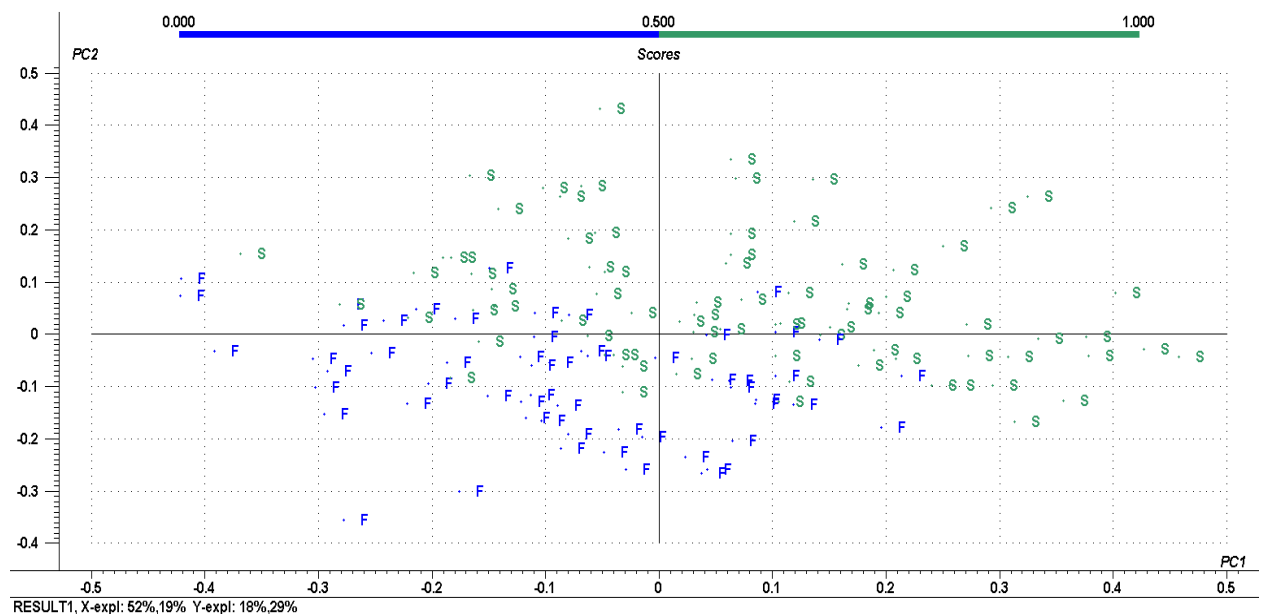
Διάγραμμα 3.18: Οι συντελεστές B των δεδομένων των αποκρίσεων των *Pseudomonas* spp. για τους 12 αισθητήρες. Οι μπάρες με το λευκό χρώμα αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά μήκη κύματος.

3.4.5 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (PLS-DA), από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης

Η εφαρμογή της διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, για τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από την πολυφασματική απεικόνιση, έγινε με στόχο το διαχωρισμό και τη ταξινόμηση, των δειγμάτων μαριναρισμένου μπουτιού κοτόπουλου, σε δύο υποσύνολα (Φρέσκα, Αλλοιωμένα) βάσει του βαθμού αλλοίωσης τους. Υπολογίστηκαν το ποσοστό Ευαισθησίας (Sensitivity %), Ακρίβειας (Specificity %) και Συνολικής Ακρίβειας (Overall Accuracy %), τα οποία παρουσιάζονται αριθμητικά στο Πίνακα 3.4. Φαίνεται ότι τα μοντέλα ταξινόμησης δειγμάτων μαριναρισμένου μπουτιού κοτόπουλου έχουν αρκετά μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια πάνω από 83 %. Πιο συγκεκριμένα, η ευαισθησία για τα φρέσκα είναι 87.3% κατά την ανάπτυξη, 83.87 % κατά την επικύρωση και 92.31 % κατά τη πρόβλεψη του μοντέλου, ενώ η ακρίβεια για την ανίχνευση των αλλοιωμένων ανέρχεται στο 97.26 % (ανάπτυξη), 93.24 % (επικύρωση) και 90 % (πρόβλεψη). Παρατηρείται, επίσης, ότι η ικανότητα του μοντέλου να ταξινομεί τα δείγματα στη σωστή κλάση (συνολική ακρίβεια %), είναι πολύ υψηλή, με χαμηλότερη αυτή κατά την επικύρωση του μοντέλου με ποσοστό 88.97 %. Αμέσως μεγαλύτερη συνολική ακρίβεια παρουσιάζει η πρόβλεψη του μοντέλου με ποσοστό 90.91 %, ενώ ακολουθεί η ανάπτυξη με ποσοστό 92.65 %. Επιπλέον, από το Διάγραμμα 3.19, φαίνεται ότι υπάρχει πολύ μικρή αλληλοεπικάλυψη της κλάσης του φρέσκου και του αλλοιωμένου.

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, στα δείγματα κοτόπουλου για τις δυο κλάσεις αλλοίωσης.

Παρατηρούμενα/ Προβλεπόμενα		Φρέσκο	Αλλοιωμέ νο	Συνολικ ά δείγματ α (n)	Λανθάνουσ ες συνιστώσες (LVs)	Ευαισθησ ία %	Ακρίβει α %	Συνολικ ή Ακρίβει α %
Ανάπτυξη	Φρέσκο	55	2	136	5	87.30	97.26	92.65
	Αλλοιωμέ νο	8	71					
Επικύρω ση	Φρέσκο	52	5	136	5	83.87	93.24	88.97
	Αλλοιωμέ νο	10	69					
Πρόβλεψ η	Φρέσκο	12	2	33	5	92.31	90	90.91
	Αλλοιωμέ νο	1	18					



Διάγραμμα 3.19: Χωροταξική απεικόνιση των δυο κλάσεων (φρέσκο: F, αλλοιωμένο:S) κατά την κατασκευή του μοντέλου, με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διακριτική ικανότητα του μοντέλου επηρεάζεται από παρόμοια μήκη κύματος με αυτά που προκύπτουν από τα μοντέλα PLS-R (για τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από τη πολυφασματική απεικόνιση) για την *OMX* και τα *Pseudomonas* spp.

Πιο αναλυτικά, σημαντική επίδραση είχαν τα μήκη κύματος στα 405, 505, 570, 590, 630, 645, 660, 700 και 890 nm, τα οποία όπως έχει αναφερθεί και στο Υποκεφάλαιο 3.4.2 έχουν άμεση σχέση με την αλλοίωση του χρώματος κοτόπουλου εξαιτίας της οξειδωσης της μυογλοβίνης. (Panagou et al. 2014) και σε άλλα προϊόντα κοτόπουλου πέρα από το μαριναρισμένο μπούτι, όπως είναι το μπιφτέκι, το στήθος και το μπούτι κοτόπουλου (Spyrelli et al. 2020).

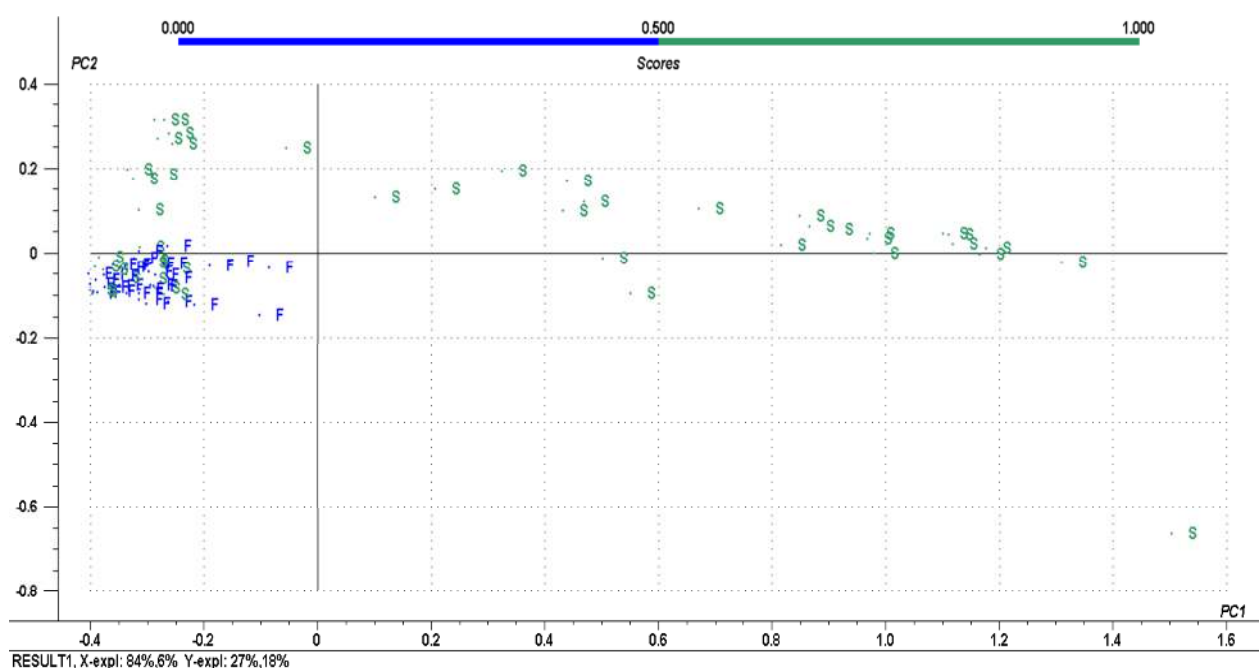
3.4.6 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (PLS-DA), από την εφαρμογή της e-nose

Όπως και για τη περίπτωση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης (υποκεφάλαιο 3.4.5), η διακριτική ανάλυση με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων εφαρμόστηκε και για τα δεδομένα της ηλεκτρονικής μύτης, με στόχο το διαχωρισμό των δειγμάτων και τη ταξινόμησή τους στις δύο κλάσεις (Φρέσκο και Αλλοιωμένο). Στο Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται τα αριθμητικά αποτελέσματα της PLS-DA (Ευαισθησία %, Ακρίβεια % και Συνολική Ακρίβεια %), για κάθε στάδιο ανάπτυξης του μοντέλου. Παρατηρείται ότι το μοντέλο κατά την ανάπτυξη και την επικύρωσή του δίνει ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα, με ευαισθησία 72.54% ακρίβεια 100% και συνολική ακρίβεια 80.23%. Από την αντίθετη πλευρά, τα ποσοστά της πρόβλεψης του μοντέλου με τα δεδομένα του δυναμικού προφίλ είναι πολύ χαμηλά. Η ευαισθησία και η συνολική ακρίβεια της πρόβλεψης του μοντέλου είναι 42.42%, ενώ φαίνεται ότι όλα τα αλλοιωμένα δείγματα τα ανιχνεύει ως φρέσκα. Παρόλα αυτά, από το Διάγραμμα 3.20 διαπιστώνουμε ότι στο χώρο επιτυγχάνεται αρκετά ικανοποιητικός διαχωρισμός των κλάσεων, καθώς δε παρατηρείται πολύ μεγάλη αλληλεπικάλυψη των φρέσκων και των αλλοιωμένων δειγμάτων.

Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για τα δεδομένα της e-nose, στα δείγματα κοτόπουλου για τις δυο κλάσεις αλλοίωσης.

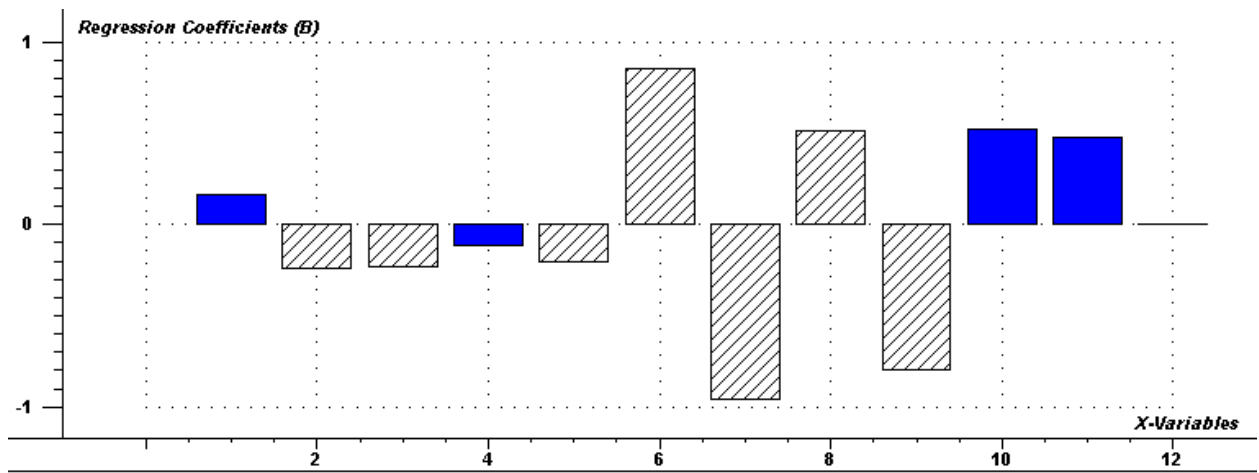
Παρατηρούμενα/ Προβλεπόμενα		Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n)	Λανθάνουσες συνιστώσες (LVs)	Ευαισθησία %	Ακρίβεια %	Συνολική Ακρίβεια %
Ανάπτυξη	Φρέσκο	37	0	83	2	72.54	100	80.23
	Αλλοιωμένο	14	32					

Επικύρωση	Φρέσκο	37	0	83	2	72.54	100	80.23
	Αλλοιωμένο	14	32					
Πρόβλεψη	Φρέσκο	14	0	33	2	42.42	-	42.42
	Αλλοιωμένο	19	0					



Διάγραμμα 3.20: Χωροταξική απεικόνιση των δυο κλάσεων (φρέσκο: F, αλλοιωμένο:S) κατά την κατασκευή του μοντέλου, με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης.

Κάτι ακόμη που αξίζει να αναφερθεί, είναι ότι όπως και για τη περίπτωση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης, έτσι κι εδώ, η διακριτική ικανότητα του ποιοτικού μοντέλου επηρεάζεται από την απόκριση παρόμοιων αισθητήρων με αυτούς που προέκυψαν από τη PLS-R (Υποκεφάλαιο 3.4.4).



snv en fs, (Y-var, PC): (Class,2) B0 = 0.333533

Διάγραμμα 3.21: Οι συντελεστές B των αποκρίσεων για τους 12 αισθητήρες. Οι μπάρες με το λευκό χρώμα αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά μήκη κύματος.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων και η εφαρμογή των πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων ανάπτυξης, επιβεβαίωσαν την σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στην ανάπτυξη της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας σε μαριναρισμένο σουβλάκι από μπούτι κοτόπουλου, υπο αερόβιες συνθήκες. Βρέθηκε ότι ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός σε όλες τις συνθήκες συντήρησης ήταν τα *Pseudomonas* spp., ακολουθούμενα από τη μικροβιακή χλωρίδα στο υπόστρωμα Columbia Agar, τα LAB, τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και τέλος τα βακτήρια *E.coli*. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία συντήρησης, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος συντήρησης. Ειδικότερα, στους 0 °C η OMX ξεπερνά τους 7 λογαριθμικούς κύκλους στις 216 ώρες συντήρησης (7.41 log CFU/g), ενώ στους 5 °C τους ξεπερνά στις 72 ώρες (7.1 log CFU/g) και στους 10 °C στις 42 ώρες (7 log CFU/g). Από τα πρωτογενή μοντέλα ανάπτυξης κατά Baranyi and Roberts βρέθηκε ότι η φάση προσαρμογής των *Pseudomonas* spp. μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης, με μικρότερη τη τιμή των 9.9 ωρών για τους 10 °C και μεγαλύτερη τη τιμή των 78.5 ωρών για τους 0 °C. Ακόμη, η φάση προσαρμογής των *Pseudomonas* spp. στο δυναμικό προφίλ (42.9 ώρες) και στη θερμοκρασία των 5 °C (33.5 ώρες) έχουν διαφορά 10 ωρών.

Τα μοντέλα πρόβλεψης, που προκύπτουν από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, για την OMX σε σουβλάκι από μαριναρισμένο μπούτι κοτόπουλου, εμφάνισαν για τη πρόβλεψη $RMSE_p$ ίσο με 0.779 log CFU/g και r_p ίσο με 0.878. Παράλληλα, τα μοντέλα πρόβλεψης για τα *Pseudomonas* spp. έδωσαν για τη πρόβλεψη $RMSE_p$ ίσο με 0.981 log CFU/g και r_p ίσο με 0.857, ενώ τα αντίστοιχα για τα LAB έδωσαν $RMSE_p$ ίσο με 0.832 log CFU/g και r_p ίσο με 0.791. Οι συντελεστές R^2_p της πρόβλεψης ήταν 0.763, 0.725 και 0.557 για την OMX, τα *Pseudomonas* spp. και τα LAB αντίστοιχα. Οι συντελεστές παλινδρόμησης β των δεδομένων των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων δείχνουν ότι για την OMX σημαντικότερη επίδραση έχουν τα φάσματα με μήκος κύματος 570 και 645 nm, για τα *Pseudomonas* spp. έχουν τα φάσματα με μήκος κύματος 405, 570, και 645 nm, ενώ για τα LAB τα 405, 570, 630 και 660 nm. Αυτά τα μήκη κύματος έχουν άμεση σχέση με το χρώμα του κρέατος, αφού αντιστοιχούν σε παράγωγα της μυογλοβίνης (οξυμυογλοβίνη, δεοξυμυογλοβίνη, μεταμυογλοβίνη) (Dissing 2011, Panagou et al. 2014, Spyrelli et al. 2020).

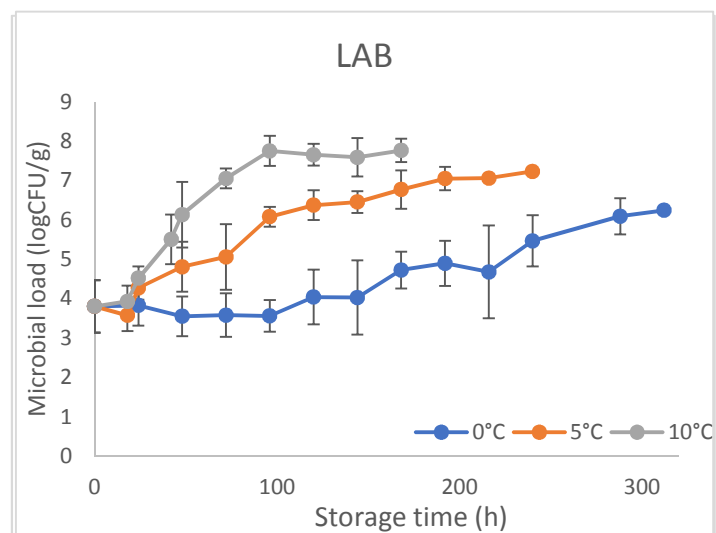
Τα μοντέλα πρόβλεψης της OMX και των *Pseudomonas* spp., για τα δεδομένα της e-nose, εμφάνισαν για τη πρόβλεψη $RMSE_p$ ίσο με 3.626 log CFU/g και 2.105 log CFU/g αντίστοιχα και συντελεστή συσχέτισης r_p ίσο με -0.196 και 0.118 αντίστοιχα. Επιπλέον το R^2_p για την OMX ήταν -4.14 ενώ για τα *Pseudomonas* spp. ήταν -0.267. Βάσει των αποτελεσμάτων που έδωσε η PLS-R για τα δεδομένα της e-nose, δεν ήταν εφικτή η εξαγωγή και η χρήση των μοντέλων για το ποσοτικό προσδιορισμό της OMX και των *Pseudomonas* spp.

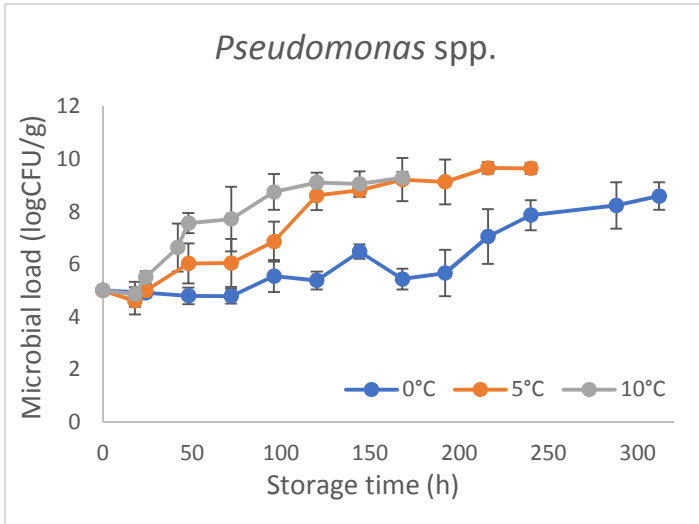
Ο ποιοτικός διαχωρισμός και ταξινόμηση βάσει του βαθμού αλλοίωσης του μπουτιού κοτόπουλου, με τη χρήση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης, φάνηκε να είναι πολύ καλός. Το μοντέλο εκτίμησης της αλλοίωσης PLS-DA για τις δύο κλάσεις (φρέσκο και αλλοιωμένο) είχε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 90.91 %, παρόλο που υπήρχε μια μικρή αλληλεπικάλυψη των δύο κλάσεων. Από την άλλη πλευρά, η ταξινόμηση στις δύο κλάσεις με βάση τα αποτελέσματα της e-nose φάνηκε να μην είναι τόσο επιτυχημένη, καθώς η συνολική ακρίβεια πρόβλεψης του μοντέλου εκτίμησης της αλλοίωσης ήταν 42.42 % ενώ παράλληλα, παρατηρήθηκε και αλληλεπικάλυψη των φρέσκων και των αλλοιωμένων.

Συνοψίζοντας, από τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων και τα πρωτογενή μοντέλα ανάπτυξης επιβεβαιώθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό ανάπτυξης και τη φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών που απαρτίζουν τη μικροχλωρίδα του μαριναρισμένου σουβλακιού από μπούτι κοτόπουλο. Τα αποτελέσματα των μοντέλων εκτίμησης PLS-R για την OMX και τα *Pseudomonas* spp., με βάση τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, εμφάνισαν πολύ καλή συσχέτιση με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, αφού η πρόβλεψη των ποσοτικών μοντέλων του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ ήταν αρκετά δυνατή, ενώ το αντίστοιχο ποσοτικό μοντέλο για τα LAB παρουσιάζει ελάχιστα μικρότερη, αλλά εξίσου ικανοποιητική συσχέτιση με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα. Αντίθετα τα μοντέλα εκτίμησης PLS-R για την OMX και τα *Pseudomonas* spp., με τα δεδομένα της e-nose, έδωσαν αποτελέσματα που αδυνατούσαν να συσχετιστούν με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, καθώς η πρόβλεψη του μοντέλου του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ δεν ήταν ικανοποιητική. Ακόμη, τα ποιοτικά μοντέλα εκτίμησης (PLS-DA), που βασίστηκαν στα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, εμφάνισαν αρκετά μεγάλη ακρίβεια πρόβλεψης, ενώ μικρή ήταν η ακρίβεια πρόβλεψης των αντίστοιχων μοντέλων που κατασκευάστηκαν με τη χρήση των δεδομένων της e-nose. Τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης δίνουν καλύτερα ποσοτικά παρά ποιοτικά μοντέλα πρόβλεψης, ενώ τα δεδομένα της e-nose είναι καταλληλότερο να χρησιμοποιηθούν για ποιοτικά παρά ποσοτικά μοντέλα πρόβλεψης. Βέβαια, είναι εφικτή η βελτίωση των ανωτέρω μοντέλων

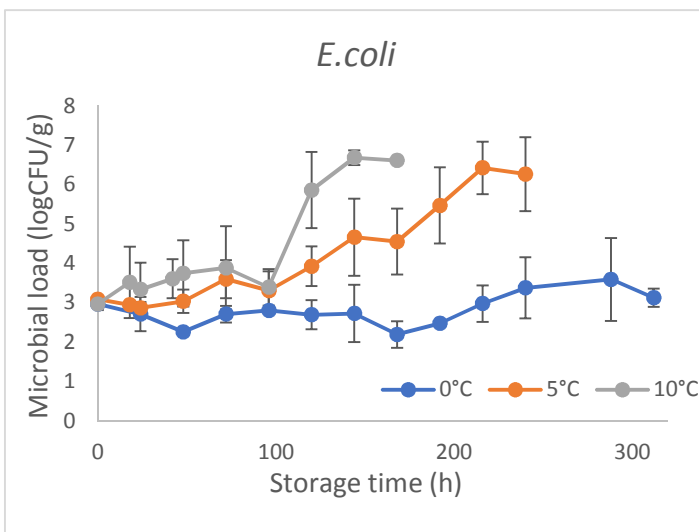
εκμάθησης, πιθανώς με τη διεξαγωγή περισσότερων μικροβιολογικών αναλύσεων και τη συλλογή περισσότερων φασματικών δεδομένων και δεδομένων από την e-nose. Τέλος, η κατασκευή μοντέλων βασισμένων σε αλγόριθμους όπως είναι τα μη γραμμικά μοντέλα, θα μπορούσε να συμβάλει αισθητά στη βελτίωση της εκτίμησης της αλλοίωσης των προϊόντων από μαριναρισμένο μπούτι κοτόπουλου.

Παράρτημα Α

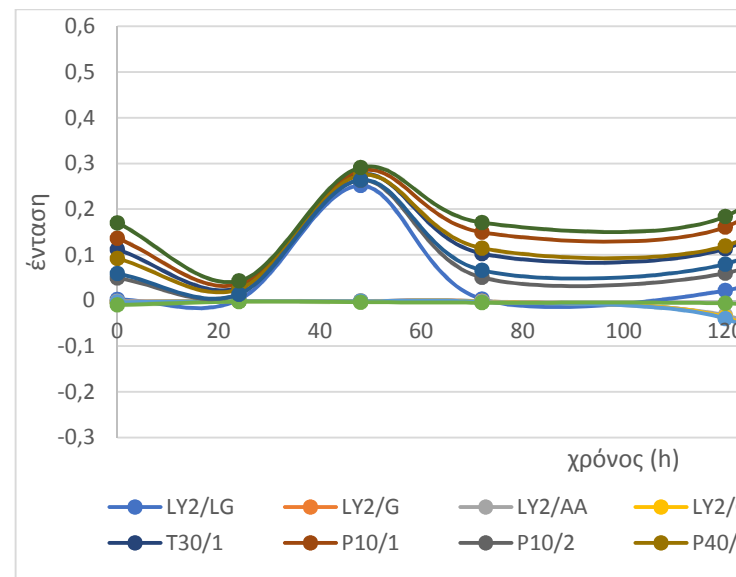
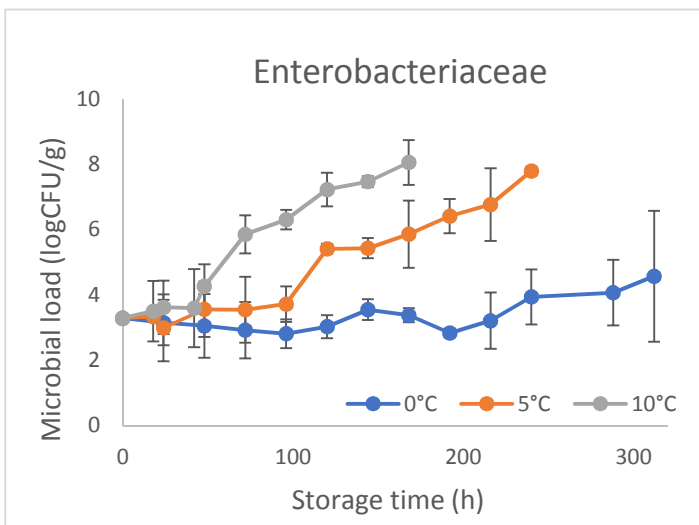




Διαγράμματα για την ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού (*Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, LAB, *E. coli* και μικροβιακής χλωρίδας στο υπόστρωμα Columbia Agar) στους 0 °C στους 5 °C και τους 10 °C.

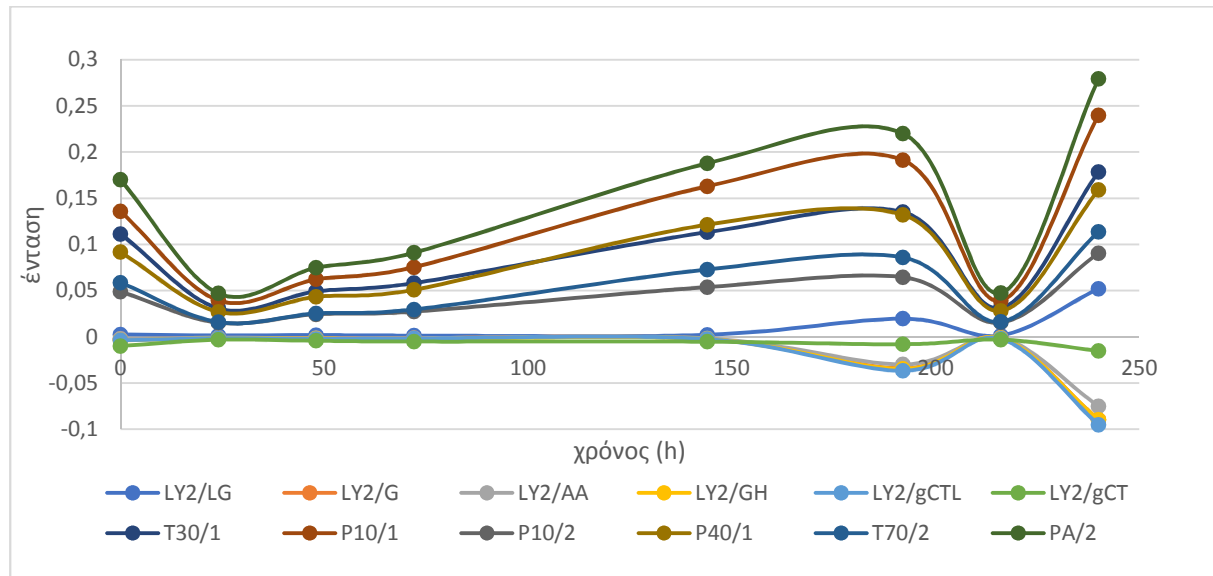


Παράρτημα Β



Διάγραμμα Β.1 Απεικόνιση της έντασης της απόκρισης των 12

μεταλλικών αισθητήρων σε σχέση με το χρόνο, για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10οC.



Διάγραμμα Β.2 Απεικόνιση της έντασης της απόκρισης των 12 μεταλλικών αισθητήρων σε σχέση με το χρόνο, για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 5οC.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 15214, ISO. 1998. "Iso 15214." 1998(Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C.).
- Abu-Ruwaida, A. S., W. N. Sawaya, B. H. Dashti, M. Murad, and H. A. Al-Othman. 1994. "Microbiological Quality of Broilers during Processing in a Modern Commercial Slaughterhouse in Kuwait." *Journal of Food Protection* 57(10):887–92. d
- Adams, Martin, and Maurice Moss. 2007. *Food Microbiology*. third. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Alexandrakis, Dimitris, Gerard Downey, and Amalia G. M. Scannell. 2012. "Rapid Non-Destructive Detection of Spoilage of Intact Chicken Breast Muscle Using Near-Infrared and Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics." *Food and Bioprocess Technology* 5(1):338–47.
- Argyri, Anthoula A., Efstathios Z. Panagou, and George-John E. Nychas. 2014. "Monitoring Microbial Spoilage of Foods by Vibrational Spectroscopy (FT-IR & Raman)." Pp. 394–442 in *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*. CRC Press.
- Arnaut-Rollier, Isabelle, Lieven De Zutter, and Jan Van Hoof. 1999. "Identities of the Pseudomonas Spp. in Flora from Chilled Chicken." *International Journal of Food*

Microbiology 48(2):87–96.

- Ayres, J. C. 1960. “The Relationship of Organisms of the Genus *Pseudomonas* to the Spoilage of Meat, Poultry and Eggs.” *Journal of Applied Bacteriology* 23(1960):471–86.
- Ayres, John C. 1955. “Microbiological Implications in the Handling, Slaughtering, and Dressing of Meat Animals.” *Advances in Food Research* 6(C):109–61.
- Barakat, R. K., M. W. Griffiths, and L. J. Harris. 2000. “Isolation and Characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* Spp. from Cooked, Modified Atmosphere Packaged, Refrigerated, Poultry Meat.” *International Journal of Food Microbiology* 62(1–2):83–94.
- Baranyi, József, and Terry A. Roberts. 1994. “A Dynamic Approach to Predicting Bacterial Growth in Food.” *International Journal of Food Microbiology* 23(3–4):277–94.
- Barlocco, N., A. Vadell, F. Ballesteros, G. Galiotta, and D. Cozzolino. 2006. “Predicting Intramuscular Fat, Moisture and Warner-Bratzler Shear Force in Pork Muscle Using near Infrared Reflectance Spectroscopy.” *Animal Science* 82(1):111–16.
- Belluco, S., L. Barco, A. Roccato, and A. Ricci. 2016. “*Escherichia Coli* and Enterobacteriaceae Counts on Poultry Carcasses along the Slaughterline: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Food Control* 60:269–80.
- Björkroth, Johanna. 2005. “Microbiological Ecology of Marinated Meat Products.” Pp. 477–80 in *Meat Science*. Vol. 70. Elsevier Ltd.
- Bjorkroth, K. J., R. Geisen, U. Schillinger, N. Weiss, P. De Vos, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala, and P. Vandamme. 2000. “Characterization of *Leuconostoc Gasicomitatum* Sp. Nov., Associated with Spoiled Raw Tomato-Marinaded Broiler Meat Strips Packaged under Modified-Atmosphere Conditions.” *Applied and Environmental Microbiology* 66(9):3764–72.
- Björkroth, K. Johanna, and Hannu J. Korkeala. 1997. “Use of RRNA Gene Restriction Patterns to Evaluate Lactic Acid Bacterium Contamination of Vacuum-Packaged Sliced Cooked Whole-Meat Product in a Meat Processing Plant.” *Applied and Environmental Microbiology* 63(2):448–53.
- Borch, Elisabeth, Marie Louise Kant-Muermans, and Ylva Blixt. 1996. “Bacterial Spoilage of Meat and Cured Meat Products.” *International Journal of Food Microbiology* 33(1):103–20.
- Borch, Elisabeth, and Göran Molin. 1989. “The Aerobic Growth and Product Formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, and *Carnobacterium* in Batch Cultures.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 30(1):81–88.
- Brereton, Richard G., and Gavin R. Lloyd. 2014. “Partial Least Squares Discriminant Analysis: Taking the Magic Away.” *Journal of Chemometrics* 28(4):213–25.
- Bruckner, Stefanie. 2010. “Predictive Shelf Life Model for the Improvement of Quality Management in Meat Chains.” Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany.
- Bruckner, Stefanie, Antonia Albrecht, Brigitte Petersen, and Judith Kreyenschmidt. 2012. “Characterization and Comparison of Spoilage Processes in Fresh Pork and Poultry.” *Journal of Food Quality* 35(5):372–82.

- Carlos, Angella Melissa A., and Mark A. Harrison. 1999. "Inhibition of Selected Microorganisms in Marinated Chicken by Pimento Leaf Oil and Clove Oleoresin." *Journal of Applied Poultry Research* 8(1):100–109.
- Carstensen, J. M., E. Panagou, and G. J. E. Nychas. n.d. *Quantitative Analysis of Meat Spoilage Using VIS/NIR Spectral Imaging*.
- Casaburi, Annalisa, Paola Piombino, George John Nychas, Francesco Villani, and Danilo Ercolini. 2015. "Bacterial Populations and the Volatilome Associated to Meat Spoilage." *Food Microbiology* 45(PA):83–102.
- Castellano, Patricia H., Wilhelm H. Holzapfel, and Graciela M. Vignolo. 2004. "The Control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in Broth and Meat Slurry with the Bacteriocinogenic Strain *Lactobacillus casei* CRL705." *Food Microbiology* 21(3):291–98.
- Chouliara, E., A. Karatapanis, I. N. Savvaidis, and M. G. Kontominas. 2007. "Combined Effect of Oregano Essential Oil and Modified Atmosphere Packaging on Shelf-Life Extension of Fresh Chicken Breast Meat, Stored at 4 °C." *Food Microbiology* 24(6):607–17.
- Creed, P. G. 2010. "Chemical Deterioration and Physical Instability in Ready-to-Eat Meals and Catered Foods." Pp. 608–62 in *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*. Elsevier Inc.
- Dainty, R. H. 1996. "Chemical/Biochemical Detection of Spoilage." *International Journal of Food Microbiology* 33(1):19–33.
- DAINTY, R. H., R. A. EDWARDS, C. M. HIBBARD, and J. J. MARNEWICK. 1989. "Volatile Compounds Associated with Microbial Growth on Normal and High PH Beef Stored at Chill Temperatures." *Journal of Applied Bacteriology* 66(4):281–89.
- Daugaard, Søren Blond, Jens Adler-Nissen, and Jens Michael Carstensen. 2010. "New Vision Technology for Multidimensional Quality Monitoring of Continuous Frying of Meat." *Food Control* 21(5):626–32.
- Dave, D., and Abdel E. Ghaly. 2011. "Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review." *American Journal of Agricultural and Biological Science* 6(4):486–510.
- Dissing, Bjørn. 2011. "New Vision Technology for Multidimensional Quality Monitoring of Food Processes." Technical University of Denmark.
- Dominguez, Silvia A., and Donald W. Schaffner. 2007. "Development and Validation of a Mathematical Model to Describe the Growth of *Pseudomonas* Spp. in Raw Poultry Stored under Aerobic Conditions." *International Journal of Food Microbiology* 120(3):287–95.
- Doulgeraki, Agapi I., Danilo Ercolini, Francesco Villani, and George John E. Nychas. 2012. "Spoilage Microbiota Associated to the Storage of Raw Meat in Different Conditions." *International Journal of Food Microbiology* 157(2):130–41.
- Dufour, Éric. 2009. "Principles of Infrared Spectroscopy." in *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier Inc.
- Dušková, Marta, Josef Kameník, and Renáta Karpíšková. 2013. "Weissella Viridescens in

- Meat Products - A Review.” *Acta Veterinaria Brno* 82(3):237–41.
- Edwards, R. A., R. H. Dainty, and C. M. Hibbard. 1987. “Volatile Compounds Produced by Meat Pseudomonads and Related Reference Strains during Growth on Beef Stored in Air at Chill Temperatures.” *Journal of Applied Bacteriology* 62(5):403–12.
- Egan, A. F., B. J. Shay, and P. J. Rogers. 1989. “Factors Affecting the Production of Hydrogen Sulphide by *Lactobacillus Sake* L13 Growing on Vacuum-packaged Beef.” *Journal of Applied Bacteriology* 67(3):255–62.
- Ellis, David I., David Broadhurst, Douglas B. Kell, Jem J. Rowland, and Royston Goodacre. 2002. “Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning.” *Applied and Environmental Microbiology* 68(6):2822–28.
- Elmasry, Gamal, Douglas F. Barbin, Da Wen Sun, and Paul Allen. 2012. “Meat Quality Evaluation by Hyperspectral Imaging Technique: An Overview.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(8):689–711.
- Ercolini, Danilo, Federica Russo, Antonella Nasi, Pasquale Ferranti, and Francesco Villani. 2009. “Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential in Vitro and in Beef.” *Applied and Environmental Microbiology* 75(7):1990–2001.
- Ercolini, Danilo, Federica Russo, Elena Torrieri, Paolo Masi, and Francesco Villani. 2006. “Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions.” *Applied and Environmental Microbiology* 72(7):4663–71.
- Estelles-Lopez, Lucia, Athina Ropodi, Dimitris Pavlidis, Jenny Fotopoulou, Christina Gkousari, Audrey Peyrodie, Efstathios Panagou, George John Nychas, and Fady Mohareb. 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(Pt 1):206–15.
- Feng, Chao Hui, Yoshio Makino, Seiichi Oshita, and Juan Francisco García Martín. 2018. “Hyperspectral Imaging and Multispectral Imaging as the Novel Techniques for Detecting Defects in Raw and Processed Meat Products: Current State-of-the-Art Research Advances.” *Food Control* 84:165–76.
- Feng, Yao-Ze, and Da-Wen Sun. 2013. “Near-Infrared Hyperspectral Imaging in Tandem with Partial Least Squares Regression and Genetic Algorithm for Non-Destructive Determination and Visualization of *Pseudomonas* Loads in Chicken Fillets.”
- Feng, Yao Ze, and Da Wen Sun. 2013. “Near-Infrared Hyperspectral Imaging in Tandem with Partial Least Squares Regression and Genetic Algorithm for Non-Destructive Determination and Visualization of *Pseudomonas* Loads in Chicken Fillets.” *Talanta* 109:74–83.
- Fengou, LEMONIA Christina, Evgenia Spyrelli, Alexandra Lianou, Panagiotis Tsakanikas, Efstathios Z. Panagou, and George John E. Nychas. 2019. “Estimation of Minced Pork Microbiological Spoilage through Fourier Transform Infrared and Visible Spectroscopy and Multispectral Vision Technology.” *Foods* 8(7).
- Folm-Hansen, Jørgen. 1999. *On Chromatic and Geometrical Calibration*.
- Gallo, L., R. E. Schmitt, and W. Schmidt-Lorenz. 1988. “Microbial Spoilage of Refrigerated

- Fresh Broilers. I. Bacterial Flora and Growth during Storage.” *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie* 21(4):216–23.
- Gardner, Julian W., and Philip N. Bartlett. 1994. “A Brief History of Electronic Noses.” *Sensors and Actuators: B. Chemical* 18(1–3):210–11.
- Geornaras, Ifigenia, Amelia De Jesus, Elsabé Van Zyl, and Alexander Von Holy. 1995. “Microbiological Survey of a South African Poultry Processing Plant.” *Journal of Basic Microbiology* 35(2):73–82.
- Gerez, Carla Luciana, Maria Ines Torino, Graciela Rollán, and Graciela Font de Valdez. 2009. “Prevention of Bread Mould Spoilage by Using Lactic Acid Bacteria with Antifungal Properties.” *Food Control* 20(2):144–48.
- Gill, C. O. 1996. “Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats.” *Meat Science* 43(SUPPL. 1):99–109.
- Gill, C. O. 2005. “Sources of Microbial Contamination at Slaughtering Plants.” Pp. 231–43 in *Improving the Safety of Fresh Meat*, edited by John Sofos. Woodhead Publishing.
- Gill, C. O., and K. G. Newton. 1980. “Growth of Bacteria on Meat at Room Temperatures.” *Journal of Applied Bacteriology* 49(2):315–23.
- Gong, Jianhua, Robert J. Forster, Hai Yu, James R. Chambers, Parviz M. Sabour, Roger Wheatcroft, and Shu Chen. 2002. “Diversity and Phylogenetic Analysis of Bacteria in the Mucosa of Chicken Ceca and Comparison with Bacteria in the Cecal Lumen.” *FEMS Microbiology Letters* 208(1):1–7.
- González-Fandos, Elena, Bárbara Herrera, and Naiara Maya. 2009. “Efficacy of Citric Acid against *Listeria Monocytogenes* Attached to Poultry Skin during Refrigerated Storage.” *International Journal of Food Science and Technology* 44(2):262–68.
- Gospavic, Radovan, Judith Kreyenschmidt, Stefanie Bruckner, Viktor Popov, and Nasimul Haque. 2008. “Mathematical Modelling for Predicting the Growth of *Pseudomonas* Spp. in Poultry under Variable Temperature Conditions.” *International Journal of Food Microbiology* 127(3):290–97.
- Gowen, Aoife A., Yaoze Feng, Edurne Gaston, and Vasilis Valdramidis. 2015. “Recent Applications of Hyperspectral Imaging in Microbiology.” *Talanta* 137:43–54.
- Gram, Lone, Lars Ravn, Maria Rasch, Jesper Bartholin Bruhn, Allan B. Christensen, and Michael Givskov. 2002. “Food Spoilage - Interactions between Food Spoilage Bacteria.” *International Journal of Food Microbiology* 78(1–2):79–97.
- Gromski, Piotr S., Howbeer Muhamadali, David I. Ellis, Yun Xu, Elon Correa, Michael L. Turner, and Royston Goodacre. 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.
- Gromski, Piotr S., Yun Xu, Elon Correa, David I. Ellis, Michael L. Turner, and Royston Goodacre. 2014. “A Comparative Investigation of Modern Feature Selection and Classification Approaches for the Analysis of Mass Spectrometry Data.” *Analytica Chimica Acta* 829:1–8.
- Harada, Tetsuya, Van Chinh Dang, Do Phuc Nguyen, Thi Anh Dao Nguyen, Mitsuo Sakamoto, Moriya Ohkuma, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Kotaro Uchida,

- Michio Jinnai, Shinya Yonogi, Ryuji Kawahara, Masashi Kanki, Takao Kawai, Yuko Kumeda, and Yoshimasa Yamamoto. 2016. "Enterococcus Saigonensis Sp. Nov., Isolated from Retail Chicken Meat and Liver." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(10):3779–85.
- Hawkins, Samantha A., Brian Bowker, Hong Zhuang, Gary Gamble, and Ronald Holser. 2014. "Post-Mortem Chemical Changes in Poultry Breast Meat Monitored With Visible-Near Infrared Spectroscopy." *Journal of Food Research* 3(3):57.
- Höll, Linda, Jürgen Behr, and Rudi F. Vogel. 2016. "Identification and Growth Dynamics of Meat Spoilage Microorganisms in Modified Atmosphere Packaged Poultry Meat by MALDI-TOF MS." *Food Microbiology* 60:84–91.
- Horváth, Kinga M., Zs Seregély, I. Dalmadi, Éva Andrásy, and J. Farkas. 2007. "Estimation of Bacteriological Spoilage of Pork Cutlets by Electronic Nose." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54(2):179–94..
- Illikoud, Nassima, Albert Rossero, Romain Chauvet, Philippe Courcoux, Marie France Pilet, Thomas Charrier, Emmanuel Jaffrès, and Monique Zagorec. 2019. "Genotypic and Phenotypic Characterization of the Food Spoilage Bacterium *Brochothrix Thermosphacta*." *Food Microbiology* 81:22–31.
- Insausti, K., M. J. Beriain, C. Gorraiz, and A. Purroy. 2002. "Volatile Compounds of Raw Beef from 5 Local Spanish Cattle Breeds Stored under Modified Atmosphere." *Journal of Food Science* 67(4):1580–89.
- Ioannis S. Boziaris, and Foteini F. Parlapani. 2017. "Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish." Pp. 61–98 in *The Microbiological Quality of Food*, edited by Antonio Bevilacqua, Maria Rosaria Corbo, and Milena Sinigaglia. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Ismail, S. A. S., T. Deak, H. A. Abd El-Rahman, M. A. M. Yassien, and L. R. Beuchat. 2000. "Presence and Changes in Populations of Yeasts on Raw and Processed Poultry Products Stored at Refrigeration Temperature." *International Journal of Food Microbiology* 62(1–2):113–21.
- John Wiley, and Sons. 2016. "Spoilage of Meat and Meat Products." Pp. 279–95 in *Food Microbiology: Principles into Practice*. Wiley.
- Karoui, Romdhane, Abdul Mounem Mouazen, Éric Dufour, Laurent Pillonel, Emmanuelle Schaller, Josse De Baerdemaeker, and Jacques Olivier Bosset. 2006. "Chemical Characterisation of European Emmental Cheeses by near Infrared Spectroscopy Using Chemometric Tools." *International Dairy Journal* 16(10):1211–17.
- Kilcast David, and Subramaniam Persis. 2000. *The Stability and Shelf-Life of Food*. 1st ed. UK: Woodhead Publishing.
- Koort, Joanna, Anna Murros, Tom Coenye, Susanna Eerola, Peter Vandamme, Antti Sukura, and Johanna Björkroth. 2005. "Lactobacillus Oligofermentans Sp. Nov., Associated with Spoilage of Modified-Atmosphere-Packaged Poultry Products." *Applied and Environmental Microbiology* 71(8):4400–4406.
- Korkeala, H., T. Alanko, P. Mäkelä, and S. Lindroth. 1989. "Shelf-Life of Vacuum-Packed Cooked Ring Sausages at Different Chill Temperatures." *International Journal of Food Microbiology* 9(3):237–47.

- Koutsoumanis, K., A. Stamatiou, P. Skandamis, and G. J. E. Nychas. 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):124–34.
- Koutsoumanis, K., and P. S. Taoukis. 2005. "Meat Safety, Refrigerated Storage and Transport: Modeling and Management." Pp. 503–61 in *Improving the Safety of Fresh Meat*. Elsevier Inc.
- Kreyenschmidt Judith, and Ibaldo Rolf. 2012. "Modeling Shelf Life Using Microbial Indicators." Pp. 127–68 in *Shelf Life Assessment of Food*, edited by Maria Cristina Nicoli. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Labuza, T. P., and B. Fu. 1993. "Growth Kinetics for Shelf-Life Prediction: Theory and Practice." *Journal of Industrial Microbiology* 12(3–5):309–23.
- Lawrie, R. A., and David Ledward. 2006. *Lawrie's Meat Science: Seventh Edition*.
- Leistner, L., and L. G. M. Gorris. 1995. "Food Preservation by Hurdle Technology." *Trends in Food Science and Technology* 6(2):41–46.
- Leistner, Lothar. 2000. *Basic Aspects of Food Preservation by Hurdle Technology*. Vol. 55.
- Loutfi, Amy, Silvia Coradeschi, Ganesh Kumar Mani, Prabakaran Shankar, and John Bosco Balaguru Rayappan. 2015. "Electronic Noses for Food Quality: A Review." *Journal of Food Engineering* 144:103–11.
- Lu, Jiangrang, Umelaalim Idris, Barry Harmon, Charles Hofacre, John J. Maurer, and Margie D. Lee. 2003. "Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken." *Applied and Environmental Microbiology* 69(11):6816–24.
- Lucianez, A., M. A. Holmes, and A. W. Tucker. 2010. "Relationships between Processing Delay and Microbial Load of Broiler Neck Skin Samples." *Journal of Food Protection* 73(1):26–31.
- Lytou, Anastasia, Efstathios Z. Panagou, and George John E. Nychas. 2016. "Development of a Predictive Model for the Growth Kinetics of Aerobic Microbial Population on Pomegranate Marinated Chicken Breast Fillets under Isothermal and Dynamic Temperature Conditions." *Food Microbiology* 55:25–31.
- Mahrour, A., S. Caillet, J. Nketsa-Tabiri, and And M. Lacroix. 2003. *Microbial and Sensory Quality of Marinated and Irradiated Chicken*. Vol. 66.
- Manthou, Evanthia, Sergio Llaneza Lago, Evaggelos Dagres, Alexandra Lianou, Panagiotis Tsakanikas, Efstathios Z. Panagou, Maria Anastasiadi, Fady Mohareb, and George John E. Nychas. 2020. "Application of Spectroscopic and Multispectral Imaging Technologies on the Assessment of Ready-to-Eat Pineapple Quality: A Performance Evaluation Study of Machine Learning Models Generated from Two Commercial Data Analytics Tools." *Computers and Electronics in Agriculture* 175.
- McMeekin, T. A. 2007. "Predictive Microbiology: Quantitative Science Delivering Quantifiable Benefits to the Meat Industry and Other Food Industries." *Meat Science* 77(1 SPEC. ISS.):17–27.
- Mead, G. C. 1985. "Enumeration of Pseudomonads Using Cephaloridine-Fucidin-Cetrimide Agar (CFC)." *International Journal of Food Microbiology* 2(1–2):21–26.

- Mead, G. C. 2004. "Microbiological Quality of Poultry Meat: A Review." *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 6(3):135–42.
- Mead, G. C., and B. W. Adams. 1977. "A Selective Medium for the Rapid Isolation of Pseudomonads Associated with Poultry Meat Spoilage." *British Poultry Science* 18(6):661–70.
- Miller, R. K. 2002. "Factors Affecting the Quality of Raw Meat." Pp. 27–63 in *Meat processing: improving quality*, edited by Joseph Kerry, John Kerry, and David Ledward. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Mohareb, Fady, Maite Iriondo, Agapi I. Doulgeraki, Angela Van Hoek, Henk Aarts, Michael Cauchi, and George John E. Nychas. 2015. "Identification of Meat Spoilage Gene Biomarkers in Pseudomonas Putida Using Gene Profiling." *Food Control* 57:152–60.
- Nieminen, T. T., H. Väitalo, E. Säde, A. Paloranta, K. Koskinen, and J. Björkroth. 2012. "The Effect of Marination on Lactic Acid Bacteria Communities in Raw Broiler Fillet Strips." *Frontiers in Microbiology* 3(OCT).
- Nychas, G. J., and J. S. Arkoudelos. 1990. *Microbiological and Physicochemical Changes in Minced Meats under Carbon Dioxide, Nitrogen or Air at 3°C*. Vol. 25.
- Nychas, G. J. E., D. Marshall, and J. Sofos. 2007. "Meat Poultry and Seafood. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat & T. J. Montville, *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, (Chapter 6). ASM Press" edited by M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville.
- Nychas, G. J. E., and P. N. Skandamis. 2005. *Fresh Meat Spoilage and Modified Atmosphere Packaging (MAP)*. Woodhead Publishing Limited.
- Nychas, G. J. E., P. N. Skandamis, C. C. Tassou, and K. P. Koutsoumanis. 2008. "Meat Spoilage during Distribution." *Meat Science* 78(1–2):77–89.
- Nychas, G. J. E., and C. C. Tassou. 1997. "Spoilage Process and Proteolysis in Chicken as Noted by HPLC Method." *Journal of Science Food and Agriculture* 74(1985):199–208.
- Nychas, George John, Efstathios Z. Panagou, and Fady Mohareb. 2016. "Novel Approaches for Food Safety Management and Communication." *Current Opinion in Food Science* 12:13–20.
- Panagou, Efstathios Z., Olga Papadopoulou, Jens Michael Carstensen, and George-John E. Nychas. 2014. "Potential of Multispectral Imaging Technology for Rapid and Non-Destructive Determination of the Microbiological Quality of Beef Filets during Aerobic Storage." *International Journal of Food Microbiology* 174:1–11.
- Papadopoulou, O., E. Z. Panagou, C. C. Tassou, and G. J. E. Nychas. 2011. "Contribution of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Data on the Quantitative Determination of Minced Pork Meat Spoilage." *Food Research International* 44(10):3264–71.
- Pérez Pavón, José Luis, Miguel Del Nogal Sánchez, Carmelo García Pinto, Ma Esther Fernández Laespada, Bernardo Moreno Cordero, and Armando Guerrero Peña. 2006. "Strategies for Qualitative and Quantitative Analyses with Mass Spectrometry-Based Electronic Noses." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25(3):257–66.
- Peris, Miguel, and Laura Escuder-Gilabert. 2009a. "A 21st Century Technique for Food

- Control: Electronic Noses.” *Analytica Chimica Acta* 638(1):1–15.
- Peris, Miguel, and Laura Escuder-Gilabert. 2009b. “A 21st Century Technique for Food Control: Electronic Noses.” *Analytica Chimica Acta* 638(1):1–15.
- Philip G. Chambers, and Temple Grandin. 2001. *Guidelines for Humane Handling, Transport and Slaughter of Livestock*. edited by Gunter Heinz and Thinnarat Srisuvan. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific.
- Pin, Carmen, Gonzalo D. García De Fernando, and Juan A. Ordóñez. 2002. “Effect of Modified Atmosphere Composition on the Metabolism of Glucose by *Brochothrix Thermosphacta* Downloaded From.” *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 68(9):4441–47.
- Pooni, G. S., and G. C. Mead. 1984. “Prospective Use of Temperature Function Integration for Predicting the Shelf-Life of Non-Frozen Poultry-Meat Products.” *Food Microbiology* 1(1):67–78.
- Pu, Hongbin, Mohammed Kamruzzaman, and Da Wen Sun. 2015. “Selection of Feature Wavelengths for Developing Multispectral Imaging Systems for Quality, Safety and Authenticity of Muscle Foods-a Review.” *Trends in Food Science and Technology* 45(1):86–104.
- Rahkila, Riitta, Per Johansson, Elina Säde, and Johanna Björkroth. 2011. “Identification of Enterococci from Broiler Products and a Broiler Processing Plant and Description of *Enterococcus Viikkiensis* Sp. Nov.” *Applied and Environmental Microbiology* 77(4):1196–1203.
- Rajamäki, Tiina, Hanna Leena Alakomi, Tiina Ritvanen, Eija Skyttä, Maria Smolander, and Raija Ahvenainen. 2006. “Application of an Electronic Nose for Quality Assessment of Modified Atmosphere Packaged Poultry Meat.” *Food Control* 17(1):5–13.
- Raposo António, PérezEsteban, de Faria Catarina Tinoco, Ferrús María Antonia, and Carrascosa Conrado. 2017. “Food Spoilage by *Pseudomonas* Spp.—An Overview.” Pp. 41–58 in *Food Borne Pathogens and Antibiotic Resistance*, edited by Singh Om V. Hoboken, NJ, USA,: John Wiley & Sons.
- Ratkowsky, D. A., J. Olley, T. A. McMeekin, and A. Ball. 1982. “Relationship between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures.” *Journal of Bacteriology* 149(1):1–5.
- Ropodi, A. I., E. Z. Panagou, and G. J. E. Nychas. 2016. “Data Mining Derived from Food Analyses Using Non-Invasive/Non-Destructive Analytical Techniques; Determination of Food Authenticity, Quality & Safety in Tandem with Computer Science Disciplines.” *Trends in Food Science and Technology* 50:11–25.
- Rouger, Amélie, Odile Tresse, and Monique Zagorec. 2017. “Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics.” *Microorganisms* 5(3):50.
- Säde, Elina, Anna Murros, and Johanna Björkroth. 2013. “Predominant Enterobacteria on Modified-Atmosphere Packaged Meat and Poultry.” *Food Microbiology* 34(2):252–58.
- Samelis, John. 2006. “Managing Microbial Spoilage in the Meat Industry.” Pp. 213–86 in *Food spoilage microorganisms*. Elsevier Ltd.

- Schaller, Emmanuelle, Jacques O. Bosset, and Felix Escher. 1998. "Electronic Noses' and Their Application to Food." *LWT - Food Science and Technology* 31(4):305–16.
- Schirmer, B. C., E. Heir, and S. Langsrud. 2009. "Characterization of the Bacterial Spoilage Flora in Marinated Pork Products." *Journal of Applied Microbiology* 106(6):2106–16.
- Schmitt, Jürgen, and Hans Curt Flemming. 1998. "FTIR-Spectroscopy in Microbial and Material Analysis." *International Biodeterioration and Biodegradation* 41(1):1–11.
- Serraino, Andrea, Lia Bardasi, Raffaella Riu, Valentina Pizzamiglio, Gaetano Liuzzo, Giorgio Galletti, Federica Giacometti, and Giuseppe Merialdi. 2012. "Visual Evaluation of Cattle Cleanliness and Correlation to Carcass Microbial Contamination during Slaughtering." *Meat Science* 90(2):502–6.
- Soncin, S., L. M. Chiesa, C. Cantoni, and P. A. Biondi. 2007. "Preliminary Study of the Volatile Fraction in the Raw Meat of Pork, Duck and Goose." *Journal of Food Composition and Analysis* 20(5):436–39.
- Spyrelli, Evgenia D., Agapi I. Doulgeraki, Anthoula A. Argyri, Chrysoula C. Tassou, Efstathios Z. Panagou, and E. Nychas George-John. 2020. "Implementation of Multispectral Imaging (MSI) for Microbiological Quality Assessment of Poultry Products." *Microorganisms* 8(4).
- Spyrelli, Evgenia D., Onur Ozcan, Fady Mohareb, Efstathios Z. Panagou, and George John E. Nychas. 2021. "Spoilage Assessment of Chicken Breast Fillets by Means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multispectral Image Analysis." *Current Research in Food Science* 4:121–31.
- Stanborough, Tamsyn, Narelle Fegan, Shane M. Powell, Tanoj Singh, Mark Tamplin, and P. Scott Chandry. 2018. "Genomic and Metabolic Characterization of Spoilage-Associated Pseudomonas Species." *International Journal of Food Microbiology* 268(September 2017):61–72.
- Sundheim, G., A. Sletten, and R. H. Dainty. 1998. "Identification of Pseudomonads from Fresh and Chill-Stored Chicken Carcasses." *International Journal of Food Microbiology* 39(3):185–94.
- Teena, M., A. Manickavasagan, A. Mothershaw, S. El Hadi, and D. S. Jayas. 2013. "Potential of Machine Vision Techniques for Detecting Fecal and Microbial Contamination of Food Products: A Review." *Food and Bioprocess Technology* 6(7):1621–34.
- Tian, Xiaojing, Jun Wang, and Shaoqing Cui. 2013. "Analysis of Pork Adulteration in Minced Mutton Using Electronic Nose of Metal Oxide Sensors." *Journal of Food Engineering* 119(4):744–49.
- Tom Ross, and Paw Dalgaard. 2004. "Secondary Models." Pp. 63–150 in *Modeling microbial response in food*, edited by Robin C McKellar and Xuewen Lu. Washington D.C: CRC Press.
- Tsakanikas, Panagiotis, Dimitris Pavlidis, and George John Nychas. 2015. "High Throughput Multispectral Image Processing with Applications in Food Science." *PLoS ONE* 10(10):e0140122.
- USDA-FSIS. 1996. "Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule." *Federal Register* 61(144):38839.

- Viljoen, B. C., I. Geornaras, A. Lamprecht, and A. Von Holy. 1998. "Yeast Populations Associated with Processed Poultry." *Food Microbiology* 15(1):113–17.
- van de Voort, F. R. 1992. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy Applied to Food Analysis." *Food Research International* 25(5):397–403.
- Wickramasinghe, Nirmani N., Joshua Ravensdale, Ranil Coorey, Scott P. Chandry, and Gary A. Dykes. 2019. "The Predominance of Psychrotrophic Pseudomonads on Aerobically Stored Chilled Red Meat." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18(5):1622–35.
- Wold, Svante, Michael Sjöström, and Lennart Eriksson. 2001. "PLS-Regression: A Basic Tool of Chemometrics." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58(2):109–30.
- Xu, Guojie, Caili Liao, Xiaolei Ren, Xue Zhang, Xinyue Zhang, Siqi Liu, Xiaorui Fu, Haozhong Wu, Luqi Huang, Chunsheng Liu, and Xueyong Wang. 2014. "Rapid Assessment of Quality of Deer Antler Slices by Using an Electronic Nose Coupled with Chemometric Analysis." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24(6):716–21.
- Xu, Y. Zh., A. Anyogu, L. I. I. Ouoba, and J. P. Sutherland. 2010. "Genotypic Characterization of *Brochothrix* Spp. Isolated from Meat, Poultry and Fish." *Letters in Applied Microbiology* 51(3):245–51.
- Yusop, Salma M., Maurice G. O'Sullivan, John F. Kerry, and Joseph P. Kerry. 2010. "Effect of Marinating Time and Low PH on Marinade Performance and Sensory Acceptability of Poultry Meat." *Meat Science* 85(4):657–63.
- Zhang, Q. Q., Y. Q. Han, J. X. Cao, X. L. Xu, G. H. Zhou, and W. Y. Zhang. 2012. "The Spoilage of Air-Packaged Broiler Meat during Storage at Normal and Fluctuating Storage Temperatures." *Poultry Science* 91(1):208–14.
- Zhou, G. H., X. L. Xu, and Y. Liu. 2010. "Preservation Technologies for Fresh Meat – A Review." *MESC* 86:119–28.
- Zwietering, Marcel H., Taco Wiltzes, Frank M. Rombouts, and Klaas van't Riet. 1993. "A Decision Support System for Prediction of Microbial Spoilage in Foods." *Journal of Industrial Microbiology* 12(3–5):324–29.
- Μπαλατσούρας Γεώργιος. 2006. *Μικροβιολογία Τροφίμων*. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΒΡΥΟ.
- Hinkle, D. E., Wiersma, W., & Jurs, S. G. (2003). *Applied statistics for the behavioral sciences*. Boston, Mass: Houghton Mifflin.