



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Αξιολόγηση σύγχρονων μεθόδων για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης
και τον διαχωρισμό φρέσκων-αποψυγμένων φιλέτων από μπούτι κοτόπουλου

Γεώργιος Τ. Τσέκος

Επιβλέπων καθηγητής:
Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Διατριβή

Αξιολόγηση σύγχρονων μεθόδων για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης και τον διαχωρισμό φρέσκων-αποψυγμένων φιλέτων από μπούτι κοτόπουλου

Evaluation of contemporary methods for the assessment of microbiological spoilage and discrimination of fresh-thawed chicken thigh fillets

Γεώργιος Τ. Τσέκος

Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αξιολόγηση σύγχρονων μεθόδων για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης και τον ποιοτικό διαχωρισμό φιλέτων από μπούτι κοτόπουλου σε αερόβιες και υπό κενό συνθήκες

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παγκόσμια παραγωγή κρέατος και ιδιαίτερα του κοτόπουλου αναμένεται να αυξηθεί παγκοσμίως για τα επόμενα 10 χρόνια. Μεγαλύτερη παραγωγή σημαίνει και μεγαλύτερη σπατάλη, εξαιτίας της γρήγορης αλλοίωσης, κάτι που θα πρέπει να σταματήσει να είναι αποδεκτό, αν υπολογιστεί και η επικείμενη αύξηση του πληθυσμού. Προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση γίνονται τα τελευταία χρόνια, για την εύρεση και ανάπτυξη σύγχρονων, μη-επεμβατικών και ταχείων μεθόδων για την εκτίμηση της αλλοίωσης και γενικότερα τη διάρκεια ζωής των νωπών και επεξεργασμένων κρεάτων. Δύο από αυτές τις μεθόδους είναι η πολυφασματική απεικόνιση και η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier. Αυτή η εργασία, έχει σαν βασικό στόχο την συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων, των πειραμάτων αλλοίωσης φιλέτου από μπούτι κοτόπουλου, με τα δεδομένα που προέκυψαν από αυτές τις μεθόδους. Τα δεδομένα που προέκυψαν, αξιοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και κατασκευή γραμμικών μοντέλων που έχουν ως στόχο τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του βαθμού αλλοίωσης του κοτόπουλου. Επιπλέον, η μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης και η υπέρυθρη φασματοσκοπία αξιολογήθηκαν για την ικανότητα των μοντέλων τους να διαχωρίσουν φρέσκα με κατεψυγμένα δείγματα κοτόπουλου, ανάγκη που προέκυψε από τα συχνά φαινόμενα απάτης τροφίμων.

Για αυτό το σκοπό έλαβαν χώρα τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα συντήρησης φιλέτων από μπούτι κοτόπουλο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας. Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν στα δείγματα από μπούτι κοτόπουλου ήταν, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, της οικογένειας Enterobacteriaceae, το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S, ζύμες και μύκητες. Ειδικότερα, τα φιλέτα συντηρήθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, τους 0, 5 και 10°C σε διαφορετικό χρονικό διάστημα για την κάθε δειγματοληψία. Στα δύο ανεξάρτητα πειράματα αξιολογήθηκαν οι αερόβιες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας, ενώ στα άλλα δύο χρησιμοποιήθηκαν συσκευασίες υπό κενό. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (24-48 ώρες)

γίνονταν δειγματοληψία σε 4 δείγματα για κάθε θερμοκρασία και στην συνέχεια εφαρμόζονταν οι δύο φασματοσκοπικές μέθοδοι.

Για την κατασκευή των μοντέλων συσχέτισης με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, ως δείγματα ανάπτυξης και επικύρωσης αξιοποιήθηκαν τα δείγματα των 0 και 10⁰C, ενώ για την πρόβλεψη αυτά που συντηρήθηκαν στους 5⁰C και για τις δύο συσκευασίες. Ο συνολικός αριθμός φιλέτων κοτόπουλο που αναλύθηκαν είναι 333 και για κάθε ένα δείγμα συλλέχθηκαν 36 φασματοσκοπικά δεδομένα (18 Mean και 18 SD) για το MSI και 1038 κυματαριθμοί για το FTIR. Οι μετασχηματισμοί SNV και Savitzky-Golay εφαρμόστηκαν για την βελτιστοποίηση των δεδομένων. Η κατασκευή του μοντέλου για την εκτίμηση της OMX στο κοτόπουλο έγινε μέσω του αλγόριθμου της γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Για τον ποιοτικό διαχωρισμό φρέσκων με κατεψυγμένα δείγματα κοτόπουλου ορίστηκαν δύο κλάσεις, κατεψυγμένα (κλάση 1), φρέσκα (κλάση 2) και έγινε χρήση του αλγορίθμου της διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα πολυφασματικά δεδομένα (36 για MSI, 1038 για FTIR) για τα δύο μοντέλα, ενώ ως εξαρτημένη ο πληθυσμός της OMX για το μοντέλο PLS-R και οι δύο κλάσεις σε δυαδική μορφή για το μοντέλο PLS-DA.

Στα μικροβιολογικά αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι κυρίως η θερμοκρασία, και δευτερευόντως η συσκευασία επηρέασαν σε σημαντικό βαθμό τη μικροβιολογική αλλοίωση στο μπούτι από κοτόπουλο. Για την αερόβια συσκευασία σαν αλλοιωγόνος μικροοργανισμός κυριάρχησαν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, ενώ για όλα τα είδη των μικροοργανισμών, προκύπτει αύξηση της μικροβιακής ανάπτυξης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και η χρονική διάρκεια της συντήρησης. Στις συνθήκες συσκευασίας υπό κενό, η αλλοίωση των δειγμάτων κοτόπουλου φάνηκε να προήλθε από τη συνεργιστική δράση των ψευδομονάδων, του βακτηρίου *Bacillus thermosphacta* και αυτών που παράγουν H₂S, χωρίς να επικρατεί κάποιος ξεκάθαρα. Όσον αφορά τη θερμοκρασία εξάγεται το ίδιο συμπέρασμα με αυτό των αερόβιων συνθηκών. Να αναφερθεί ότι ο ρυθμός της αλλοίωσης για την OMX ήταν σημαντικά μικρότερος για τις συνθήκες συσκευασίας υπό κενό.

Τα μοντέλα PLS-R για την εκτίμηση της OMX έδειξαν καλύτερη επίδοση με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, παρά με αυτά της φασματοσκοπίας υπέρυθρου. Πιο συγκεκριμένα, για την MSI κατά την πρόβλεψη, η τιμή του RMSE ισούται με 0.57 για τις

δύο συνθήκες συσκευασίας, ενώ αυτή του R^2 ισούται με 0.87 και 0.83 για τις αερόβιες και υπό κενό συνθήκες αντίστοιχα. Τα μήκη κύματος που επηρεάζουν την επίδοση του μοντέλου φαίνεται να σχετίζονται με την μυογλοβίνη, την οξυμυογλοβίνη και τη μεταμυογλοβίνη. Οι αντίστοιχες τιμές για το μοντέλο με τα δεδομένα του FTIR μετρήθηκαν $RMSE = 1.03$, $R^2 = 0.59$ για τις αερόβιες και $RMSE = 0.69$, $R^2 = 0.76$ για τις αναερόβιες συνθήκες. Τα αντίστοιχα μήκη κύματος που επηρεάζουν το μοντέλο σε αυτή την περίπτωση μπορούν να συσχετιστούν με την πρωτεολυτική δράση της μικροχλωρίδας του κοτόπουλου.

Τα μοντέλα PLS-DA κατάφεραν σε σημαντικό βαθμό τον διαχωρισμό των δύο κλάσεων και ειδικότερα αυτά με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, αφού επέδειξαν συνολική ακρίβεια πρόβλεψης στο 87.50%. Στο μοντέλου διαχωρισμού με τα δεδομένα της υπέρυθρης φασματοσκοπίας η συνολική ακρίβεια πρόβλεψης ανήλθε στο 77.97%.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, σε συνδυασμό με τις τροποποιημένες συνθήκες υπό κενό ελάττωσαν σημαντικά τον ρυθμό αλλοίωσης των δειγμάτων από μούτι κοτόπουλο. Τα γραμμικά μοντέλα προσδιορισμού της OMX και αυτά για τον ποιοτικό διαχωρισμό των δύο κλάσεων των δειγμάτων κατάφεραν να αποδώσουν σε αρκετά ικανοποιητικό επίπεδο. Η βελτίωση των μοντέλων θα μπορούσε να επιτευχθεί με την αύξηση των δειγμάτων, ενώ παράλληλα θα μπορούσε να διερευνηθεί η συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα πολυφασματικά μέσα από μη-γραμμικά μοντέλα.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: φιλέτο μούτι κοτόπουλο, αλλοίωση, πολυφασματική απεικόνιση, φασματοσκοπία υπέρυθρου, μοντέλα εκτίμησης, νοθεία τροφίμων

Evaluation of new methods for the assessment of microbiological spoilage and quality discrimination of chicken thigh fillets in aerobic conditions and vacuum

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

ABSTRACT

Global meat production, especially chicken, is expected to increase worldwide over the next 10 years. Higher production also means more waste, due to rapid spoilage, which should cease to be acceptable, given the impending increase in population. Efforts in this direction have been made in recent years, to find and develop new, non-invasive and rapid methods for the assessment of spoilage and in general the shelf life of fresh and processed meats. Two of these methods are multispectral imaging and Fourier transform infrared spectroscopy. The main purpose of this work is to correlate the microbiological results of the chicken thigh fillet experiments with the data obtained from these methods. The resulting data were used for the development and construction of linear models aimed at quantitative determination of the degree of spoilage in chicken. In addition, multispectral imaging and infrared spectroscopy were evaluated for their model's ability to distinguish fresh and frozen chicken samples, a need arising from the frequent occurrence of food fraud.

For this purpose, four independent experiments were performed for the preservation of chicken thigh fillets in different conditions of temperature and atmosphere. The microorganisms identified in the chicken thigh samples were Total Viable Counts (TVC), bacteria of the genus *Pseudomonas*, of the family Enterobacteriaceae, the bacterium *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria (LAB), H₂S-producing microorganisms, yeasts and fungi. In particular, the fillets were stored at three different temperatures, at 0, 5 and 10 ° C, at different times for each sampling. In the two independent experiments the aerobic packaging conditions were evaluated, while in the other two, vacuum packaging was used. Sampling was performed at regular intervals (24-48 hours) in 4 samples for each temperature and then the two spectroscopic methods were applied.

For the construction of the models of correlation with the microbiological results, the samples of 0 and 10⁰C were used as samples of development and validation, while for the prediction those, that were maintained at 5⁰C for both packages. The total number of chicken fillets analyzed is 333 and for each sample 36 spectroscopic data (18 Mean and 18 SD) were collected for MSI and 1038 wave data for FTIR. The SNV and Savitzky-Golay transformations were implemented to optimize the data. The construction of the model for estimating TVC in chicken was done through the linear regression algorithm with the method of least squares (PLS-R). For the qualitative discrimination of fresh and frozen chicken samples, two classes were defined, frozen (class 1), fresh (class 2) and was used the discrete analysis algorithm for the partial least squares method (PLS-DA). The multispectral data (36 for MSI, 1038 for FTIR) for the two models were defined as independent variables, while the

TVC population for the PLS-R model and the two binary classes for the PLS-DA model were defined as dependent.

In the microbiological results it was observed that mainly the temperature, and secondarily the packaging, significantly influenced the microbiological spoilage in the chicken thigh. Bacteria of the genus *Pseudomonas* predominated for the aerobic packaging as a spoilage microorganism, while for all species of microorganisms, there is an increase in microbial growth as the temperature and the duration of preservation increase. Under vacuum packaging conditions, the spoilage of the chicken samples appeared to have resulted from the synergistic action of the *pseudomonas*, the bacterium *Bacillus thermosphacta* and those producing H₂S, without any clear predominance. In terms of temperature, the same conclusion is drawn as with aerobic conditions. It should be noted that the rate of spoilage for TVC was significantly lower for vacuum packaging conditions.

PLS-R models for the evaluation of TVC showed better performance with multispectral imaging data than with those of infrared spectroscopy. More specifically, for MSI in the forecast, the value of RMSE is equal to 0.57 for the two packaging conditions, while that of R² is equal to 0.87 and 0.83 for aerobic and vacuum conditions respectively. The wavelengths that affect model performance appear to be related to myoglobin, oxymyoglobin, and metamyoglobin. Corresponding values for the model with FTIR data were measured RMSE = 1.03, R² = 0.59 for aerobic and RMSE = 0.69, R² = 0.76 for anaerobic conditions. The corresponding wavelengths affecting the model in this case can be correlated with the proteolytic action of the chicken microflora.

The PLS-DA models achieved a significant degree of discrimination between the two classes and in particular, those with multispectral imaging data, as they showed an overall prediction accuracy of 87.50%. In the separation model with the data of infrared spectroscopy the total prediction accuracy amounted to 77.97%.

In conclusion, it was observed that the low preservation temperatures, in combination with the modified conditions under vacuum, significantly reduced the rate of spoilage of the chicken thigh samples. The linear models of TVC and those for the qualitative discrimination of the two classes of samples managed to perform at a significant level. The improvement of the models could be achieved by increasing the samples, while at the same time the correlation of the microbiological data with the multispectral data by non-linear models could be investigated.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: Chicken thigh, spoilage, Fourier transform infrared spectroscopy, multispectral imaging analysis, evaluation models, food fraud

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής διατριβής διεξάχθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Νυχά Γεώργιο-Ιωάννη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για την απόφασή του να με εμπιστευτεί με την συγκεκριμένη μελέτη, παρέχοντας μου όλα τα εφόδια και τις συνθήκες για την άπογη δειξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Τον ευχαριστώ για την συμπαράστασή του και τις καθοριστικές παρεμβάσεις του καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Ελευθέριο Δροσινό, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων που δέχτηκαν να είναι μέλη της επιτροπής μου και αφιέρωσαν χρόνο στην μελέτη της εργασίας μου.

Δεν θα μπορούσα να μην ανάφερω την μεταδιδάκτορα Λεμονιά-Χριστίνα Φέγγου που με μύησε πρακτικά με τον καλύτερο τρόπο στον κόσμο της μικροβιολογίας τροφίμων και με βοήθησε ουσιαστικά σε κάθε βήμα της μελέτης μου. Θα ήθελα να σταθώ στην υπομονή που επέδειξε σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ανάλυσεις των αποτελεσμάτων και συγγραφής της διατριβής, καθώς μου παρείχε πολύτιμες συμβουλές, σωστή καθοδήγηση και στήριξη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε και να τονίσω όχι μόνο δεν με περιόρισε στο να διεξάγω το πείραμα μου στον χώρο του εργαστηρίου, αλλά με βοήθησαν είτε συμβουλευόντας με, είτε παρέχοντας μου κάποιο υλικό για εξοικονόμηση χρόνου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για κάθε είδους στήριξη που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	iv
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vi
1. Εισαγωγή	1
1.1 Σύσταση κρέατος κοτόπουλου	1
1.2 Κατανάλωση πουλερικών και Νομοθεσία	3
1.3 Βιομηχανική παραγωγή	6
1.4 Αλλοίωση κοτόπουλου	8
1.4.1 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά μικροβιακής αλλοίωσης.....	9
1.4.2 Φυσικοχημικές μεταβολές της αλλοίωσης	12
1.4.3 Μικροβιακή χλωρίδα πουλερικών	15
1.4.4 Κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί.....	17
1.4.5 Παράγοντες αλλοίωσης του κοτόπουλου	23
1.5 Απάτη τροφίμων	29
1.5.1 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της νοθείας στο κρέας.....	31
1.6 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας	32
1.6.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis, MSI)	34
1.6.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)	35
ΣΚΟΠΟΣ	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός	38
2.2 Προετοιμασία δείγματος	38
2.2.1 Συντήρηση μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες	39
2.2.2 Συντήρηση μπούτι κοτόπουλου σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό (Modified Atmosphere Packaging, MAP)	39
2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις	40
2.4 Μέτρηση pH.....	43
2.5 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging, MSI).....	43
2.6 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR).....	46
2.8 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων	47
2.8.1 Γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression – PLS-R)	47
2.8.2 Διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis – PLS-DA)	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53

3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων.....	53
3.1.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων σε αερόβιες συνθήκες	53
3.1.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων σε αναερόβιες συνθήκες.....	56
3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH.....	60
3.3 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων.....	61
3.3.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).....	61
3.3.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR).....	67
3.3.3 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).....	72
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	75
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

1. Εισαγωγή

1.1 Σύσταση κρέατος κοτόπουλου

Το κρέας πουλερικών, προμηθεύεται κυρίως από τα κοτόπουλα με ποσοστό περίπου 75% (*Gallus gallus*) και τη γαλοπούλα με ποσοστό 25% (*Meleagris gallopavo*) και είναι μια από τις πιο ευρέως καταναλώσιμες τροφές στον κόσμο (Rouger et al., 2017). Αυτό οφείλεται στην χαμηλή τιμή, την εύκολη διαθεσιμότητα, την έλλειψη θρησκευτικών περιορισμών, την εύκολη πεπτικότητα, τη γεύση και την υψηλή διατροφική του αξία. Είναι μια σημαντική πηγή ενέργειας και θρεπτικών στοιχείων, όπως πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας, χαμηλή σε περιεκτικότητα λιπαρών οξέων (λιγότερα κορεσμένα και περισσότερα πολυακόρεστα και μονοακόρεστα), βιταμίνες και υψηλά βιοδιαθέσιμα μέταλλα όπως παρουσιάζονται και στον (Πίνακας 1.1) (Lesiow, 2005). Παρότι κρέας, εμπεριέχει αρκετή ποσότητα βιταμινών (νιασίνη, θειαμίνη παντοθενικό οξύ, Β6 και Β12) και ανόργανων στοιχείων (ασβέστιο, σίδηρος, φώσφορος, κάλιο, νάτριο). Αυτός είναι ο λόγος που χρησιμοποιείται ευρέως και στη διατροφή όλων των ηλικιακών ομάδων ή και σε προγράμματα διατροφής ομάδων με προβλήματα υγείας (Marangoni et al., 2015). Το κρέας του κοτόπουλου διαθέτει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα αλλά και λιπαρά, με ταυτόχρονα λίγες θερμίδες στη δίαιτά του (Πίνακας 1.2). Ωστόσο, ανάλογα το κομμάτι του κοτόπουλου και την ύπαρξη δέρματος ή όχι παρουσιάζονται διαφορές στα θρεπτικά συστατικά και κυρίως στα λιπίδια και την συνολική θερμιδική αξία. Το μπούτι του κοτόπουλου με δέρμα τριπλασιάζει την περιεκτικότητα σε λιπαρά συγκριτικά με το στήθος κοτόπουλου χωρίς δέρμα. Διαφορές παρατηρούνται και στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Πίνακας 1.1) (USDA, 2021).

Πίνακας 1.1: Θρεπτικά συστατικά σε μπούτι και στήθος κοτόπουλου με δέρμα ή χωρίς (USDA, 2021)

Θρεπτικά συστατικά	Μπούτι χωρίς δέρμα	Μπούτι με δέρμα	Στήθος χωρίς δέρμα	Στήθος με δέρμα
Θερμίδες (kcal)	119	211	114	172
Πρωτεΐνη (g)	19.7	17.3	21.2	20.8
Συνολικά λιπίδια (g)	3.9	15.3	2.6	9.3

Κορεσμένο λίπος (g)	1	4.3	0.6	2.7
Μονοακόρεστο λίπος (g)	1.2	6.3	0.8	3.8
Πολυακόρεστο λίπος (g)	1	3.3	0.4	2
Χοληστερόλη (mg)	83	84	64	64
Νάτριο (mg)	86	76	116	63
Σίδηρος (mg)	1	1	0.4	0.7

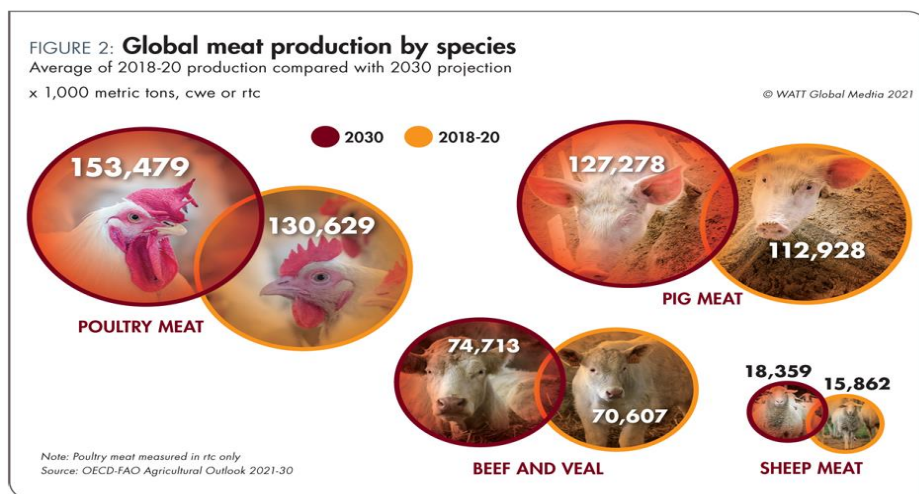
Πίνακας 1.2: Περιεκτικότητα νωπού κρέατος κοτόπουλου σε αμινοξέα και λιπαρά οξέα (Ndob et al., 2015).

Αμινοξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100 g κοτόπουλου	Λιπαρά οξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100 g κοτόπουλου
Αλανίνη	1.27	Μυριστικό οξύ	0.01
Αργινίνη	1.40	Παλμιτικό οξύ	0.28
Ασπαρτικό οξύ	2.07	Στεατικό οξύ	0.13
Γλουταμινικό οξύ	3.47	Παλμιτολεϊκό οξύ	0.04
Κυστεΐνη	0.30	Ολεϊκό οξύ	0.34
Γλυκίνη	1.14	Λινολεϊκό οξύ	0.22
Ιστιδίνη	0.72	α-Λινολεϊκό οξύ	0.01
Ισολευκίνη	1.23	Γαδολεϊκό οξύ	0.01
Λευκίνη	1.74	Αραχιδονικό οξύ	0.06

Λυσίνη	1.97	Εικοσαπενταενοϊκό οξύ	0.01
Μεθειονίνη	0.64	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ	0.01
Φαινυλαλανίνη	0.92	Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ	0.02
Προλίνη	0.95		
Σερίνη	0.80		
Θρεονίνη	0.98		
Τρυπτοφάνη	0.27		
Τυροσίνη	0.78		

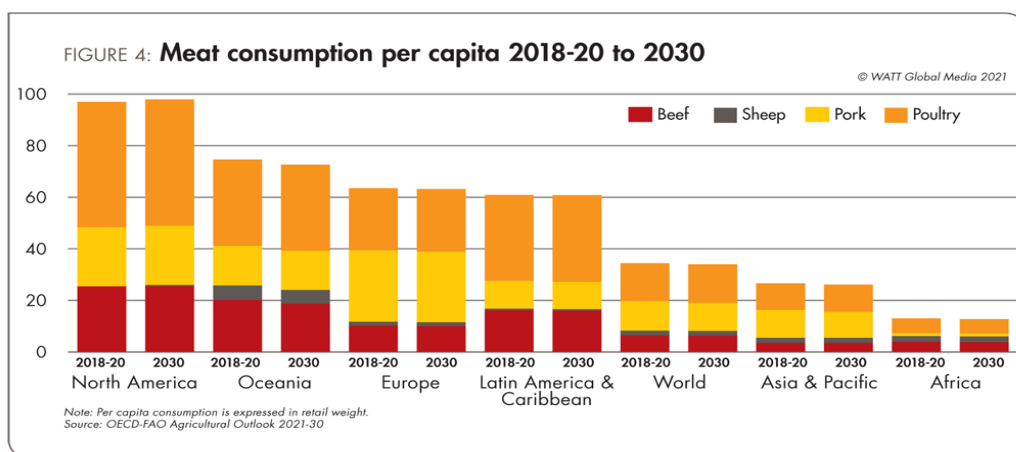
1.2 Κατανάλωση πουλερικών και Νομοθεσία

Το 2030, ο παγκόσμιος πληθυσμός προβλέπεται να συνεχίσει να αυξάνεται με φθίνουσα ταχύτητα. Έτσι κατά την επόμενη δεκαετία, η συνολική παγκόσμια παραγωγή κρέατος προβλέπεται από τον Οργανισμό Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (OECD) και τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) να φτάσει τους 366 εκατομμύρια τόνους έως το 2030, το 80% των οποίων θα παράγεται στις αναπτυσσόμενες χώρες (OECD/FAO, 2021). Από αυτά, τα πουλερικά φαίνεται ότι θα συνεχίσουν να συνεισφέρουν τον μεγαλύτερο όγκο, με την παγκόσμια παραγωγή κρέατος σε πουλερικά να καταμετρήθηκε σε περισσότερους από 130 εκατομμύρια τόνους κατά μέσο όρο την περίοδο 2018-20, και υπολογίζεται να αυξηθούν σε πάνω από 153 εκατομμύρια τόνους το 2030 (**Εικόνα 1.1**). Η αυξανόμενη ζήτηση για κρέας πουλερικών θα οδηγήσει σε αύξηση τόσο της παραγωγής όσο και της κατανάλωσης την επόμενη δεκαετία (OECD/FAO, 2021).



Εικόνα 1.1: Σύγκριση της παγκόσμια παραγωγής κρέατος ανά είδος των μετρήσεων του 2018-2020 με την εκτίμηση της παραγωγής για το 2030 (OECD/FAO, 2021).

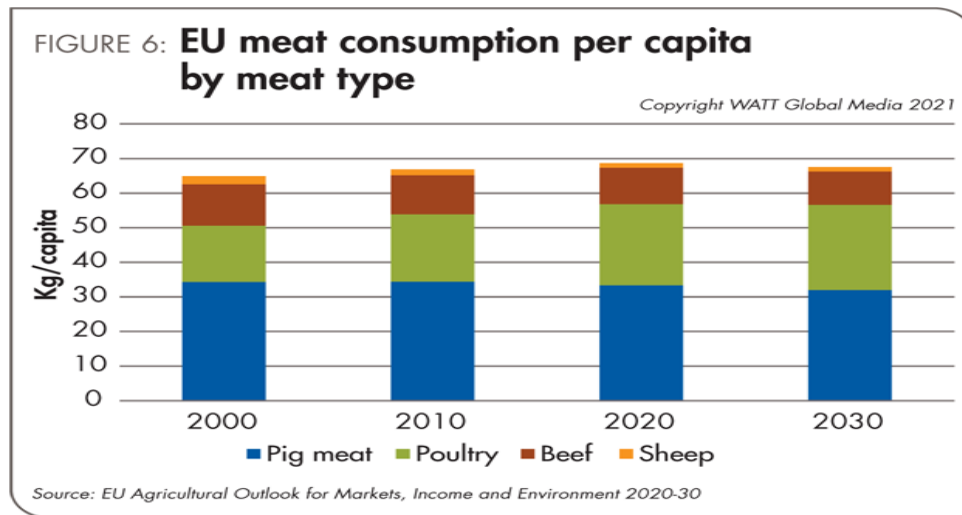
Ενώ η παγκόσμια ανάπτυξη της παραγωγής πουλερικών προβλέπεται να παρουσιάσει βραδύτερο ρυθμό την επόμενη δεκαετία σε σχέση με το παρελθόν, τα πουλερικά αναμένεται να είναι ο κύριος λόγος της παγκόσμια αυξανόμενης κρεατοπαραγωγής έως το 2030. Αυτό οφείλεται στο χαμηλότερο κόστος παραγωγής, τον συντομότερο κύκλο παραγωγής, με αποτέλεσμα τις χαμηλότερες τιμές προϊόντων σε πολλές περιοχές σε σχέση με άλλα κρέατα. Όσον αφορά την κατανάλωση ανά περιοχή, τόσο οι ανεπτυγμένες όσο και οι αναπτυσσόμενες περιοχές συνεχίζουν να καταναλώνουν περισσότερο κρέας πουλερικών από οποιοδήποτε άλλο είδος κρέατος, με κορυφαία τη Βόρεια Αμερική στην κατά κεφαλήν κατανάλωση που προβλέπεται σε σχεδόν 50 κιλά ανά άτομο έως το 2030 (**Εικόνα 1.2**).



Εικόνα 1.2: Σύγκριση της παγκόσμια κατανάλωση κατά κεφαλήν κρέατος των μετρήσεων του 2018-2020 με την εκτίμηση της παραγωγής για το 2030 ανά Ήπειρο (OECD/FAO, 2021).

Το χοιρινό θα συνεχίσει να είναι το κρέας που καταναλώνεται περισσότερο στην ΕΕ την επόμενη δεκαετία, παρόλο που η κατά κεφαλήν κατανάλωση χοιρινού κρέατος στην ΕΕ

προβλέπεται να μειωθεί ελαφρά από 33.4 σε 32.0 κιλά από το 2020 έως το 2030, σύμφωνα με εκτιμήσεις του FAO (**Εικόνα 1.3**). Οι αναμενόμενες μειώσεις στην κατά κεφαλήν κατανάλωση χοιρινού και βοείου κρέατος στην ΕΕ αναμένεται να αντισταθμιστούν από την αύξηση της κατανάλωσης κρέατος πουλερικών από 23.4 σε 24.6 κιλά ανά κάτοικο από το 2020 έως το 2030. Εάν αυτές οι εκτιμήσεις είναι σωστές, η κατά κεφαλήν κατανάλωση πουλερικών στην ΕΕ το 2030 θα είναι 51% υψηλότερη από ό,τι ήταν το 2000 (**Εικόνα 1.3**) (European Commission, 2020).



Εικόνα 1.3: Η μεταβολή της κατανάλωσης κρέατος ανά είδος από το 2000 έως το 2030 στην Ευρωπαϊκή Ένωση (European Commission, 2020).

Αυτή η συνεχής ανάγκη για αύξηση της παραγωγής και κατανάλωσης τροφίμων ανάγκασε την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας να υποχρεώνουν όλους τους εμπλεκόμενους των επιχειρήσεων τροφίμων, τους διανομείς και τους εργαζόμενους σε χώρους εστίασης να ακολουθούν συγκεκριμένες κατευθυντήριες γραμμές που θα έχουν σαν στόχο την προστασία των καταναλωτών αποφεύγοντας τροφιμογενείς επιδημίες. (Nychas et al., 2016). Για να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις της αγοράς, οι παραγωγοί και οι ρυθμιστικές αρχές επικεντρώνονται στην ανάπτυξη και εφαρμογή δομημένων συστημάτων διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας που βασίζονται σε ενδεδειγμένη ανάλυση κινδύνου και πρόληψη μέσω ελέγχου της παρακολούθησης και καταγραφής κρίσιμων παραμέτρων σε ολόκληρο τον κύκλο ζωής των προϊόντων (EC 852/2004). Αυτά τα συστήματα περιλαμβάνουν την πρωτογενή παραγωγή και ιδανικά επεκτείνονται στο τραπέζι του καταναλωτή. Η συστηματική διαχείριση της ασφάλειας των

προϊόντων κρέατος μέσω HACCP (EC 853/2004) περιλαμβάνει επιλογή πρώτων υλών, και έλεγχο των συνθηκών κατά την επεξεργασία και διανομή (Nychas et al., 2008).

1.3 Βιομηχανική παραγωγή

Σύμφωνα με τον Mead (2004) οι εκτροφές κρεοπαραγωγών κοτόπουλων στην επιχειρηματική ορνιθοτροφία γίνεται συνήθως σε κλειστούς θαλάμους με πλήρη έλεγχο των περιβαλλοντικών συνθηκών επί δαπέδου σε αριθμούς που κυμαίνονται συνήθως έως και 40.000 κοτόπουλα. Αφού γίνει η παραλαβή των εκκολαπτόμενων νεοσσών μιας ημέρας τοποθετούνται σε μια στρωμή στον θάλαμο εκτροφής που συνήθως είναι ροκανίδι ξύλου, ή άχυρο ή ρυζοφλοιός. Τα ζώα φτάνουν το επιθυμητό σωματικό βάρος (2.6-2.7 kg) περίπου στις 42 ημέρες εκτροφής. Όσον αφορά την μαζική παραγωγή κρέατος πουλερικών, πρόκειται για εγκαταστάσεις συνεχούς γραμμής, στις οποίες οι όρνιαθες διαπερνούν διαδοχικά τα στάδια επεξεργασίας μέσω αλυσίδας:

- Αρχικά, γίνεται η ανάρτηση των πουλερικών από τα πόδια, με ειδικά άγκιστρα της μεταφορικής αλυσίδας σε χώρο έξω από την κύρια αίθουσα σφαγής.
- Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η αναισθητοποίηση των πουλερικών με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος ή μίγματος αερίων. Η αναισθητοποίηση των πτηνών με μίγμα αερίων τροποποιημένης ατμόσφαιρας μπορεί να επιτευχθεί με δύο εναλλακτικές μεθόδους, τη μέθοδο ενός σταδίου και την αναισθητοποίηση σε δύο στάδια. Στο σύστημα ενός σταδίου το αέριο μίγμα αποτελείται από αργό (Ar) και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) ή άζωτο (N₂). Στο δεύτερο σύστημα, γίνεται μερική αναισθητοποίηση με αέριο πλούσιο σε οξυγόνο (O₂) και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και στη συνέχεια επέρχεται ολική αναισθητοποίηση με τη χρήση 100% διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Η τροποποιημένη ατμόσφαιρα εφαρμόζεται για την αποφυγή της θραύσης των οστών και τη δημιουργία κηλίδων αίματος, που μπορεί να προκαλέσει η αναισθητοποίηση με ηλεκτρικό ρεύμα. Τα πουλερικά πριν αναισθητοποιηθούν πρέπει να βρίσκονται σε ηρεμία, οπότε διέρχονται αναρτημένα ως έχουν από σκοτεινή σήραγγα, στο τέλος της οποίας αναισθητοποιούνται.
- Στη συνέχεια, αποκόπτεται ο λαιμός με τη χρήση περιστροφικού μαχαιριού και έτσι λαμβάνει χώρα η αφάιμαξή τους.
- Το ζεμάτισμα και η αποπτίλωση που ακολουθούν, συμβαίνουν σε άλλο χώρο του σφαγείου καθώς εισέρχονται εκεί τα πουλερικά μέσω της μεταφορικής αλυσίδας.

• Ακολουθεί ο εκσπλαχνισμός και ο τεμαχισμός των πουλερικών, ενώ τα σφάγια επιθεωρούνται αμέσως μετά τον εκσπλαχνισμό τους. Οι χειρισμοί που υφίστανται τα πουλερικά κατά τον τεμαχισμό, μπορεί να επιβαρύνουν σημαντικά το μικροβιακό τους φορτίο.

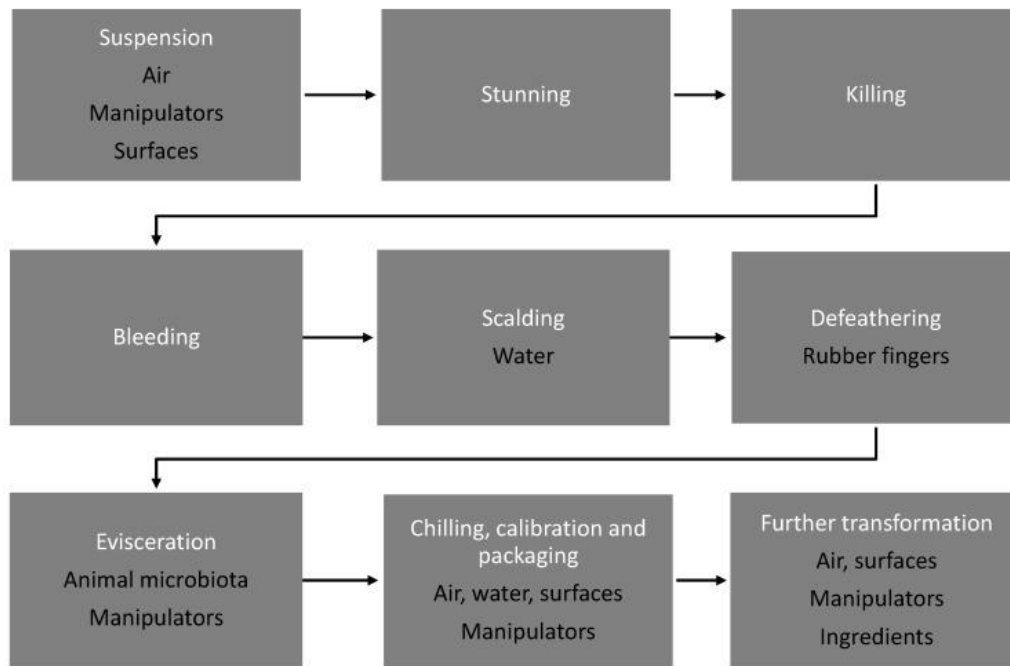
• Μετά τη σφαγή όπως και πριν από τη μεταφορά ή τον τεμαχισμό τους, τα πουλερικά πρέπει να ψυχθούν σε θερμοκρασία κάτω των 4°C και όσο το δυνατό συντομότερα (Mead, 2004) προκειμένου να εξασφαλισθεί υψηλή ποιότητα και ασφάλεια του προϊόντος αποφεύγοντας τυχόν αλλοίωση μικροβιολογικής ή χημικής φύσεως. Το στήθος αποτελεί το δυσκολότερα ψυχόμενο τμήμα σε ένα σφάγιο κοτόπουλου. Η ψύξη των σφάγιων πουλερικών πραγματοποιείται προκειμένου να παραχθεί ένα ασφαλές προϊόν μειώνοντας τη θερμοκρασία του κρέατος έτσι ώστε ο ρυθμός ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών να είναι χαμηλός και να αποτρέπεται η ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Η ψύξη επιδρά επίσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος όπως στη γεύση, το άρωμα, την εμφάνιση και την υφή του (James et al., 2006).

Παρόλο που υπάρχουν διαφορές στις πρακτικές που εφαρμόζονται σε εμπορικά σφαγεία μεγάλης κλίμακας και σε μικρές εγκαταστάσεις σφαγής, τα κύρια βήματα της σφαγής πουλερικών είναι παρόμοια. Μελέτες, βεβαίως, έχουν δείξει ότι ο αυτοματισμός των διαδικασιών σε ορισμένα στάδια της παραγωγής δεν επηρεάζει τον τύπο των κινδύνων που ενδεχομένως παρουσιάζονται κατά την παραγωγή και ούτε τον αριθμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου κατά την θέσπιση ενός συστήματος HACCP (EC 852/2004). Η αυτοματοποίηση, όμως, των εργοστασίων σφαγής οδήγησε στη μείωση της επιμόλυνσης των σφάγιων από το περιβάλλον, γεγονός που αποδείχθηκε από αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων, όπου παρατηρήθηκε μείωση των υπό μελέτη μικροοργανισμών (OMX, κολοβακτηριδίων, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) κατά περίπου 1 log cfu/g στα διάφορα στάδια της διαδικασίας σφαγής και τυποποίησης. (Tsola, Drosinos & Zoiopoulos, 2008).

Σε σύγκριση με τη διαδικασία σφαγής θηλαστικών, οι κύριες διαφορές που πρέπει να σημειωθούν για τη σφαγή των πουλερικών είναι (i) η χρήση υδατόλουτρου (ζεστού ή διατηρημένου με απλή ψύξη) σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας, (ii) η απομάκρυνση των φτερών, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μηχανικά και (iii) το μέγεθος των πτηνών, το οποίο είναι πολύ μικρότερο συγκριτικά με τα βοοειδή ή τα πρόβατα και που παρέχει ευκολία στον χειρισμό του σφαγίου και στη μηχανοποίηση ορισμένων διαδικασιών.

Ο ζωικός ιστός ενός ζώντος και υγιούς θηλαστικού θεωρείται ότι είναι απαλλαγμένος από μικροοργανισμούς ή έστω ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί βρίσκονται σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο (Luber, 2009), ενώ οι μύες είναι αποστειρωμένοι στα υγιή πουλερικά, διάφοροι μικροοργανισμοί φιλοξενούνται στον πεπτικό σωλήνα, τους πνεύμονες, το δέρμα και τα φτερά. Ωστόσο, σε μεταποιημένα προϊόντα, τα βακτήρια μπορούν να μεταναστεύσουν στους μύες (Warsow et al., 2008) από επιμόλυνση από τον περιβάλλοντα χώρο όπως είναι τα σφαγεία, οι επιφάνειες, ο αέρας και τα υγρά (Vihavainen et al., 2007). Συνεπώς, τα σφάγια και τα τεμάχια μετά τη θανάτωση μπορούν να επιμολυνθούν από την μικροχλωρίδα τόσο του ζώου όσο και του σφαγείου, όπου το δέρμα των σφαγίων έρχεται σε άμεση επαφή με τις επιφάνειες του αέρα και του εξοπλισμού.

Η **εικόνα 1.4** παρουσιάζει τα διάφορα στάδια της σφαγής και επεξεργασίας των πουλερικών συσχετίζοντας τα με τις πιθανές οδούς μόλυνσης (Rouger et al., 2017).



Εικόνα 1.4: Στάδια επεξεργασίας των πουλερικών και παράγοντες επιμόλυνσής τους (Rouger et al., 2017)

1.4 Αλλοίωση κοτόπουλου

Το κρέας και ειδικότερα αυτό του κοτόπουλο θεωρείται ένα ιδιαίτερα ευαλλοίωτο τρόφιμο καθώς γρήγορα υφίσταται αλλαγές στα φυσικοχημικά και στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η αλλοίωση προέρχεται από τα προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών, καθώς αυτοί πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια συντήρησής των τροφίμων και είναι ικανοί να τα οδηγήσουν σε απόρριψη από τους καταναλωτές (Rouger et

al., 2017). Σύμφωνα με τους Paramithiotis et al. (2009) και Nychas et al. (2007) τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αποτελούν κριτήρια για την αλλοίωση του κοτόπουλου είναι η εμφάνιση δυσάρεστων οσμών και γεύσεων, η αλλαγή στο χρώμα του και η παραγωγή γλοιώδους υφής στην επιφάνειά του.

Ως σημείο της αλλοίωσης ορίζεται το ανώτατο αποδεκτό επίπεδο μικροοργανισμών καθώς και το σημείο όπου εμφανίζονται τα μη αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι περισσότερες έρευνες υποστηρίζουν ως έναρξη της αλλοίωσης όταν το ολικό μικροβιακό φορτίο αγγίξει την τιμή των $7 \log \text{ cfu/g}$ (Zhang et al., 2012; Holl et al., 2016). Ένα αλλοιωμένο τρόφιμο δεν σημαίνει απαραίτητα ότι είναι μη ασφαλές τρόφιμο που θα οδηγήσει σε τροφική δηλητηρίαση. Ωστόσο, η αλλοίωση των τροφίμων είναι εξαιρετικής σημασίας λόγω της σπατάλης των τροφίμων, των οικονομικών απωλειών και της έλλειψης εμπιστοσύνης που προκαλείται στους καταναλωτές, καθώς είναι γνωστό ότι το 1/4 της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων χάνεται εξαιτίας της μικροβιακής δραστηριότητας (Nychas et al., 2007, Papadopoulou et al., 2011). Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής του κρέατος, που ορίζεται ως ο χρόνος από την αποθήκευση του έως την αλλοίωσή του (Borch et al., 1996, Nychas et al., 2008). Ο τύπος της αλλοίωσης ποικίλει ανάλογα με τον μικροοργανισμό που επικρατεί στο τρόφιμο, τον τύπο του κρέατος (υψηλό ή χαμηλό pH, ενζυμική δραστηριότητα), τη σύνθεση του προϊόντος (σύσταση του σε σάκχαρα, λιπίδια) και το περιβάλλον συντήρησης (θερμοκρασία, σύσταση συσκευασίας) (Papadopoulou et al., 2011).

1.4.1 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά μικροβιακής αλλοίωσης

Οι συνθήκες συντήρησης (θερμοκρασία, συσκευασία), τα χαρακτηριστικά (συστατικά, pH) του τροφίμου και οι μικροοργανισμοί που επικρατούν, είναι οι ρυθμιστικοί παράγοντες για τον κοθορισμό του είδους της αλλοίωσης (Papadopoulou et al., 2011). Κάποια από τα σημαντικότερα είδη αλλοίωσης που προκαλούνται αναφέρονται παρακάτω (Barbut et al., 2014) (Πίνακας 1.3):

- **Δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών:** βακτήρια όπως τα οξυγαλακτικά και τα *Pseudomonas spp.* δίνουν στο τρόφιμο μια δυσάρεστη οσμή σήψης.
- **Σχηματισμός βλέννας:** οι μικροοργανισμοί που παράγουν βλέννα είναι τα οξυγαλακτικά και κυρίως τα γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* και *B. thermosphacta*.
- **Δημιουργία πράσινου χρώματος:** προκαλείται συνήθως από την παραγωγή H_2O_2 και H_2S στα φρέσκα και επεξεργασμένα προϊόντα από τα βακτήρια: *Weissella viridescens*,

Leuconostoc, *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis*. Είναι αποτέλεσμα της οξειδωσης των δακτυλίων της πορφυρίνης, η οποία οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος από κόκκινο σε πράσινο με επακόλουθο τον σχηματισμό ενός πράσινου τμήματος 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 εμφανές μετά από 3 με 4 ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες ψύξης. Ο μικροοργανισμός που τον προκαλεί δεν μπορεί να επιβιώσει στους 71°C για 30 min, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι μη επαρκείς συνθήκες θερμικής επεξεργασίας ενδέχεται να προκαλέσουν το ελάττωμα αυτό.

- **Οξύνιση:** στα επεξεργασμένα και αποθηκευμένα κρέατα προκαλείται οξύνιση εξαιτίας της ανάπτυξης ορισμένων βακτηρίων όπως τα οξυγαλακτικά και ο *B. thermosphacta*, καθώς προκαλούν ζύμωση διαφόρων σακχάρων. Η οξύνιση οφείλεται στην παρουσία ακετοΐνης, διακετυλίου και οξικού οξέως, Ο *Brochothrix thermospacta*, κατά την συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες, μεταβολίζει την γλυκόζη και την γαλακτόζη προς παραγωγή οργανικών οξέων, όπως οξικού, μυρμηκικού, ισοβουτυρικού οξέος, καθώς και αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, και πιο συγκεκριμένα για υψηλό ποσοστό οξυγόνου, παράγεται από την L-γλυκόζη, γαλακτικό και οξικό οξύ (Nychas et al., 2007, Borch et al., 1996).

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

- **Φθορισμός:** Σε προηγμένα στάδια αλλοίωσης των πουλερικών, οι επιφάνειες συχνά φθορίζουν όταν φωτίζονται με υπεριώδη ακτινοβολία λόγω της παρουσίας μεγάλου πληθυσμού των *Pseudomonas fluorescens*.

Η διαθεσιμότητα των συστατικών όπως η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ, οι αζωτούχες ενώσεις και τα ελεύθερα αμινοξέα που υπάρχουν στο κρέας χαρακτηρίζουν το είδος της αλλοίωσης, καθώς λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις των μικροβιακών μεταβολιτών (Nychas et al., 2008). Ανάλογα τον μικροοργανισμό και την σχέση του με το οξυγόνο παράγονται τα διάφορα μεταβολικά προϊόντα. Η αλλοίωση που επιφέρουν τα Gram – βακτήρια και κυρίως αυτά του γένους *Pseudomonas* προκαλεί σήψη, ενώ αυτή που προέρχεται από τα Gram + βακτήρια μπορεί να οδηγήσουν στην οξίνιση (**Πίνακας 1.4**).

Πίνακας 1.3: Παρατηρούμενες οργανοληπτικές μεταβολές ανά βακτηριακό γένος εξαιτίας των μικροοργανισμών αλλοίωσης.

Οργανοληπτική μεταβολή	Βακτηριακό γένος / είδος
H ₂ S παραγωγή	<i>Vibrio</i> , Enterobacteriaceae
Οσμή σουλφιδίων	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Hafnia spp.</i>
H ₂ O ₂ , πράσινο χρώμα	<i>Weissella spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i>
H ₂ S πράσινο χρώμα	<i>Shewanella spp.</i>
Σχηματισμός γλοιώδους επιφάνειας	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> ,
	<i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> ,
	<i>Weissella spp.</i> , <i>Brochothrix spp.</i>
Μαύρισμα στα κόκκαλα	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>

Πίνακας 1.4: Συστατικά που χρησιμοποιούνται από τα κυριότερα αλλοιωγόνα βακτήρια στο κρέας υπό αερόβιες συνθήκες, παραγόμενοι μεταβολίτες και οργανοληπτική μεταβολή που προκαλούν (τροπ. Από Νυχάς, Πανεπιστημιακές σημειώσεις)

Βακτηριακό είδος	Υπόστρωμα	Παραγόμενοι μεταβολίτες	Οργανοληπτική μεταβολή
<i>Pseudomonas spp.</i>	γλυκόζη γλυκόζη-6-P D-γλυκόζη-6-P L-γλυκόζη-6-P γαλακτικό οξύ πυροσταφυλικό οξύ γλυκονικό οξύ γλυκονικό-6-P αμινοξέα κρεατίνη κρεατινίνη κιτρικό οξύ	αμμωνία ακετοΐνη διακετύλιο αιθυλ-εστέρες μεθυλ-εστέρες πουτρεσκίνη καδαβερίνη εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης	οσμή σήψης δυσάρεστη γεύση επιφανειακή γλίτσα πράσινο χρώμα
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	γλυκόζη αμινοξέα ριβόζη	γαλακτικό οξύ οξικό οξύ μυρμηκικό οξύ ακετοΐνη διακετύλιο αιθανόλη 3-μεθυλο-βουτανόλη	οσμή χαλασμένου τυριού
	γλυκερόλη	3-μεθυλο-βουτανάλη βουτανεδιόλη	
Enterobacteriaceae	γλυκόζη-6-P γλυκόζη-6-P D-γλυκόζη-6-P L-γλυκόζη-6-P	αμμωνία εστέρες υδρόθειο αμίνες	οσμή σήψης

1.4.2 Φυσικοχημικές μεταβολές της αλλοίωσης

Οι φυσικοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν στα υδατοδιαλυτά συστατικά του κρέατος δηλαδή τα νουκλεοτίδια, τα αμινοξέα, το γαλακτικό οξύ και οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, προκαλούνται εξαιτίας της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Αυτές οι μεταβολές που παρατίθενται στους **Πίνακες 1.3 & 1.4**, οδηγούν ουσιαστικά στην αλλοίωση του κρέατος.

1.4.2.1 Μεταβολή του pH

Η αρχική τιμή του pH του κοτόπουλου πριν τη σφαγή κυμαίνεται γύρω στο 7. Μετά την σφαγή το pH επηρεάζεται από κάποιους παράγοντες όπως η ποσότητα του γλυκογόνου στους μύες, ο βαθμός αφαιμάξης, η περιεκτικότητα του κρέατος σε λιπώδη και συνδετικό ιστό και η θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την σφαγή παρατηρείται το φαινόμενο της νεκρικής ακαμψίας και εξαιτίας της συμβαίνουν σημαντικές επιπτώσεις στο χρώμα την γεύση και την τρυφερότητα του κρέατος. Αυτή η κατάσταση διαρκεί λιγότερο στο κοτόπουλο συγκριτικά με άλλα κρέατα (1-4 h) (Dransfield & Sosnicki, 1999; Enfors, 2008). Εκεί ξεκινά μια σειρά πολλαπλών φυσικών μεταβολών στον ιστό του κοτόπουλου με τη διάσπαση του γλυκογόνου και την συσσώρευση γαλακτικού οξέως με αποτέλεσμα την πτώση του pH στο 6.2 - 6.6 (Enfors, 2008).

Η ενζυματική δράση των καλπαϊνών παρεμποδίζεται από την ραγδαία πτώση του pH προκαλώντας επιτάχυνση της μείωσης της τρυφερότητας του κρέατος των σφαγίων. Η συμμετοχή της καλπαΐνης και της καθεψίνης συνεισφέρουν πολύ λιγότερο στην αλλοίωση του κρέατος συγκριτικά με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Nychas et al., 2008) μετά το στάδιο της ωρίμανσης, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την προσθήκη προσθέτων όπως NaCl 2%, με στόχο την αύξηση της τρυφερότητας (Βουδούρης & Κοντομηνάς). Επιπλέον, η αδυναμία της μυοσίνης στη μετουσίωση έχει σαν αποτέλεσμα την ελάτωση της ικανότητας της συγκέντρωσης του ύδατος και της μείωση στην ένταση του χρώματος (Dransfield & Sosnicki, 1999).

1.4.2.2 Πρωτεόλυση

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ανήκουν στους μικροοργανισμούς που καταλύουν την διαδικασία της πρωτεόλυσης και παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες) υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου. Από την διαδικασία αυτή σε πιο προχωρημένα στάδια της αλλοίωσης παράγονται πεπτίδια και α-αμινοξέα ως πηγές ενέργειας. Επιπροσθέτως, δύσοσμοι μεταβολίτες όπως θειούχες ενώσεις, κετόνες, αιθυλεστέρες και βιογενείς αμίνες παράγονται από τον καταβολισμό της κρεατίνης και της κρεατινίνης παρουσία O₂.

1.4.2.3 Παραγωγή βιογενών αμινών

Μετά την αποκαρβοξυλίωση των ελεύθερων αμινοξέων των τροφίμων, που επιτυγχάνεται με την ενζυματική επίδραση της μικροβιακής χλωρίδας τους, παράγονται χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις που ονομάζονται βιογενείς αμίνες. Οι βασικότερες από αυτές που παρατηρούνται είναι η ισταμίνη, η τυραμίνη, η καδαβερίνη και η πουτρεσκίνη και έχουν σαν συνέπεια την ιδιαίτερα δυσάρεστη οσμή (Silvia & Gloria, 2002). Τα διαφορετικά βακτηριακά είδη, η πληθυσμιακή τους πυκνότητα και η θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου συμβάλλουν για το είδος και την ποιότητα των βιογενών αμινών. Πιο συγκεκριμένα, τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae (*Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Edwardsiella spp.*) και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. divergens*, *L. carnis*, *L. curvatus* και *L. hilgardii*) (Shalaby et al., 1996) ευνοούν την παραγωγή της ισταμίνης, ενώ τα *Streptococcus spp.*, το *Enterococcus flavis*, τα κολοβακτηριοειδή και ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια (*L. divergens* και *L. carnis*). Η παραγωγή της καδαβερίνης οφείλεται στην οικογένεια Enterobacteriaceae, σε αντίθεση με την βιογενή αμίνη πουτρεσκίνη που συμβάλλουν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

1.4.2.4 Τάγγιση οξείδωση και υδρόλυση λιπιδίων

Η τάγγιση των λιπιδίων προέρχεται από ένα σύνολο αρκετών διαφορετικών αντιδράσεων με την παραγωγή προϊόντων που έχουν σαν αποτέλεσμα την κακή γεύση, οσμή και υφή, την συνολική υποβάθμιση της εμφάνισης του μυϊκού ιστού και την σημαντικότερη υποβάθμιση της διατροφικής αξίας του κρέατος. Τα στάδια παρατίθενται παρακάτω (Enfors, 2008):

- Υδρόλυση λιπιδίων
 - Αυτοϋδρόλυση
 - Λιπόλυση (ενζυματική ή μικροβιολογική)
- Οξειδωτική τάγγιση
 - Αυτοοξείδωση
 - Καταλύομενη από λιποξειδάσες
 - β-οξείδωση

Οι μικροοργανισμοί αλλοίωσης (*Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens*, *Micrococcus spp.*, *Serratia marcesans*, *Arthrobacter spp.*) παράγουν λιπολυτικά ένζυμα και σε συνδυασμό με τις παγκρεατικές λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση των λιπιδίων αρκετά πιο γρήγορα από ότι αναμενόταν (Pawar et al., 2011). Η παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων, οφείλεται στην οξειδωτική τάγγιση των λιπαρών οξέων παρουσία οξυγόνου που έχει σαν αποτέλεσμα τη

μεταβολή του χρώματος του κοτόπουλου προσδίδοντας πράσινες, καφέ και γκριζές αποχρώσεις (Pawar et al., 2011). Στη συνέχεια, η διάσπασή τους σε αλδεύδες, κετόνες και υδρογονάνθρακες (δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης) προσδίδουν δυσάρεστη οσμή και γεύση στο κρέας (Cortinas et al., 2005). Ως τελικά προϊόντα της οξείδωσης σχηματίζονται τοξικά πολυμερή που επηρεάζουν το χρώμα, την υφή, τη γεύση αλλά και την ασφάλεια του κρέατος (Βουδούρης & Κοντομηνάς 2002).

Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και πιο συγκεκριμένα του αραχιδονικού παράγει ως τελικό προϊόν τη μεθυλ-κετόνη που προκαλεί γενική υποβάθμιση της οργανοληπτικής ποιότητας του κρέατος, μέσω της υποβάθμισης της οσμής και της γεύσης του. Αντίστοιχα προβλήματα προκαλούν και ορισμένοι μύκητες. Οι μύκητες αυτοί παράγουν τα ένζυμα λιποξυγενάσες τα οποία συναντιούνται και στο μυϊκό ιστό του κρέατος και οξειδώνουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λινολενικό, αραχιδονικό και λινελαϊκό οξύ στα αντίστοιχα υδροϋπεροξειδία, τα οποία εν συνεχεία δημιουργούν κετόνες και αλδεύδες.

1.4.2.5 Μεταβολές χρώματος πουλερικών

Όπως είναι γνωστό, το χρώμα του κοτόπουλου μετά τη σφαγή στους εσωτερικούς ιστούς ποικίλει από λευκό-ροζ, ενώ το χρώμα του δέρματος από λευκό-κίτρινο. Είναι αρκετοί οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρώμα του όπως η ηλικία, το φύλλο, η φυλή, η διατροφή, η λιποπεριεκτικότητα, η επεξεργασία κατά τη σφαγή και κυρίως η περιεκτικότητά του σε μυογλοβίνη (Enfors, 2008). Καθοριστικό ρόλο στο χρώμα του κρέατος παίζει η σύνθετη πρωτεΐνη που υπάρχει στους μύες, η μυογλοβίνη (Mb) και εκεί οφείλεται το φυσιολογικό ερυθρό-ιώδες χρώμα του μετά την σφαγή. Οι περαιτέρω μεταβολές στο χρώμα του κρέατος κατά τη διάρκεια συντήρησης αποδίδονται:

- στην μετατροπή της Mb σε οξυμυογλοβίνη (MbO₂), εξαιτίας της παρουσίας μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα το πιο έντονο κόκκινο χρώμα
- στην μετατροπή της MbO₂ σε μεταμυοσφαιρίνη, μετά από περαιτέρω οξείδωση παρουσιάζοντας καστανέρυθρο χρώμα

Έτσι η αρχική πρόληψη του οξυγόνου είναι επιθυμητή για το φρέσκο κρέας καθώς μπορεί να διαθέτει ένα ελκυστικό χρώμα, αλλά η συνεχόμενη κατανάλωσή του από τους μικροοργανισμούς συμβάλει στη διεύδυση του οξυγόνου στο εσωτερικό των ιστών δημιουργώντας καφέ απόχρωση. Τα διαφορετικά μέρη του κοτόπουλου διαθέτουν διαφορετικά ποσοστά μυογλοβίνης, και αυτό φαίνεται και από την διαφορά στο χρώμα. Για παράδειγμα το μπούτι ενός κοτόπουλου διαθέτει περισσότερη ποσότητα μυογλοβίνης

συγκριτικά με το στήθος ή τα πόδια (Wideman et al., 2016). Επιπλέον, η ηλικία του κοτόπουλου φαίνεται να επηρεάζει τα ποσοστά σε μυογλοβίνη (Froning et al., 1968).

1.4.3 Μικροβιακή γλωρίδα πουλερικών

Το κρέας των πουλερικών είναι ιδιαίτερα ευπαθές λόγω της εμπλουτισμένης σε θρεπτικά συστατικά σύστασής του, του υψηλού pH (5,5-6,5) και της ενεργότητας νερού (0,98-0,99), τα οποία επιτρέπουν την επιβίωση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που είναι πιθανό να εμφανισθούν και να αναπτυχθούν σε κρέας πουλερικών διακρίνονται σε αλλοιογόνους και παθογόνους.

Οι προκύπτουσες βακτηριακές κοινότητες που συναντώνται στα πουλερικά μπορούν να περιλαμβάνουν παθογόνα είδη όπως η *Salmonella spp.* και το *Campylobacter jejuni*, τα οποία αποτελούν τα δύο κύρια παθογόνα που ευθύνονται για την ανθρώπινη γαστρεντερίτιδα μετά από κατανάλωσης πουλερικών (EFSA, 2016). Η κατανάλωση πουλερικών έχει αποδειχθεί ότι είναι η πρώτη αιτία τροφιμογενών επιδημικών εκρήξεων στις ΗΠΑ μεταξύ 1998 και 2012 (Chai et al., 2017). Επίσης πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλα παθογόνα βακτήρια στο κοτόπουλο, όπως είναι τα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* και *Aeromonas sp.* (Praveen et al., 2016).

Εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας συντήρησης και διανομής, τα ψυχρόφλα και ψυχοτροφικά βακτήρια είναι αυτά που συναντώνται στο νωπό κρέας και ειδικότερα στο κοτόπουλο. Πιο συγκεκριμένα, οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στο κοτόπουλο είναι οι *Pseudomonas spp.*, το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae και οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S όπως η *Shewanella putrefaciens* (Stopforth & Sofos 2005; Adams & Moss 2008, Nychas et al., 2008; Rouger et., 2017). Επιπλέον, κάποιες φορές συναντώνται ζύμες και μύκητες, με το δέρμα του κρέατος να παρέχει ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξή τους.

Πίνακας 1.5: Μικρογλωρίδα κρέατος (Τροποποιήθηκε από Nychas et al., 2007)

Μικροοργανισμοί	Gram αντίδραση	Φρεσκο	Συσκευασία υπό κενό
<i>Achromobacter</i>	–	X	
<i>Acinetobacter</i>	–	XX	X
<i>Aeromonas</i>	–	XX	X

Μικροοργανισμοί	Gram αντίδραση	Φρεσκο	Συσκευασία υπό κενό
<i>Alcaligenes</i>	-	X	
<i>Alteromonas</i>	-	X	
<i>Arthrobacter</i>	±	X	
<i>Bacillus</i>	+	X	XX
<i>Brochothrix</i>	+	X	
<i>Campylobacter</i>	-	X	
<i>Carnobacterium</i>	+	X	XX
<i>Chromobacterium</i>	-	X	
<i>Citrobacter</i>	-	X	
<i>Clostridium</i>	+	X	
<i>Corynebactenum</i>	+	X	X
<i>Enterobacter</i>	-	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	XX
<i>Escherichia</i>	-	X	
<i>Flavobacterium</i>	-	X	
<i>Hafnia</i>	-	X	
<i>Janthinobacterium</i>	-		X
<i>Klebsiella</i>	-	X	
<i>Kluyvera</i>	-	X	
<i>Kocuria</i>	+	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	X
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX
<i>Lactococcus</i>	+	X	
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X

Μικροοργανισμοί	Gram αντίδραση	Φρέσκο	Συσκευασία υπό κενό
<i>Listeria</i>	+	X	
<i>Microbacterium</i>	+	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X
<i>Moraxella</i>	-	XX	
<i>Paenibacillus</i>	+	X	
<i>Pantoea</i>	-	X	
<i>Proteus</i>	-	X	
<i>Providencia</i>	-	X	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX	
<i>Shewanella</i>	-	X	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X
<i>Streptococcus</i>	+	X	
<i>Vibrio</i>	-	X	
<i>Weissella</i>	+	X	X
<i>Yersinia</i>	-	X	X

X = γνωστό ότι υπάρχει, XX = υπάρχει πιο συχνά.

1.4.4 Κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί

1.4.4.1 *Pseudomonas spp.*

Από τους μικροοργανισμούς που είναι παρόντες στο κοτόπουλο, οι ψευδομονάδες αποτελούν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό υπό αερόβιες συνθήκες. Οι ψευδομονάδες είναι αερόβια ή προαιρετικά αερόβια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μη σπορογόνα, με ψυχρότροφα ραβδία και απαρτίζουν ένα μεγάλο γένος βακτηρίων, αποτελούμενο από πέντε ομάδες βάσει των φυλογενετικών μελετών rRNA. Τα είδη των *Pseudomonas* που συναντώνται στην αλλοίωση του κρέατος είναι τα *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava* και *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Έπειτα από φαινοτυπικό και μοριακό χαρακτηρισμό των ψυχρότροφων βακτηρίων που απομονώθηκαν από φρέσκο και αλλοιωμένο κρέας τρία είναι

τα κυρίαρχα είδη ψευδομονάδων που παρατηρήθηκαν: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas ludensis* (Adams & Moss, 2008; Doulgeraki et al., 2012; Mohareb et al., 2015). Στα πρώτα εικοσιτετράωρα αλλοίωσης συνήθως το στέλεχος που παρατηρείται στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης είναι η *P. fluorescens*, ενώ κατά τα τελευταία στάδια αλλοίωσής του επικρατεί η *P. fragi* (Lebert et al., 1998, Arnaut-Rollier, 1999) ή οι *P. fragi* και *P. putida* (Doulgeraki & Nychas, 2013). Τα συγκεκριμένα ψυχρόφιλα βακτήρια εξαιτίας των εξωκυτταρικών τους ενζύμων θεωρούνται ως οι κύριοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί. Αν και η μικροβιακή αλλοίωση από τις ψευδομονάδες μπορεί να οδηγήσει στη μη αποδοχή για κατανάλωση, μπορεί επίσης να έχει και αρνητικές συνέπειες στην ποιότητα του τροφίμου καθώς πολλά είδη ψευδομονάδων παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Για παράδειγμα, οι *Pseudomonas aeruginosa* και άλλα είδη φθορίζουσών ψευδομονάδων είναι ανθεκτικές στις β-λακτάμες (Arslan et al., 2011). Τα είδη των ψευδομονάδων διαθέτουν μηχανισμούς για να χρησιμοποιούν διάφορες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων ποικίλων υδατανθράκων, για την ανάπτυξή τους. Στα πουλερικά, το λίπος είναι διαμοιρασμένο κάτω από το δέρμα και την κοιλιακή κοιλότητα, με την αλλοίωση να εντοπίζεται γενικότερα στο δέρμα, σε δέρμα συνδεδεμένο με λίπος και στα εξωτερικά μέρη των μυών. Στα προχωρημένα στάδια αλλοίωσης των πουλερικών, οι επιφάνειες συνήθως φθορίζουν όταν προσπέσει υπεριώδης ακτινοβολία λόγω της παρουσίας μεγάλων αριθμών του στελέχους *Pseudomonas fluorescens* (Jay, 2005).

Βασική ένδειξη της αερόβιας αλλοίωσης ενός ζωικού ιστού από το γένος *Pseudomonas* είναι η δυσάρεστη μυρωδιά σήψης (putrid, sulphid), η δυσάρεστη γεύση και η εμφάνιση ενός πολυσακχαρίτη με γλοιώδη υφή στην εξωτερική επιφάνεια του ιστού (Ellis & Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007). Η υφή αυτή αποδίδεται στις μεταβολικές δραστηριότητες των *Pseudomonas spp.*, όταν ο πληθυσμός τους ξεπεράσει τους 7-8 log CFU/g (Nychas et al., 2008). Ταυτόχρονα, η παρουσία των ψευδομονάδων σε συνδυασμό με την έλλειψη ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, όπως για παράδειγμα η γλυκόζη, επιφέρει δυσάρεστη οσμή στον αλλοιωμένο ιστό, έχοντας σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αιθυλεστέρων, αμμωνίας, θειούχων και δισουλφιδικών ενώσεων από τις ψευδομονάδες, (Borch et al., 1996; Nychas et al., 2007; 2008).

Κατά την απομόνωση και την ταυτοποίηση των *Pseudomonas spp.* με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται καλύτερα σε μη επιλεκτικά υποστρώματα, όπως τα Plate Count Agar και Blood Agar, και όσον αφορά την απομόνωση τους σε πρωταρχικά υποστρώματα όπως τα

MacConkey και Eosine Methylene Blue Agar, όταν επωάζονται σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας για την ανάπτυξη τους (Jeppesen, 1995). Υπάρχουν, όμως και εκλεκτικά υποστρώματα διαθέσιμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*. Ένα από αυτά είναι το CFC Agar (*Pseudomonas* Agar Base), το οποίο στα συστατικά του περιέχει cephaloridine, fucidin και ceftrimide, έχει περιγραφεί και δοκιμαστεί σε δείγματα κοτόπουλου από τους Mead & Adams (1977). Στο θρεπτικό αυτό υπόστρωμα επιτρέπεται η ανάπτυξη τόσο έγχρωμων όσο και άχρωμων αποικιών *Pseudomonas* διαμέτρου 2-5 mm, χωρίς να αναπτύσσονται άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια (με μικρή πιθανότητα ανάπτυξης του *Shewanella putrefaciens*) (Mead, 1985). Ορισμένα στελέχη των Enterobacteriaceae αναπτύσσονται στα υποστρώματα CFC και δημιουργούν διογκώσεις στις αποικίες των ψευδομονάδων. Για να διαφοροποιηθούν οι αποικίες των βακτηρίων αυτών, οι Stanbridge & Board (1994), τροποποίησαν το θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη αργινίνης (1% w/v) και κόκκινου της φαινόλης (0,002% w/v). Οι ψευδονάδες, με τον τρόπο αυτό, παρήγαγαν αμμωνία μέσω της αργινίνης, ενώ τα εντεροβακτήρια που δεν χρησιμοποιούσαν το συστατικό αυτό σχημάτισαν αποικίες κίτρινου χρώματος. Τα οξέα που παράγουν τα εντεροβακτήρια προσδίδουν στο υπόστρωμα κίτρινο χρώμα.

1.4.4.2 *Brochothrix thermosphaca*

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

Έχει αναγνωριστεί μόνο το συγκεκριμένο είδος από το γένος αυτό, το *Brochothrix* το οποίο έχει όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους και σχηματίζει οξέα με χρήση πολλών πηγών άνθρακα μέσω δύο βασικών μεταβολικών μονοπατιών (Borch et al., 1996, Nychas et al., 2007), όπως η γλυκόζη και η γαλακτόζη, με εξαίρεση τη σορβόζη. Το *B. thermosphacta* έχει παρατηρηθεί ως ανθεκτικό στην έλλειψη οξυγόνου και έχει ανιχνευθεί σε αποθηκευμένα προϊόντα υπό κενό ή υπό αναερόβιες συνθήκες (EFSA Journal, 2016). Κάτα την συντήρηση των προϊόντων υπό κενό βέβαια, δεν θεωρείται ο επικρατέστερος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός, εξαιτίας της απότομης αύξησης του πληθυσμού των οξυγαλακτικών

βακτηρίων (LAB). Σε παρουσία όμως υψηλών ποσοστών O₂ και CO₂, ο *B. thermosphacta* μπορεί να θεωρηθεί ως ο κυρίαρχος μικροοργανισμός αλλοίωσης στα πουλερικά και τα κόκκινα κρέατα (Drosinos & Board, 1994; Lambropoulou et al., 1996; Estelles-Lopez et al., 2016; Holl et al., 2016).

Το συγκεκριμένο είδος είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση ελαφράς δυσσομίας που μοιάζει με οσμή χαλασμένου τυριού που οφείλεται στο διακετύλιο, την ακετοΐνη και το οξικό οξύ αλλά και την υπόγλυκη γεύση στο κρέας. Κατά την συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες, μεταβολίζει ο μικροοργανισμός αυτός την γλυκόζη και την γαλακτόζη προς παραγωγή οργανικών οξέων, όπως οξικού, μυρμηκικού, ισοβουτυρικού οξέος, καθώς και αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, και πιο συγκεκριμένα για υψηλό ποσοστό οξυγόνου, παράγεται από την γλυκόζη L- γαλακτικό και οξικό οξύ (Nychas et al., 2007; Dave & Ghaly, 2011). Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι είναι ψυχρότροφο και αναπτύσσεται με σχετική άνεση στους 0-5 °C και μάλιστα σε pH 5,4 υπό αερόβιες συνθήκες. Το διοξείδιο του άνθρακα στο περιβάλλον που αναπτύσσεται το *B. thermosphacta* περιορίζει δραστικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με αποτέλεσμα τα κρέατα να συσκευάζονται σε πλαστικούς περιέκτες με χαμηλή διαπερατότητα στα αέρια, μέσα στους οποίους περιέχεται και διοξείδιο του άνθρακα (Jay, 2005). Τα υποχρεωτικά αερόβια στελέχη των *Pseudomonas spp.*, μεταβολίζουν πιο γρήγορα την γλυκόζη, που θεωρείται η κυριότερη πηγή άνθρακα για το κρέας, όταν αυτό συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες συγκριτικά με τα προαιρετικά αναερόβια στελέχη του *B. thermosphacta*. (Doulgeraki & Nychas, 2013).

1.4.4.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μία ετερογενής ομάδα μικροοργανισμών, τα οποία είναι αυστηρώς ζυμωτικά. Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, αρνητικά στην καταλάση, μη-σπορογόνα και προαιρετικά αναερόβια (Adams & Moss, 2008). Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία στη βιομηχανία τροφίμων. Κυριαρχούν στη φυσική μικροχλωρίδα πολλών ζυμωμένων προϊόντων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη συντήρηση όσο και στην αλλοίωσή τους, ενώ συναντώνται επίσης στην πεπτική οδό ανθρώπων και ζώων (Stiles & Holzapfel, 1997).

Από πλευράς μεταβολισμού, τα γαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες, ανάλογα με τη μεταβολική οδό που ακολουθούν (Nychas et al., 2007; Παπαδοπούλου, 2013):

(α) τα ομοζυμωτικά είδη (homofermenters), τα οποία μετατρέπουν τη γλυκόζη σε 90% γαλακτικό οξύ κατά το γλυκολυτικό σχήμα Embden-Meyerhof, και

(β) τα ετεροζυμωτικά είδη (heterofermenters), τα οποία μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα (κύκλος φωσφοροπεντοζών).

Παρ' όλα αυτά, οι διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να προκαλέσουν την αλλαγή της ομοζυμωτικής διεργασίας σε ετεροζυμωτική (Doulgeraki et al., 2010; Singh et al., 2009).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην εφήμερη αλλοιωγόνο μικροχλωρίδα του κρέατος, προκαλούν αλλοιώσεις σε κρέας το οποίο αποθηκεύεται σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή σε συνθήκες υπό κενό και αποτελούν έναν από τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Andreevskaya et al., 2015). Τα πιο συχνά απαντώμενα γένη σε κρέας το οποίο είναι συσκευασμένο σε αυτές τις συνθήκες ανήκουν στα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* και *Weissella* (Doulgeraki et al., 2010; Paramithiotis et al., 2009). Η αλλοίωση που προκαλείται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια αν και ανθεκτικά στο οξυγόνο, δεν είναι τόσο έντονη στις αερόβιες συνθήκες όσο αυτή που προκαλείται από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (EFSA Journal, 2016). Η αλλοίωση από τα βακτήρια αυτά, αλλάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων αποδίδοντας στα κρέατα μεταβολές στην υφή, το χρώμα, τον σχηματισμό γλοιώδους επιφάνειας, βιογενών αμίνων, αερίων και πτητικών ενώσεων. Γενικά, αυτές οι μεταβολές σε συνδυασμό με το όξινο άρωμα (souring) προκαλούνται όταν το μικροβιακό φορτίο αγγίξει τους 8 log cfu/g, εξαιτίας των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων που είναι κυρίως γαλακτικό, μυρμηγκικό, οξικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (Nychas et al., 2008). Το *Lactococcus piscium* αναφέρεται ως το συνηθέστερο συναντώμενο είδος οξυγαλακτικού βακτηρίου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στα κρέατα, καθώς αποτελεί και την κυρίαρχη μικροχλωρίδα στο τέλος της ζωής τους.

Τα συγκεκριμένα βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί ως παρεμποδιστές ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Salmonella typhimurium*, ο *Staphylococcus aureus* αλλά και του κύριου αλλοιωγόνου γένους των *Pseudomonas* στο κοτόπουλο (Raccach & Baker, 1978).

1.4.4.4 Enterobacteriaceae

Τα εντεροβακτήρια αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια αρνητικών κατά Gram και μη-σπορογόνων βακτηρίων που είναι αρνητικά στην δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στη δοκιμή καταλάσης. Τα βακτήρια αυτά είναι βάκιλλοι (σε σχήμα ράβδου) και έχουν τυπικά

μήκος 1-5 μm. Ορισμένα γένη φέρουν πολλά μαστίγια που χρησιμοποιούνται για να μετακινηθούν, ενώ άλλα δεν έχουν μηχανισμούς κίνησης. Τα περισσότερα μέλη Enterobacteriaceae έχουν περιτριχικά, κροσσάρια τύπου I που εμπλέκονται στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στους ξενιστές τους (Prauser, 1985). Ταξινομούνται ως προαιρετικά αναερόβια, πράγμα που σημαίνει ότι είναι σε θέση να ευδοκιμήσουν τόσο σε αερόβιο όσο και σε αναερόβιο περιβάλλον. Τα μέλη της οικογένειας αυτής ανήκουν είτε στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντερικού συστήματος των ανθρώπων και των ζώων, είτε βρίσκονται στο νερό, το έδαφος ή ως παράσιτα σε ζώα και φυτά.

Αρκετά γένη εξ' αυτών έχουν απομονωθεί σε κάποιο σημείο της τροφικής αλυσίδας (*Enterobacter*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Rahnella*, *Providencia*, *Escherichia*, *Yersinia* και *Shigella*). Η οικογένεια Enterobacteriaceae περιλαμβάνει είδη, παθογόνα προς τον άνθρωπο (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Cronobacter* spp), καθιστώντας με την παρουσία τους, μη ασφαλή τα κρέατα, ειδικότερα σε περιπτώσεις ελλειπών θερμικής επεξεργασίας. Τα εντεροβακτήρια δύνανται να διαδραματίσουν βασικό ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος, λόγω της ικανότητάς τους να μεταβολίζουν την γλυκόζη και τους υδατάνθρακες και όταν αυτά εξαντληθούν τα αμινοξέα, σε δύσσομες πτητικές ενώσεις όπως οι διαμίνες και οι θεικές ενώσεις, και ευνοείται επίσης η διάσπαση λιπιδίων και η παραγωγή αερίων (Baylis, 2006; Samelis, 2006). Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν την παρουσία εντεροβακτηρίων και την ανάπτυξή τους σε συσκευασμένα νωπά κρέατα και πουλερικά σε ψύξη (Ercolini et al., 2006, Ercolini et al., 2010; Doulgeraki et al., 2012), καθώς εμφανίζονται είτε ως φυσική μικροχλωρίδα, είτε ως επιμόλυνση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή της επεξεργασίας των τροφίμων αυτών. Τα πιο συχνά παρατηρούμενα υπό αυτές τις συνθήκες είναι τα: *Hafnia alvei*, *Pantoea (Enterobacter) agglomerans*, *Rahnella* spp., *Serratia* spp. και *Yersinia enterocolitica*. Μεταξύ των εντεροβακτηριδίων που σχετίζονται με το κρέας. Τα *H. alvei*, *S. liquefaciens* και *P. agglomerans* έχουν επίσης εμπλακεί σε αλλοίωση του κρέατος και έχει αναφερθεί ότι προκαλούν διάφορα ελαττώματα, όπως δυσάρεστες οσμές, διόγκωση των συσκευασιών κενού και πράσινο αποχρωματισμό (Dainty et al., 1989; Stanbridge & Davies, 1998).

Τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι το pH του κρέατος, οι συνθήκες αποθήκευσης και συσκευασίας επηρεάζουν την ανάπτυξη και την ποικιλομορφία των εντεροβακτηρίων, καθώς και τη δυνατότητά τους για αλλοίωση στο κρέας και τα πουλερικά (Stanbridge & Davies,

1998; Doulgeraki et al., 2012; Säde et al., 2013). Η αλλοιωγόνος τους δράση στο κρέας είναι μέγιστη σε pH μεγαλύτερο της τιμής 6 και σε θερμοκρασίες συντήρησης σημαντικά μεγαλύτερες από τις συνήθεις θερμοκρασίες ψύξης, δηλαδή σε ένα εύρος 15 - 40°C. Η αμμωνία, που είναι ο κύριος λόγος της αύξησης του pH, παράγεται από τον καταβολισμό της κρεατίνης και κρεατινίνης από την οικογένεια Enterobacteriaceae. Ένω η κατάψυξη μπορεί να προκαλέσει καταστολή στους μικροοργανισμούς αυτούς, φαίνεται ότι κάποια κύτταρα παραμένουν ενεργά και μετά από σημαντικό χρονικό διάστημα γεγονός που την καθιστά μη αξιόπιστο μέτρο ελέγχου.

1.4.4.5 Βακτήρια που παράγουν H₂S

Τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S) ανήκουν σε διάφορες ομάδες βακτηρίων και αρχαίων που προμηθεύονται ενέργεια μέσα από διάφορες οργανικές και ανόργανες ενώσεις που περιέχουν θείο στο μόριό τους, και μετατρέπονται σε H₂S. Το υδρόθειο είναι ένα άχρωμο και τοξικό αέριο με έντονη δυσσομία που μοιάζει με σάπιο αυγό. Στα τρόφιμα, τέτοια βακτήρια που παράγουν H₂S έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένα προϊόντα κρέατος, ειδικότερα στα επεξεργασμένα (El Romeral, 2018). Ορισμένα γένη βακτηρίων που παράγουν H₂S είναι οι *Shewanella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Arizona*, *Proteus*, *Providencia*, *Klebsiella*, και *Enterobacter* (Padron & Dockstader, 1972).

1.4.5 Παράγοντες αλλοίωσης του κοτόπουλου

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που αλλοιώνουν τα προϊόντα τροφίμων εξαρτάται άμεσα και έμμεσα από αρκετούς παράγοντες, όπου είτε είναι ενδογενείς, είτε εξωγενείς (Cenci-Coga, 2012). Οι σημαντικότεροι εξ αυτών που επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων όπως το κοτόπουλο, είναι οι συνθήκες θερμοκρασίας, συσκευασίας κατά την αποθήκευση, αλλά και η σύσταση του τροφίμου (θρεπτικά συστατικά, aw, pH, περιεκτικότητα σε αλάτι)

1.4.5.1 Ενδογενείς παράγοντες

1.4.5.1.1 Σύσταση προϊόντος

Όπως σε όλα τα προϊόντα των τροφίμων έτσι και το κρέας αποδίδει τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες στην σύνθεση των θρεπτικών συστατικών του. Πιο συγκεκριμένα, το κρέας κοτόπουλου έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, λιπίδια, βιταμίνες, νερό και παρέχει σημαντικές ποσότητες σε άνθρακα και ενέργεια. Όλα αυτά τα θρεπτικά συστατικά τα συλλέγουν οι μικροοργανισμοί για να ικανοποιήσουν τις απαιτήσεις τους σε ενέργεια, μεταβολίζοντας τα για την παραγωγή συστατικών απαραίτητα για τα κύτταρά τους. Έτσι, η παρουσία αυτών των απαραίτητων στοιχείων στο περιβάλλον του τροφίμου παρέχει στους μικροοργανισμούς την δυνατότητα να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν (Cenci-Coga, 2012).

1.4.5.1.2 pH

Το pH φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία της αλλοίωσης και κάθε μικροοργανισμός έχει τα δικά του βέλτιστα εύρη ανάπτυξης (Alonso-Calleja et al., 2004). Όπως αποδεικνύεται, η πλειονότητα των μικροοργανισμών έχουν ως βέλτιστο εύρος ανάπτυξης τις τιμές pH κοντά στο 7 (6.6-7.5), ενώ δεν είναι πολλοί εκείνοι που παρουσιάζουν ανάπτυξη σε τιμές κάτω του 4. Τα βακτήρια τείνουν να είναι πιο ευαίσθητα σε μεταβολές του pH σε σχέση με τις ζύμες και τους μύκητες (Ray & Bhumia, 2013). Όσον αφορά στη μέγιστη και ελάχιστη τιμή του pH ανάπτυξης των μικροοργανισμών, δεν γίνεται να οριστούν καθορισμένα όρια, αφού οι πραγματικές τους τιμές είναι γνωστό ότι εξαρτώνται από άλλες παραμέτρους ανάπτυξης. Για παράδειγμα, στα κρέατα το pH λαμβάνεται στην τιμή 5.4 - 5.8 κατά την διάρκεια της σφαγής, ενώ εάν το ζώο βρίσκεται σε κατάσταση στρες το pH ανέρχεται σε τιμές πάνω από 6 με αποτέλεσμα να σκουραίνουν και να σκληραίνουν. Σύμφωνα με έρευνες, τα πιο σκούρα κρέατα οδηγούν σε δυσάρεστες οσμές και τελικά αλλοιώνονται και πιο γρήγορα (Allen et al., 1997; Fletcher, 1999)

Το κοτόπουλο όπως και η πλειονότητα των κρεάτων, παρουσιάζουν τιμές pH μεγαλύτερες του 5.6, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητα στις αλλοιώσεις που μπορούν να προκαλέσουν τα βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες (Jay, 2005). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, όταν το δέρμα αφαιρεθεί από το νωπό σφάγιο πουλερικού, τα μπούτια είναι πιο πιθανό να αλλοιωθούν γρηγορότερα από το στήθος επειδή το pH των πρώτων κυμαίνεται από 6,3-6,6 ενώ το pH του στήθους από 5,7 έως 5,9 (Jay, 2005). Το pH και ο τύπος του κρέατος, καθορίζουν το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού που απαιτείται για να γίνουν ορατά τα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης. Σε κρέατα με υψηλό pH (>6) η αλλοίωση γίνεται εμφανής σε χαμηλό πληθυσμό περίπου 6 log cfu/g ενώ σε κρέατα με χαμηλότερο pH ο πληθυσμός κυμαίνεται από 7 έως 8 log cfu/g ανάλογα με τη σύνθεση των μυών και το επίπεδο του γλυκογόνου (Ellis, Broadhurst & Goodacre, 2004). Τα προϊόντα μεταβολισμού των ίδιων των μικροβίων μπορούν επηρεάζουν την τιμή του pH στο τρόφιμο ή είναι τοξικά για τα ίδια

1.4.5.1.3 Ενεργότητα ύδατος και υγρασία

Τα προϊόντα κρεάτων έχουν αυξημένη ενεργότητα ύδατος (a_w), με τις τιμές να ανέρχονται γύρω στο 0.99 (ICMSF, 1998). Η τιμή αυτή κατά τα στάδια της σφαγής και της ψύξης είναι μικρότερη (0.96-0.97) (Reid et al., 2015). Ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων και μικροοργανισμών δύνανται να αναπτυχθούν στο κρέας και την επιφάνεια των πουλερικών καθώς ότι τιμές της a_w και για αυτά κυμαίνονται στο 0.98-0.99 γεγονός που καθιστά εύκολη

την επιβίωσή τους (Casaburi et al., 2015). Οι βιομηχανίες τροφίμων έχουν την τάση να χρησιμοποιούν άλας (NaCl) ως βασικό συντηρητικό στα προϊόντα κρέατος ως αντιμικροβιακό παράγοντα που έχει σαν στόχο την μείωση της ενεργότητας του ύδατος. Σαν επιπρόσθετο πλεονέκτημα του NaCl στο κρέας, είναι η αύξηση της συγκράτησης του νερού και η βελτίωση της γεύσης του (Marriutti & Bragagnolo, 2017). Με την κατάλληλη προσθήκη άλατος η τιμή της a_w μειώνεται έως το 0.97, κάτι που καθιστά δύσκολη την ανάπτυξη βακτηρίων όπως τα *Pseudomonas spp.* και τα *Enterobacteriaceae*. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι μύκητες δείχνουν να μην επηρεάζονται ιδιαίτερα από αυτή τη μεταβολή.

Σε περιπτώσεις προϊόντων κρεάτων αυξημένων σε υγρασία, ευνοείται περισσότερο η ανάπτυξη κάποιων μικροοργανισμών. Περισσότερο από όλους οι μύκητες δείχνουν να προτιμούν περιβάλλοντα με αυξημένη υγρασία και θερμοκρασία και χαμηλή ενεργότητα ύδατος.

1.4.5.2 Εξωγενείς παράγοντες

1.4.5.2.1 Θερμοκρασία

Αναμφίβολα, η θερμοκρασία αποτελεί τον πιο σημαντικό εξωγενή παράγοντα για την ανάπτυξη και επιβίωση των διαφόρων αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών σε όλα τα προϊόντα κρέατος. Σύμφωνα με τους Rouger et al., 2017 δύο είναι τα βασικά σημεία που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του κρέατος από την σφαγή έως την κατανάλωση του προϊόντος:

- η θερμοκρασία του σφαγίου (4-10°C)
- η θερμοκρασία αποθήκευσης των προϊόντων μέχρι και την κατανάλωση (ρήξη της ψυκτικής αλυσίδας, συνήθως θερμοκρασία > 4°C).

Οι θερμοκρασίες που αποθηκεύονται τα προϊόντα επηρεάζουν όλες τις φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών (φάση προσαρμογής, εκθετική φάση, στάσιμη φάση και φάση θανάτου) και κατ' επέκταση το τελικό μικροβιακό φορτίο (Doulgeraki et al., 2012), αλλά και τον κίνδυνο επιμόλυνσης. Οι περισσότερες χώρες έχουν αναπτύξει την απαραίτητη νομοθεσία, θέτοντας όρια για την θερμοκρασία ψύξης κατά την αποθήκευση των κρεάτων, παρόλο που συναντώνται περιπτώσεις αποθήκευσης με θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 10°C (Koutsoumanis et al., 2006). Στην Ελλάδα, η ελαχιστοποίηση των πιθανοτήτων επιμόλυνσης και περαιτέρω αύξησης των παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* κ.α.), επιτυγχάνεται από την θέσπιση των κανόνων

ορθής υγιεινής όπως θεσπίστηκε από τους 852/2004 και 853/2004 για όλα τα στάδια επεξεργασίας (Nychas et al., 2008, Mortimore & Wallace, 2013).

Στην μικροβιολογία τροφίμων έχουν σημασία κυρίως οι μεσόφιλοι και οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί. Η συντήρηση ευπαθών προϊόντων σε θερμοκρασίες ψύξης μπορεί να αλλάξει το ρυθμό και τη φύση της αλλοίωσης. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατόν να υπάρξουν ποιοτικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης, καθώς οι χαμηλές θερμοκρασίες ασκούν επιλεκτική δράση, εμποδίζοντας τους μεσόφιλους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν και να κυριαρχήσουν έναντι των ψυχρότροφων μικροοργανισμών. Η ένταση του σοκ που παθαίνουν οι μικροοργανισμοί λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας σε βαθμούς ψύξης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος των μικροοργανισμών, τη φάση ανάπτυξης τους, τη θερμοκρασιακή διαφορά και το ρυθμό ψύξης (Adam & Moss, 1995).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και κυρίως τα *Pseudomonas spp.*, ανήκουν στα ψυχρότροφα βακτήρια γεγονός που τα καθιστά ικανά να αναπτύσσονται και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gill & Newton, 1978; Holzapfel, 1998) και είναι αυτά που συναντώνται συχνότερα στην αλλοίωση στις θερμοκρασίες αυτές (Ercolini et al., 2007). Ειδικότερα, η ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών αυξάνεται στους 4-7⁰C, σε αντίθεση με την OMX στους 0⁰C η οποία επιβραδύνεται (Tuncer et al., 2008). Οι μικροοργανισμοί *B. thermosphacta* και *S. putrefaciens* έχει αναφερθεί ότι δεν αναπτύσσονται καθόλου όταν αποθηκεύονται στους 4⁰C μετά από 7, 10 ή 14 μέρες, ενώ και το μικροβιακό φορτίο των Enterobacteriaceae παραμένει στάσιμο (Hinton et al., 2004). Στις θερμοκρασίες ψύξης -1 έως 5⁰C έχει καταγραφεί επιμήκυνση της φάσης προσαρμογής ιδιαίτερα για τους μεσόφιλους και θερμόφιλους μικροοργανισμούς (Gill & Newton, 1978). Βέβαια, η παραμονή των προϊόντων σε αυτές τις συνθήκες δεν αυξάνει την διάρκεια της ζωής τους πολύ, καθώς εγκυμονούν και οι κίνδυνοι των παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να ευδοκιμήσουν σε αυτές τις συνθήκες (Smolander et al., 2014). Επομένως, είναι αναγκαίο να βρίσκεται η χρυσή τομή μεταξύ θερμοκρασίας και διάρκειας αποθήκευσης για να προβλέπεται και ο χρόνος ζωής του προϊόντος (Iulietto et al., 2015, EFS Journal, 2016).

1.4.5.2.2 Συνθήκες συσκευασίας

Πολύ σημαντικό ρόλο για την επιβίωση και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, διαδραματίζει η ικανότητα προσαρμογής τους στα διαφορετικά περιβάλλοντα των τροφίμων. Ένας ακόμη εξωγενής παράγοντας με ιδιαίτερη σημασία για την αλλοίωση των προϊόντων κρέατος είναι η σύσταση των αερίων της ατμόσφαιρας στο εσωτερικό της συσκευασίας του τροφίμου.

Η αλλοίωση του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες χαρακτηρίζεται από σήψη και σχετίζεται με την πρωτεολυτική δραστηριότητα και την παραγωγή δυσάρεστων οσμών από την κυριαρχία και τη δραστηριότητα των αερόβιων ή προαιρετικά αναερόβιων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και ιδιαίτερα από τους *Pseudomonas spp.* (Doulgeraki et al., 2012; Koutsoumanis et al., 2008; Nychas et al., 1998). Αντίθετα, οι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ο *B. thermosphacta* κυριαρχούν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή κενού (Gill & Newton, 1978; Enfors et al., 1979; Lambropoulou, 1996; Nychas & Skandamis 2005). Η διάρκεια ζωής του κρέατος μπορεί να παραταθεί εάν στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας αυξηθεί το ποσοστό του διοξειδίου του άνθρακα (Stanbridge & Davies, 1998).

Τα τελευταία χρόνια, για την αποφυγή της αλλοίωσης του κρέατος και την επέκταση του χρόνου ζωής του, γίνεται χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας κατά τη συσκευασία των προϊόντων (Koutsoumanis et al., 2008), μέσω της προσθήκης επιθυμητού μείγματος αερίων σε εγκεκριμένους περιέκτες με καθορισμένη διαπερατότητα σε αέρια. (McMillin, 2008). Ως γνωστόν, η ατμοσφαιρική σύσταση αερίων αποτελείται από 78% N₂, 21% O₂, 0.03% CO₂ και ίχνη ευγενών αερίων. Συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα θεωρείται ο εγκλεισμός του τροφίμου σε πλαστικά συσκευασίας (μεμβράνες), στο εσωτερικό των οποίων η αέρια σύσταση έχει τροποποιηθεί, με σκοπό τη μείωση της αναπνοής, την ελάττωση της μικροβιακής αύξησης και την επιβράδυνση της ενζυμικής αλλοίωσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Young et al., 1988). Ο κατάλληλος συνδυασμός των αερίων στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε ευαλλοίωτα προϊόντα και τη διατήρηση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Οι συχνότερα εφαρμοζόμενες μέθοδοι τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι:

➤ συσκευασία υπό κενό (vacuum packaging):

- Εκτός από την αλλαγή της υπάρχουσας ατμόσφαιρας, ευρέως διαδεδομένη είναι η συσκευασία νωπών κρεάτων υπό κενό (McMillin, 2017). Με την αφαίρεση του περιεχόμενου αέρα από την συσκευασία και το ερμητικό κλείσιμο της, επιτυγχάνονται εντός της σακούλας συνθήκες οξυγόνου μικρότερες του 1 % και διοξειδίου του άνθρακα 10- 20 %, οι οποίες αποδίδονται στην μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών στον ιστό. Όπως στις τροποποιημένες ατμόσφαιρες, έτσι και στην συσκευασία υπό κενό δίνεται μεγάλη σημασία στην

διαπερατότητα της μεμβράνης, η οποία πρέπει να είναι κάτω από $5 \text{ cc m}^{-2} \text{ day}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ (Lambert, 1991).

- συσκευασία όπου εμφυσάται αέριο μείγμα (gas-flush packaging), με συχνότερα χρησιμοποιούμενα αέρια τα:
 - CO_2 : Οι εμπλουτισμένες με CO_2 ατμόσφαιρες μπορούν να επιβραδύνουν την ανάπτυξη των αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την υποβάθμιση της γεύσης και της οσμής του κρέατος πουλερικών, σε μία ελάχιστη συγκέντρωση της τάξεως του 20-30%. Η ύπαρξη του στην ατμόσφαιρα παρατείνει τη φάση προσαρμογής ή το χρόνο διπλασιασμού των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού αύξησής τους και προκαλεί αλλαγή της κυρίαρχης μικροχλωρίδας σε βακτηριακές ομάδες με χαμηλότερο δυναμικό αλλοίωσης (Koutsoumanis et al., 2008). Η ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης σε διοξείδιο του άνθρακα οδηγεί στον περιορισμό της αύξησης αερόβιων μικροοργανισμών και ιδιαίτερα των *Pseudomonas spp.*, τα οποία ευθύνονται για την ταχεία αλλοίωση του κρέατος. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια, κυρίως τα οξυγαλακτικά (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* και *Carnobacterium spp.*) και ο *B.thermosphacta* αναπτύσσονται στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και αποτελούν τους πιο σημαντικούς μικροοργανισμούς, καθώς μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνοι όταν το κρέας αλλοιώνεται στις συνθήκες αυτές (Law & Kolstad, 1983; Adam & Moss, 1995).
 - O_2 : Το οξυγόνο στη συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες παρεμποδίζει την αύξηση των αυστηρά αναερόβιων παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ., *Clostridium botulinum*) και διατηρεί το χρώμα του κρέατος έντονο. Έχει παρατηρηθεί μία παρατεταμένη διάρκεια ζωής κρέατος πουλερικών κατά την αποθήκευση σε ατμόσφαιρα χαμηλής συγκέντρωσης σε O_2 και υψηλής σε CO_2 λόγω του ότι η αλλοίωση που προκαλείται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια λαμβάνει χώρα αργότερα συγκρινόμενη με εκείνη που προκαλείται από αερόβια βακτήρια όπως οι ψευδομονάδες, οι οποίες κυριαρχούν υπό αερόβιες συνθήκες (Patsias et al., 2008).
 - CO : Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) αντιδρά με την μυοσφαιρίνη σχηματίζοντας την καρβοξυμυοσφαιρίνη, προσδίδοντας στο κρέας ένα σταθερό φωτεινό κόκκινο χρώμα (Viana et al., 2005).

- N₂: διατηρεί την ακεραιότητα της συσκευασίας καθώς παραμένει στον υπερκείμενο χώρο αυτής (Zhou et al., 2010). Επιπλέον, το άζωτο αντικαθιστά το οξυγόνο εντός του περιέκτη, επιβραδύνοντας έτσι την οξειδωτική τάγγιση του λίπους όπως και την αύξηση των αερόβιων μικροοργανισμών.

1.5 Απάτη τροφίμων

Η απάτη στα τρόφιμα συμβαίνει όταν ένας προμηθευτής τροφίμων εξαπατά σκόπιμα τον πελάτη, σχετικά με την ποιότητα και το περιεχόμενο των τροφίμων που αγοράζει. Αυτό κυρίως γίνεται για λόγους κέρδους, με άσχημο αντίκτυπο όμως, γιατί ορισμένες μορφές η απάτη στα τρόφιμα μπορεί να αποτελέσει άμεση απειλή για την υγεία των καταναλωτών (FAO, 2021). Εκτός από τις αρνητικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία, η απάτη στα τρόφιμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έλλειψη της εμπιστοσύνης των καταναλωτών στις βιομηχανίες τροφίμων και στις κρατικές υπηρεσίες (Barnett et al., 2016). Η επιτυχής απάτη τροφίμων, μπορεί επίσης να καταστήσει πιο πιθανό ότι οι απατεώνες αναλαμβάνουν περαιτέρω κινδύνους με τα τρόφιμα, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο την ασφάλεια και την ακεραιότητα των αλυσίδων εφοδιασμού τροφίμων.

Οι επαγγελματίες ασφάλειας τροφίμων σε όλο τον κόσμο είναι αφοσιωμένοι στο να διασφαλίζουν ότι τα τρόφιμα είναι ασφαλή, αλλά τα τυφλά σημεία στις αλυσίδες εφοδιασμού τροφίμων μπορούν να παρέχουν ευκαιρίες σε άτομα και επιχειρήσεις να διαπράξουν απάτες τροφίμων. Είναι εξαιρετικά δαπανηρό να αντιμετωπιστεί η απάτη στον τομέα των τροφίμων: εκτιμάται ότι το κόστος της απάτης στα τρόφιμα για την παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων είναι περίπου 30 δισεκατομμύρια ευρώ κάθε χρόνο (European Commission, 2018). Ο εντοπισμός της απάτης στα τρόφιμα είναι μια πρόκληση, γιατί οι καταναλωτές από μόνοι τους δεν μπορούν να τα εντοπίσουν και οι απατεώνες τροφίμων είναι ιδιαίτερα καινοτόμοι στους τρόπους με τους οποίους αποφεύγουν τον εντοπισμό. Για την καταπολέμηση του φαινομένου, προσπάθειες γίνονται μέσα από τη νομοθεσία και την χρήση κάποιων τεχνολογικών εργαλείων (FAO, 2021).



Εικόνα 1.5: Κατηγορίες απάτης τροφίμων (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2018)

- **Dilution (αραίωση):** ανάμειξη ενός υγρού συστατικού υψηλής αξίας με ένα υγρό χαμηλότερης αξίας.
- **Substitution (αντικατάσταση):** αντικατάσταση ενός συστατικού ή μέρους του προϊόντος υψηλής αξίας με άλλο συστατικό ή τμήμα του προϊόντος χαμηλότερης αξίας.
- **Concealment (απόκρυψη):** απόκρυψη της χαμηλής ποιότητας των συστατικών ή του προϊόντος των τροφίμων.
- **Mislabeled (λάθος ετικέτα):** τοποθέτηση ψευδούς ισχυρισμού στη συσκευασία για οικονομικό όφελος.
- **Unapproved enhancement (μη εγκεκριμένη βελτίωση):** προσθήκη άγνωστων και μη δηλωμένων υλικών στα τρόφιμα για την ενίσχυση των ποιοτικών χαρακτηριστικών.
- **Counterfeiting (απομίμηση):** αντιγραφή της επωνυμίας, της ιδέας συσκευασίας, της συνταγής, της μεθόδου επεξεργασίας κ.λπ. των προϊόντων διατροφής για οικονομικό όφελος.
- **Greymarket production/theft/diversion (μαύρη αγορά παραγωγή/κλοπή/εκτροπή):** πώληση πλεονάζοντος προϊόντος που δεν έχει δηλωθεί.

Έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις ότι προϊόντα τροφίμων, όπως τα κρέατα και τα ψάρια, να πωλούνται ως φρέσκα, ενώ αυτά είναι κατεψυγμένα. Αυτή η απάτη, ανήκει στην κατηγορία της τοποθέτησης ψευδούς ισχυρισμού στη συσκευασία και αντίστοιχες

παρατυπίες έχουν αναφερθεί και στα πουλερικά (Michael Kramer, 2001). Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους οι καταναλωτές προτιμούν φρέσκα πουλερικά. Αρχικά, είναι απλώς πιο εύκολο να προετοιμαστούν χωρίς να χρειάζεται περαιτέρω χρόνος για ξεπάγωμα. Πολλοί καταναλωτές πραγματοποιούν αγορές σε μεγάλες ποσότητες για να εξοικονομήσουν χρήματα και στη συνέχεια επανασυσκευάζουν τα αντικείμενα σε επιθυμητές μερίδες, ψύχοντας τα προϊόντα για χρήση σε μεταγενέστερη ημερομηνία.

Σύμφωνα με το USDA (1997), για να καθοριστεί ένα προϊόν ως φρέσκο δεν θα πρέπει ποτέ η θερμοκρασία του να πέσει κάτω από τους -3°C . Αυτό υποδηλώνει ότι με την αφή είναι ακόμα εύκαμπτο. Τα φρέσκα πουλερικά θα πρέπει επίσης στην ετικέτα να φέρουν την φράση «διατηρείται στην ψύξη», κάτι που σημαίνει ότι πρέπει να διατηρούνται στο ψυγείο στους 4°C ή χαμηλότερα για να παραμείνουν ασφαλή. Είναι πολύ σημαντικό, σε ένα φρέσκο προϊόν να δίνεται βάση στις ημερομηνίες στη συσκευασία. Δεδομένου ότι αυτό το προϊόν έχει ήδη αποθηκευτεί και φυλαχτεί στο ράφια, είναι αναγκαίο να τηρείται η συνιστώμενη ημερομηνία χρήσης, έτσι ώστε το τρόφιμο να είναι ασφαλές για τον καταναλωτή.

Τα προϊόντα τροφίμων όπως και τα πουλερικά μπορούν να αγοραστούν και σε κατεψυγμένη μορφή. Ως κατεψυγμένο θεωρείται ένα προϊόν όταν με την αφή είναι συμπαγές και διατηρείται στην κατάψυξη ή σε κατεψυγμένη κατάσταση στους -18°C . Και σε αυτή την περίπτωση εξακολουθεί να υπάρχει ημερομηνία στα προϊόντα, που θα υποδεικνύει την ημερομηνία που τα προϊόντα θα πρέπει είτε να καταναλωθούν, είτε να ξαναψυχθούν. Τα κατεψυγμένα προϊόντα πρέπει να αποψύχονται προσεκτικά και υπάρχουν αρκετοί τρόποι. Σταδιακά στο ψυγείο στους 4°C ή χαμηλότερα, κάτω από τρεχούμενο νερό σε θερμοκρασία όχι υψηλότερη από 21°C , ή σε φούρνο μικροκυμάτων εάν πρόκειται να μαγειρευτούν αμέσως. Σε κάθε περίπτωση, η χρήση ενός κατεψυγμένου προϊόντος απαιτεί προγραμματισμό (USDA, 1997).

1.5.1 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της νοθείας στο κρέας

Για την εκτίμηση της νοθείας σε δείγματα κρέατος χρησιμοποιείται ένα πλήθος τεχνικών που βασίζονται σε μοριακές, χρωματογραφικές, φασματοσκοπικές και απεικονιστικές μεθόδους (Fengou et al., 2021b). Οι τεχνικές αυτές παρέχουν ταχεία, χαμηλού κόστους, μη καταστροφικά, αξιόπιστα αποτελέσματα και να δίνουν την ευκαιρία ελέγχου σε πολλές περιπτώσεις νοθείας.

Οι μοριακές μέθοδοι, κατά βάση αναφέρονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η οποία περιλαμβάνει λιποδομικές, πρωτεομικές, ενζυμικές και ανοσολογικές προσεγγίσεις (Ballin et al., 2009; Trivedi et al., 2016; Sheikha et al., 2017;). Η υψηλή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού (UV-Vis) ανιχνεύει το πρωτεϊνικό προφίλ των δειγμάτων και βοηθάει στον επιτυχή διαχωρισμό των ειδών του κρέατος. Όλες αυτές οι τεχνικές παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και μπορούν να χαρακτηριστούν ως καταστροφικές και μη καταστροφικές. Η μέθοδος που θα επιλέγεται στην κάθε περίπτωση θα πρέπει να βασίζεται στο είδος, την κατάσταση, την επεξεργασία και τη ποσότητα του δείγματος πριν την ανάλυση (Vlachos et al., 2016; Li et al., 2020).

Ιδιαίτερα ανερχόμενες μέθοδοι για την καταπολέμηση της νοθείας και κατ' επέκταση της αυθεντικότητας των τροφίμων θεωρούνται οι φασματοσκοπικές, καθώς όλο και περισσότεροι ερευνητές τις χρησιμοποιούν τα τελευταία χρόνια. Η αυξανόμενη χρήση τους οφείλεται στην ανάπτυξη αποτελεσματικών οργάνων που καθιστούν αυτές τις μεθόδους ταχείες, μη καταστροφικές και έχουν εύκολη εφαρμογή για τα περισσότερα είδη τροφίμων και κρέατος (Vlachos et al., 2016; Hassoun et al., 2020; Li et al., 2020; Fengou et al., 2021a). Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στις ιδιότητες διάφορων στοιχείων όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα καθώς εκπέμπουν σε διαφορετικά φάσματα ανάλογα με τα μήκη κύματος. Τέτοιες μέθοδοι όπως η πολυφασματική και υπερφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI και Hyperspectral Imaging, HSI), η φασματοσκοπία Raman, εγγύς και μέσου υπερόθρου (Near Infrared, NIR και Mid Infrared, MIR) με ή χωρίς μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FTIR), έχουν χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις διαχωρισμού του είδους του κρέατος, ανίχνευσης προϊόντων φυτικής ή ζωικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται για νοθεία και ο χαρακτηρισμός φρέσκου και κατεψυγμένου δείγματος (Hassoun et al., 2020; Fengou et al., 2021a; Fengou et al., 2021b).

1.6 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας

Όπως αναδείχθηκε και προηγουμένως (υπο-κεφάλαιο 1.2), η παγκόσμια παραγωγή κρέατος και ιδιαίτερα του κοτόπουλου αναμένεται να αυξηθεί παγκοσμίως για τα επόμενα 10 χρόνια. Μεγαλύτερη παραγωγή σημαίνει και μεγαλύτερη σπατάλη εξαιτίας της γρήγορης αλλοίωσής, κάτι που θα πρέπει να σταματήσει να είναι αποδεκτό αν αναλογιστεί κανείς ότι το 1/6 του πληθυσμού παγκοσμίως θεωρείται υποσιτισμένο (United Nations, 2009). Προσπάθειες προς

αυτή την κατεύθυνση γίνονται τα τελευταία χρόνια, αλλά επιτακτική κρίνεται η ανάγκη για την εύρεση και για άλλες σύγχρονες, μη-επεμβατικές και ταχείες μεθόδους για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας.

Στην πλειονότητα των επιχειρήσεων, τα συστήματα διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων βασίζονται στην επιθεώρηση αλλά και μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις που πραγματοποιούνται μέσω δειγματοληψιών των πρώτων υλών και του τελικού προϊόντος (Nychas et al., 2016). Οι αναλύσεις αυτές αποτελούνται κυρίως από συμβατικές μικροβιολογικές αναλύσεις, μοριακές τεχνικές (Multiplex PCR, Real-time PCR, NASBA), χημικές αναλύσεις και βιοχημικά τεστ (ELIZA, ATP- φωτομετρία κ.α.) (Mandal et al., 2011; Law et al., 2015). Αυτές οι κλασικές μέθοδοι αναλύσεων παρουσιάζουν μια σειρά μειονεκτημάτων, καθώς είναι χρονοβόρες, έχουν υψηλό κόστος, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και δεν παρέχουν την δυνατότητα για έλεγχο κατά τη διάρκεια της παραγωγής (Papadopoulou et al., 2011, Nychas et al., 2016). Ειδικότερα, ορισμένες μοριακές τεχνικές που εστιάζουν στην ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να παρέχουν αναξιόπιστα αποτελέσματα (Doulgeraki et al., 2012, Ropodi et al., 2016).

Τα σύγχρονα συστήματα διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων καλό είναι να διαθέτουν μια ολιστική προσέγγιση. Θα πρέπει το προϊόν να ελέγχεται καθόλη τη διάρκεια της πορείας μέχρι να φτάσει στον καταναλωτή, έτσι τα συστήματα αυτά δομούνται με βάση την πρόληψη, την παρακολούθηση, την καταγραφή και τον έλεγχο των κρίσιμων παραμέτρων, με στόχο και την ταχύτερη και ασφαλέστερη αποδέσμευση του (Nychas et al., 2016). Ήδη ορισμένες επιχειρήσεις κινούνται προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιώντας μη επεμβατικές μεθόδους φασματοσκοπίας (Sun, 2009, Ropodi, 2016), όπως φασματοσκοπία δονήσεων (NIR- φθορισμού, Raman, FTIR) (Ellis et al., 2002, 2004, Ammor et al., 2009, Papadopoulou et al., 2011, Argyri et al., 2013, 2014), υπερ- φασματική και η πολυφασματική απεικόνιση (Daugaard et al., 2010, Tsakanikas et al., 2016, Feng et al., 2018), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Argyri et al., 2011) και βιομμητικούς αισθητήρες οσμής και γεύσης (Limbo et al., 2010, Ropodi et al., 2016). Τα δεδομένα που εξάγονται χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με αυτοματοποιημένα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης, που μπορούν να χαρακτηριστούν αρκετά γρήγορα, οικονομικά και χωρίς τη χρήση εξειδικευμένου προσωπικού.

1.6.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis, MSI)

Η πολυφασματική απεικόνιση μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένας συνδυασμός μεθόδων, οι οποίες είναι: η φασματοσκοπία δονήσεων (Vibrational spectroscopy), η φασματοσκοπία ορατού και η υπολογιστική όραση (Computer vision) (Ropodi et al., 2016). Κατά την εφαρμογή της φασματοσκοπίας των δονήσεων προσδιορίζεται η ενέργεια απορρόφησης των δονούμενων-περιστρεφόμενων μορίων, όταν η δέσμη φωτός προσπίπτει στο εξεταζόμενο δείγμα (Dufour, 2009). Με τον όρο της φασματοσκοπίας ορατού εννοείται η αναλυτική μέθοδος απορρόφησης από την επιφάνεια του τροφίμου και έχει ως αποτέλεσμα τις μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων στα ενεργειακά επίπεδα του ατόμου (Ebbing and Gammon, 2002). Η υπολογιστική όραση πρακτικά αξιοποιεί το φάσμα του ορατού φωτός (350- 800 nm) για να αναπαρασταθεί το σχήμα, το χρώμα, η υφή και το μέγεθος του δείγματος τροφίμου. Λόγω του ότι οι δεσμοί των ενώσεων, που συναντώνται στα τρόφιμα, είναι ως επί το πλείστον δεσμοί C-H (οργανικές ενώσεις), N-H (πρωτεΐνες, αμινοξέα) και O-H (νερό, λίπος, υδατάνθρακες), το εύρος του φάσματος που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των τροφίμων είναι τα 380-1000 nm (Dufour, 2009; Sun, 2009; Elmascry et al., 2012; Gowen et al., 2015). Η οπτική μέθοδος αυτή θεωρείται μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, μη καταστροφική ως προς το προϊόν, ταχεία και μη τοξική. Μπορεί να ενσωματωθεί εύκολα στο τέλος της συνεχούς γραμμής παραγωγής μίας μονάδας επεξεργασίας κρεάτων και συμφέρει οικονομικά, καθώς σε βάθος χρόνου μειώνει τα κόστη που αφορούν την εκμάθηση του προσωπικού, τα δείγματα που εξετάζονται, τις παρτίδες που αποσύρονται ή δεσμεύονται κ.α. (Nychas et al., 2016; Feng et al., 2018)

Η διάταξη ενός οργάνου πολυφασματικής απεικόνισης (Σχήμα 2.1) περιλαμβάνει μία φωτεινή πηγή (δέσμη φωτός), ένα αισθητήρα φωτός, ένα φασματογράφο, μία φωτογραφική μηχανή (συνήθως κάμερα μεγάλης ευκρίνειας), ένα μετατροπέα σήματος καθώς και έναν υπολογιστή με εγκατεστημένο λογισμικό για επεξεργασία της εικόνας (Tsakanikas et al., 2016; Feng et al., 2018). Μετά από την απεικόνιση του τροφίμου πρέπει να γίνει επεξεργασία της εικόνας και να οριστεί η περιοχή ενδιαφέροντος του (ROI), καθόσον η εικόνα μπορεί να περιέχει τμήματα από τον περιβάλλοντα χώρο, το τρυβλίο, λίπος κ.α. (Carstensen et al., 2003; Daugaard et al., 2010; Carstensen et al. 2013). Τα τελικά δεδομένα που προκύπτουν από την μέθοδο αυτή, περιέχουν πληροφορία από κάθε φάσμα και αξιοποιούνται αντίστοιχα με άλλα δεδομένα φασματοσκοπίας, δημιουργώντας μοντέλα πρόβλεψης αλλοίωσης ή νοθείας διαφόρων ειδών κρέατος μέσω της χημειομετρίας, με τα οποία μπορεί να εκπαιδευτεί

το όργανο. Με αυτό τον τρόπο, υπάρχουν αρκετά δεδομένα πλοφασματικής απεικόνισης στην προυπάρχουσα βιβλιογραφία, καθώς εμπεριέχουν αρκετά μοντέλα για την εκτίμηση της αλλοίωσης στο κρέας αλλά και την περιεκτικότητά του σε θρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνες, λιπαρά, κ.α.) (Huang et al., 2014, Ropodi et al., 2015, Feng et al., 2018).

1.6.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier αποτελεί μια σύγχρονη πολλά υποσχόμενη μέθοδο για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στα διάφορα προϊόντα τροφίμων (Ellis et al., 2002; 2004). Τα φάσματα υπολογίζονται σχετικά εύκολα, και εν συνεχεία συγκρίνονται είτε ολόκληρα, είτε κάποια τμήματά τους με άλλα γνωστά. Ο τρόπος αυτός δίνει τη δυνατότητα για τη διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και την ταυτοποίηση αγνώστων οργανικών ουσιών αλλά και την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Ανάλογα λοιπόν, την φύση του εκάστοτε προϊόντος ακολουθείται και διαφορετική τεχνική για την προετοιμασία του δείγματος.

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

- **Πηγή ακτινοβολίας:** η λυχνία νικελίου-χρωμίου (Nicrome) είναι η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους. Είναι μικρής ισχύος και αερόψυκτη. Η θερμοκρασία που αναπτύσσει είναι 1200-1250⁰C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή μέσο-υπέρυθρου.
- **Πηγή λέιζερ:** η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ γίνεται με τη διέγερση ατόμων ηλίου και νέου.
- **Συμβολόμετρο Michelson ή ιντερφερόμετρο:** τα περισσότερα ιντερφερόμετρα αποτελούνται από ένα διαχωριστή δέσμης, ο οποίος λαμβάνει την εισερχόμενη υπέρυθη δέσμη και τη διαχωρίζει σε δύο οπτικές δέσμες. Η μια δέσμη αντανακλάται σε ένα επίπεδο καθρέπτη σταθερά τοποθετημένο και η άλλη αντανακλάται σε ένα διαρκώς κινούμενο επίπεδο καθρέπτη με μετακίνηση μερικών mm σταθερής ταχύτητας. Στη συνέχεια, οι δύο δέσμες συνδυάζονται, συμβάλλουν και συναντώνται πάλι στο διαχωριστή δέσμης. Οπότε το σήμα που εξέρχεται είναι το αποτέλεσμα των δύο αυτών παλμών σε αλληλεπίδραση μεταξύ τους.
- **Δείγμα:** η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας μέσω κατόπτρου εισέρχεται στο χώρο του υπό εξέταση δείγματος. Ένα μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται, ενώ

το υπόλοιπο εξέρχεται, εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο και κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή. Δημιουργούνται λοιπόν έτσι μοριακά αποτυπώματα στα δείγματα όπου είναι μοναδικό για κάθε μοριακή δομή.

- **Ανιχνευτής:** ο σκοπός του ανιχνευτή είναι να «αισθανθεί» την υπέρυθη ακτινοβολία, που έχει διέλθει μέσα από το δείγμα.
- **Υπολογιστής:** το σήμα της μέτρησης μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό και στέλνεται στον υπολογιστή για να λάβει χώρα ο μετασχηματισμός Fourier.

Η μέθοδος αυτή είναι μη επεμβατική, ταχεία, με ελάχιστη προεπεξεργασία των δειγμάτων, χωρίς την χρήση αντιδραστηρίων, ενώ και με τη βοήθεια της τεχνολογίας ATR (Attenuated Total Reflectance) δίνει τη δυνατότητα στους χρήστες την συλλογή πλήρων φασμάτων, δίνοντας και εκτίμηση για της ιδιότητες του κρέατος σε μερικά λεπτά (Ammor et al., 2009; Ellis et al., 2002). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι εξαιτίας των διαδοχικών ανακλάσεων και απορροφήσεων, τις οποίες υφίσταται η απορροφητικά ανακλώμενη υπέρυθη ακτινοβολία στο εσωτερικό του δείγματος, οι πληροφορίες που συλλέγονται και αποτυπώνονται ως φάσμα FTIR προέρχονται από σημαντικό κομμάτι του δείγματος, τόσο από την επιφάνεια των κυτταρικών τοιχομάτων όσο και από το εσωτερικό των κυττάρων. Σε μια προσπάθεια παρακολούθησης της αλλοίωσης, τα φασματοσκοπικά δεδομένα που λαμβάνονται από το FTIR, μπορούν να χρησιμεύσουν ως μεταβολικά δακτυλικά αποτυπώματα και να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις βιοχημικές μεταβολές κατά την αποθήκευση του κρέατος (Paradouroulou et al., 2011)

Η υγρασία του δείγματος και του χώρου τοποθέτησης του δείγματος μπορούν να αποδώσουν κακής ποιότητας φάσματα από το FTIR. Επιπλέον στο χώρο των οργάνων εξαιτίας του ατμοσφαιρικού αέρα, το φάσμα λαμβάνει υπόψιν του και τα αέρια συστατικά που απορροφώνται στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί, CO₂). Για το λόγο αυτό, κάθε φορά πριν τη δειγματοληψία, καταγράφεται φάσμα αναφοράς με τον υποδοχέα του δείγματος τοποθετημένο χωρίς δείγμα.

Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική διατριβή έχει σαν βασικό στόχο την συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων, των πειραμάτων αλλοίωσης φιλέτου από μπούτι κοτόπουλου, με τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και την φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR), προσδοκώντας την έγκαιρη ανίχνευση της μικροβιολογικής ποιότητας, υπό αερόβιες και τροποποιημένες συνθήκες υπό κενό. Επιπροσθέτως, αυτές οι δύο σύγχρονοι μέθοδοι, αξιοποιήθηκαν περαιτέρω, με σκοπό τον διαχωρισμό φρέσκων από κατεψυγμένα δείγματα κοτόπουλου.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα φιλέτα από μπούτι κοτόπουλου συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας υπό κενό. Διεξάχθηκαν δύο ανέξαρτητες επαναλήψεις για κάθε μία από τις περιπτώσεις συσκευασίας για την εξέταση της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών του κοτόπουλου και με σκοπό την συλλογή των φασματοσκοπικών δεδομένων. Τα συσκευασμένα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες τους 0, 5 και 10⁰C.

Το πρώτο μέρος του πειράματος συντήρησης μπούτι κοτόπουλου διήρκησε 216 ώρες για τις αερόβιες συνθήκες και 360 ώρες για τις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η δειγματοληψία γινόταν σε επιλεγμένες ώρες με κριτήριο την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Από κάθε αρχικό δείγμα κοτόπουλου λαμβάνονταν 2 κομμάτια. Το ένα θα χρησιμοποιούνταν για την μέθοδο πολυφασματικής απεικόνισης (MSI), ενώ το δεύτερο για την μέθοδο φασματοσκοπίας (FTIR). Παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις, λαμβάνονταν οι απεικονίσεις των δειγμάτων για το Videometer (MSI) και το FTIR, καθώς και οι μετρήσεις του pH από την πρώτη δεκαδική αραίωση που χρησιμοποιήθηκε για την μικροβιολογική ανάλυση.

Για το δεύτερο μέρος του πειράματος όλα τα τρυβλία με τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη φωτογραφιών στο Videometer, μόλις ολοκληρώνονταν αυτή η διαδικασία τοποθετούνταν στην κατάψυξη στους - 20 ⁰C. Μετά το πέρας 23-25 ημερών, γινόταν η λήψη των μετρήσεων/εικόνων από τα δύο προαναφερθέντα όργανα. Μία μέρα πριν, τα τρυβλία τοποθετούνταν από την κατάψυξη στην συντήρηση με στόχο την απόψυξη τους. Έτσι την επόμενη μέρα, με την ίδια διαδικασία γίνεται χρήση του οργάνου Videometer και στη συνέχεια με τη βοήθεια νυστεριού λαμβάνεται ένα κομμάτι από κάθε δείγμα, έτσι ώστε να εφαρμοστεί και η μέθοδος φασματοσκοπίας FTIR.

2.2 Προετοιμασία δείγματος

Για τη διεξαγωγή του πειράματος ελήφθησαν από μία Ελληνική βιομηχανία πουλερικών (ΚΟΤΙΝΟ Α.Ε.) περίπου 330 φιλέτα από μπούτι κοτόπουλου (βάρους 180-240 γρ./φιλέτο) μέσα σε πλαστικές σακούλες και μεταφέρθηκαν εντός μισής ώρας στον χώρο του εργαστηρίου (Εικόνες 2.1). Τα κοτόπουλα αυτά ελήφθησαν σε τέσσερις διαφορετικές παρτίδες και η σφαγή τους είχε πραγματοποιηθεί την προηγούμενη μέρα.



Εικόνες 2.1: Παραλαβή παρτίδας κοτόπουλου από την KOTINO AEBE.

2.2.1 Συντήρηση μπούτι κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες

Τα μπούτια κοτόπουλου τοποθετούνταν ανά τέσσερα σε συσκευασίες πολυστυρενίου και συσκευάζονταν με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου οικιακής χρήσης, διαπερατή στο O_2 , κάτω υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια διανεμόνταν στους εκάστοτε κλιβάνους συντήρησης (MIR153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2: Συντήρηση κοτόπουλου σε αερόβιες συνθήκες.

2.2.2 Συντήρηση μπούτι κοτόπουλου σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό (Modified Atmosphere Packaging, MAP)

Σε αυτή την περίπτωση, τα δείγματα τοποθετούνταν επίσης σε δίσκους πολυστυρενίου ανά τέσσερα, αλλά αυτοί με τη σειρά τους τοποθετούνταν μέσα σε σακούλες διπλής όψεως (διαστάσεις: πλάτος 25cm, πάχος 90 μm , διαπερατότητα στους 20°C και 50% rH, 25, 90, και $6 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ για CO_2 , O_2 , και N_2 αντίστοιχα (Flexopack S.A., Athens)). Στη συνέχεια οι σακούλες εισάγονταν στο μηχάνημα συσκευασίας Henkovac 1900 (Howden

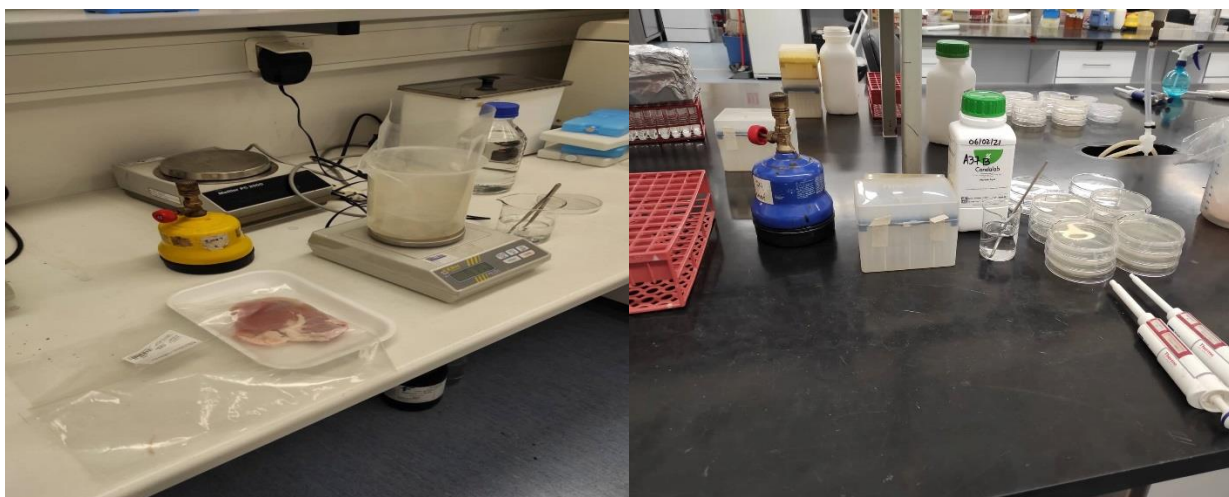
Food Equipment B.V., The Netherlands), όπου λάμβανε χώρα η δημιουργία συνθηκών κενού στο δείγμα. Έτσι, επιτυγχάνονταν η επιθυμητή τροποποίηση του αέρα της συσκευασίας (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Συντήρηση κοτόπουλου σε υπό κενό ατμοσφαιρικές συνθήκες.

2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Κατά τη δειγματοληψία (Εικόνες 2.4), ζυγίστηκαν 25 g δείγματος σε αποστειρωμένη σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, France) των 400 ml, υπό ασηπτικές συνθήκες με την χρήση λαβίδας και νυστεριού. Προστέθηκαν 225ml (αραίωση 1/10) αλατούχου διαλύματος Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K.) και μετά την ομογενοποίηση στον ομογενοποιητή Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 60 s πραγματοποιήθηκαν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και ο εμβολιασμός των τρυβλίων με τα αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα. Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν στα δείγματα από μπούτι κοτόπουλου ήταν, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, αυτά της οικογένειας Enterobacteriaceae, το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S, ζύμες και μύκητες.



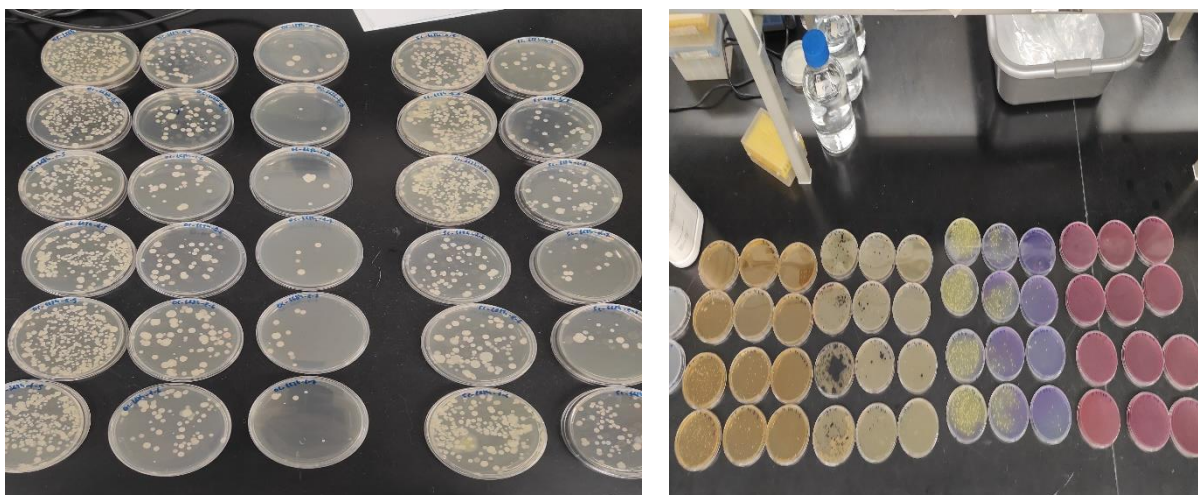
Εικόνες 2.4: Δειγματοληψία κοτόπουλου.

Με οδηγό την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Gram et al., 1987; Stopforth & Sofos 2005; Adams & Moss 2008; Nychas et al., 2008; Rouger et., 2017) για την μικροβιακή χλωρίδα στο μπούτι κοτόπουλου και σε συνδυασμό με την διενέργεια κάποιων προ-πειραμάτων, επιλέχθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά για τον εμβολιασμό και μέτρηση των μικροοργανισμών των δειγμάτων του κοτούπουλου:

- **Plate Count Agar (PCA)** (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): για την καταμέτρηση της OMX με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 72 ώρες.
- **Pseudomonas Agar Base** (LAB108, LAB M., U.K.): με την προσθήκη του επιλεκτικού αντιβιοτικού Ceftrimide-Fusidin-Cephaloridine (**CFC**) (Modified C.F.C X108, LAB M, UK), για την καταμέτρηση των *Pseudomonas spp.*, με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 48 ώρες.
- **Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)** (Ref. 4021862, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): για την καταμέτρηση των Enterobacteriaceae με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Η επώαση γινόταν στους 37°C για 24 ώρες.
- **Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base (STAA)** (Ref. 4020792, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): με την προσθήκη αντιβιοτικού (Ref. 4240052, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση του *B. thermosphacta* με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 48 ώρες.

- **De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS)** (Ref.401728S2, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): για την καταμέτρηση των LAB με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Η επώαση γινόταν στους 30°C για 72 ώρες.
- **Iron agar (IA)** (2% peptone (Difco); 0.3% Lab lemco powder (Oxoid); 0.3% yeast extract (Difco), 0.03% ferric citrate; 0.03% sodium thiosulphate; 0.5% NaCl; 1.2% agar, ρύθμιση του pH στο 7.4 με 2 N KOH): για την καταμέτρηση οργανισμών που παράγουν H₂S με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 72 ώρες (Gram et al., 1987).
- **Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC)** (Lab M Limited): για την καταμέτρηση των ζυμών και μυκήτων με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 120 ώρες.

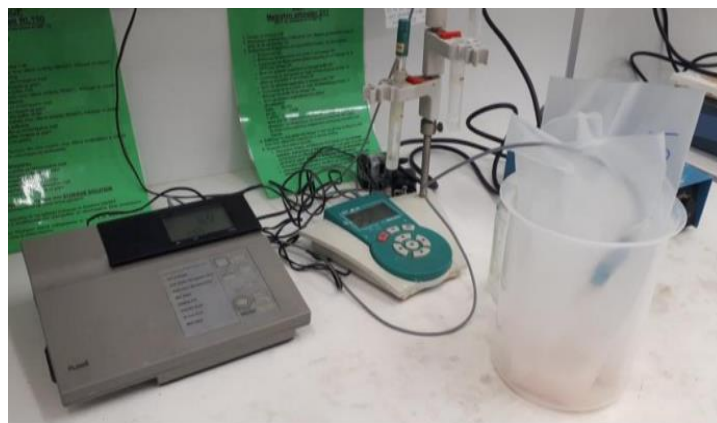
Κατά την επιφανειακή επίστρωση, τα τρυβλία με τα αποστειρωμένα θρεπτικά υλικά PCA, Pseudomonas Agar Base, STAA και RBC εμβολιάστηκαν με 0,1 ml αραιωμένου δείγματος και διασπορά του εμβολίου με τριγωνάκι. Στην τεχνική της ενσωμάτωσης, σε κενά τρυβλία έγινε εμβολιασμός με 1ml αραιωμένου δείγματος και εν συνεχεία ρίψη των υλικών VRBGA, RBC, IA για κάθε κατηγορία, ακολουθούμενη από ανάδευση, στερεοποίηση και τέλος πάλι ρίψη θρεπτικού υλικού για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών. Να σημειωθεί ότι, γινόταν η καταμέτρηση της OMX σε κάθε δειγματοληψία, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, καθώς οι μετρήσεις τους λάμβαναν μέρος σε 3 επιλεγμένες χρονικές στιγμές ανά παρτίδα. Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία τοποθετούνταν στους επωαστικούς κλιβάνους σε χρονικό διάστημα κατάλληλο για την καταμέτρηση του εκάστοτε μικροοργανισμού (**Εικόνες 2.5**). Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού καταμετρούνταν οι εμφανιζόμενες αποικίες στα τρυβλία της κάθε αραιώσης και γινόταν η αναγωγή στο αρχικό δείγμα. Στη συνέχεια, υπολογίζονταν οι μέσοι όροι των log cfu/g και οι τυπικές αποκλίσεις τους, των δύο επαναλήψεων κάθε δείγματος (n=4) όλων των παρτίδων του πειράματος.



Εικόνες 2.5: Αποικίες των μικροοργανισμών στα διάφορα υποστρώματα επώασης.

2.4 Μέτρηση pH

Μετά το πέρας της μικροβιολογικής ανάλυσης χρησιμοποιούνται το ψηφιακό όργανο μέτρησης του pH (RL150, Russell pH, Cork, Ireland) με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metrohm AG, Herisau, Switzerland) (Εικόνα 2.6). Πριν από τις μετρήσεις γίνονται βαθμονόμηση του οργάνου και στη συνέχεια μετριόταν το pH του ομογενοποιημένου και αραιωμένου δείγματος. Η ακρίβεια του συγκεκριμένου οργάνου είναι ± 0.2 .



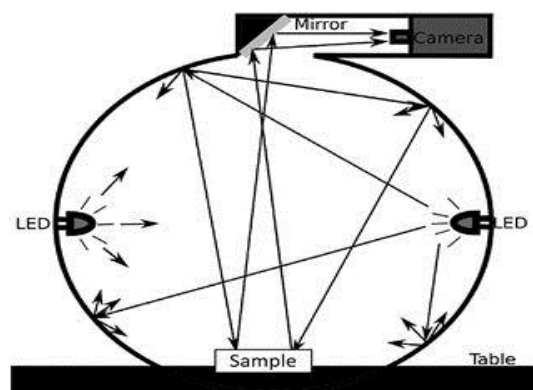
Εικόνα 2.6: Μέτρηση pH με όργανο Russell RL150 (Russel Inc, Boston, USA).

2.5 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging, MSI)

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης είναι το Videometer- Lab της Videometer A/S (Videometer, 2018), με τη βοήθεια του οποίου παραλαμβάνονται πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά και μη ομοιόμορφα κατανομημένα μήκη κύματος με εύρος 405-970 nm και πιο συγκεκριμένα στα 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm (Carstensen

and Hansen, 2003, Panagou et al., 2014). Μέσα σε μία κάμερα τύπου Point Grey Scorpion, τοποθετείται η τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (charge coupled device chip, CCD chip) και καταγράφει την ανάκλαση από την επιφάνεια του δείγματος. Το υπό εξέταση δείγμα το οποίο βρίσκεται μέσα σε τρυβλίο εσωκλείεται εντός μίας σφαίρας Ulbricht (σχήμα 2.1), η οποία έχει εσωτερικά μία επίστρωση ματ και στην οροφή της την κάμερα. Η ομοιογενής ανάκλαση που παρουσιάζει το φως μέσα στη σφαίρα εξασφαλίζεται από τα χαρακτηριστικά του οργάνου όπως το σφαιρικό σχήμα και η επίστρωσή του. Περιμετρικά της σφαίρας και αντιδιαμετρικά μεταξύ τους, είναι τοποθετημένες, με ομοιόμορφη κατανομή, οι δίοδοι εκπομπής φωτός (Light emitting diodes, LEDs) των 18 μηκών κύματος. Όταν παραλαμβάνεται μία εικόνα, οι δίοδοι εκπομπής φωτός ανάβουν διαδοχικά και η ανάκλαση του συγκεκριμένου μήκους κύματος καταγράφεται από την κάμερα μέσα στην σφαίρα. Τα δεδομένα που προκύπτουν είναι μία μονόχρωμη εικόνα με 32-bit ακρίβεια για κάθε LED τύπο, καταλήγοντας σε έναν υπερ-φασματικό κύβο με διαστάσεις 1280×960×19 (Dissing et al., 2013, Tsakanikas et al., 2015).

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



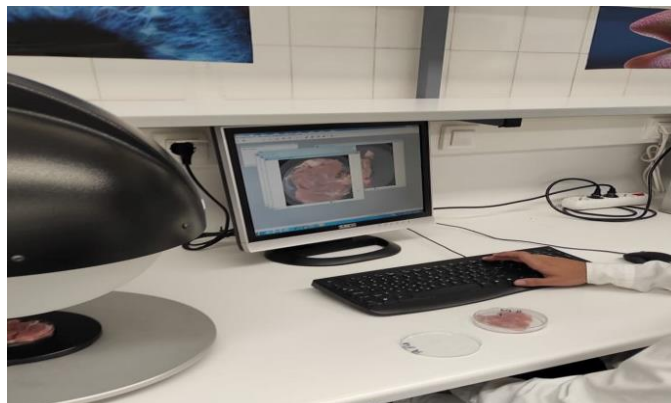
Εικόνες 2.7: Απεικόνιση του εσωτερικού της σφαίρας του VideometerLab (αριστερά) (Tsakanikas et al., 2015) και του εξωτερικού του (δεξιά).

Στις απεικονίσεις που προκύπτουν πρέπει να γίνει επεξεργασία, ούτως ώστε να απομονωθεί το προς εξέταση δείγμα (region of interest, ROI) από το περίγραμμα του τρυβλίου, τον περιβάλλοντα χώρο του τρυβλίου και πιθανό λίπος που υπάρχει στο ιστό του κρέατος (Ropodi et al., 2013, Tsakanikas et al., 2015). Η επεξεργασία αυτή πραγματοποιείται από το λογισμικό πρόγραμμα του Videometer-Lab (Videometer-Lab version 2.12.39, Videometer A/S, Denmark) και η αρχή στην οποία βασίζεται είναι η κανονική διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminal Analysis, CDA). Η μέθοδος ανάλυσης αυτή, γνωστή και ως διακριτική ανάλυση κατά Fisher (Fisher's discriminant analysis) διαχωρίζει τις απεικονίσεις με βάση τις περιοχές ενδιαφέροντος. Προσδιορίζεται έτσι, ο μέγιστος δυνατός διαχωρισμός ανάμεσα σε δύο ή περισσότερες κλάσεις με βάση τις ανεξάρτητες μεταβλητές (**Εξίσωση 2.1**) (Daugaard et al., 2010).

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

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

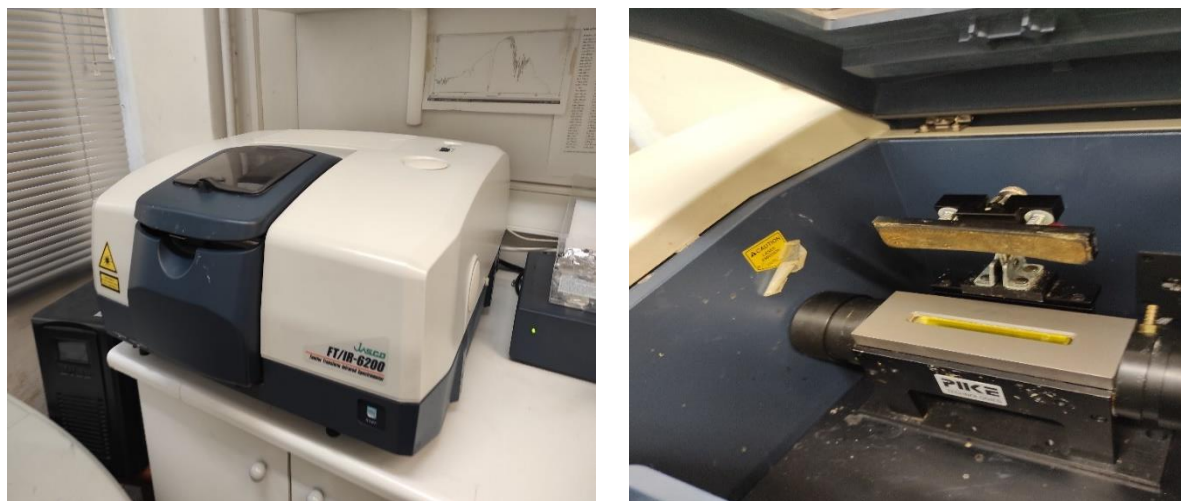
Μετά τον διαχωρισμό αυτό, υπολογίζεται για κάθε εικόνα η μέση φασματοσκοπική ανάκλαση σε κάθε μήκος κύματος, όπως αυτή προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI). Ταυτόχρονα γίνεται και ο υπολογισμός της τυπικής απόκλισης της έντασης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



Εικόνες 2.8: Μέτρηση δείγματος κοτόπουλου με το Videometer- Lab (Videometer A/S, Denmark).

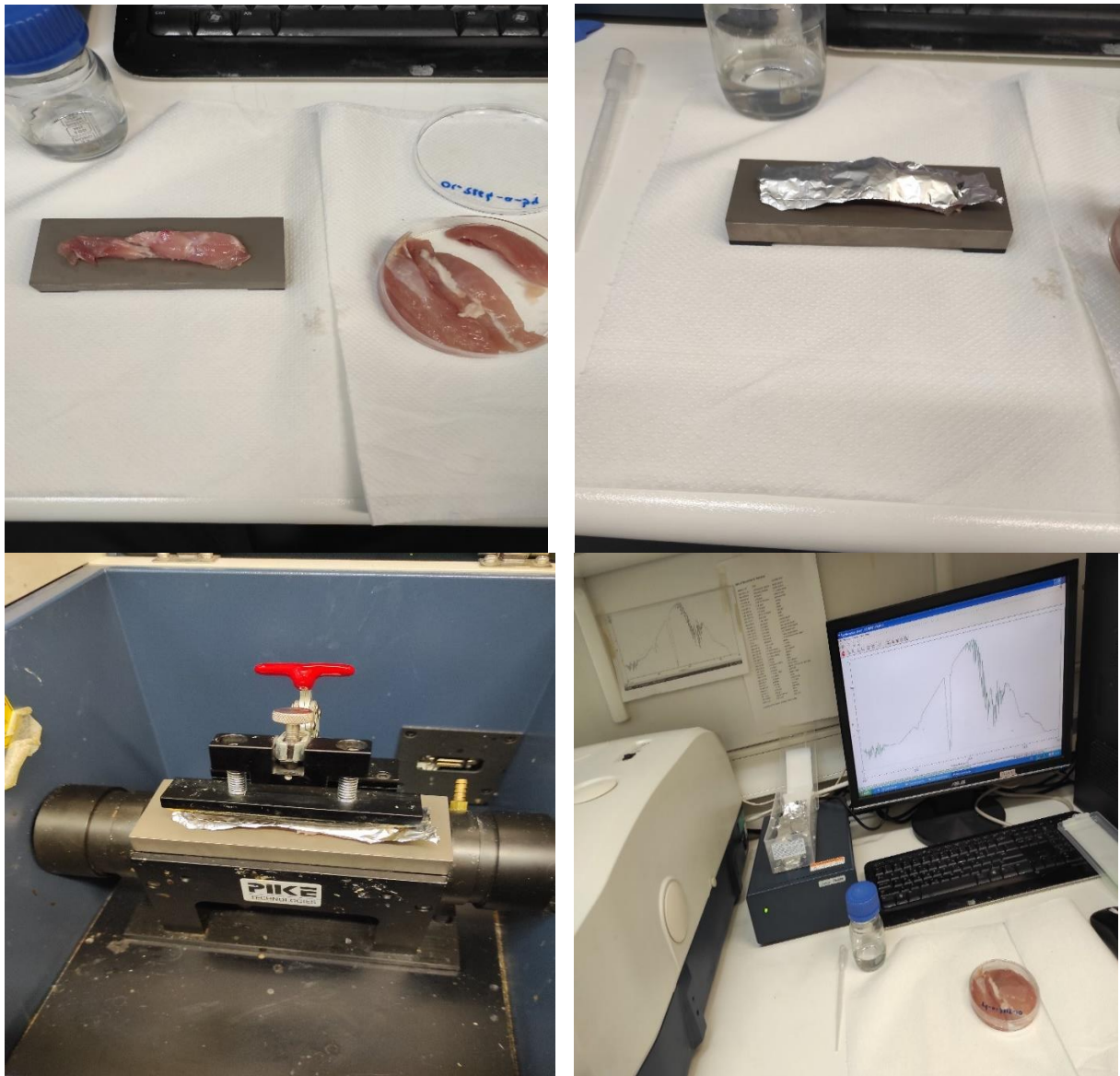
2.6 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του FTIR συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας έναν 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) κρύσταλλο (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, United States), και το φασματόμετρο FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan). Ο κρύσταλλος που χρησιμοποιήθηκε έχει δείκτη διάθλασης 2.4 και βάθος διείσδυσης 2.0 μm στα 1000 cm^{-1} .



Εικόνες 2.9: Φασματοφωτόμετρο FTIR-6200 JASCO (αριστερά) και κρύσταλλος 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) (δεξιά).

Μια μικρή ποσότητα από κάθε δείγμα κοτόπουλου μεταφέρονταν στην κρυστάλλινη πλάκα, επικαλυπτόταν με ένα κομμάτι αλουμινόχαρτου και μετά ασκούνταν πίεση για την επίτευξη της καλύτερης δυνατής επαφής με τον κρύσταλλο (Εικόνες 2.10). Πριν ξεκινήσει η μέτρηση των δειγμάτων και ανά 4 δείγματα λαμβάνονταν μια μέτρηση αναφοράς με τον κρύσταλλο κενό (χωρίς δείγμα). Τα φάσματα που συλλέγονταν στα μήκη κύματος με εύρος 4000 έως 400 cm^{-1} , μέσω του Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) software version 2 (Jasco Corp.), συγκέντρωναν 100 σαρώσεις με ανάλυση 4 cm^{-1} και συνολικό χρόνο ενσωμάτωσης τα δύο λεπτά. Μετά από κάθε μέτρηση ο κρύσταλλος καθαριζόταν πρώτα με απεσταγμένο σαπουνόνερο, στη συνέχεια με ακετόνη και στέγνωσε με τα χρήση μπατονέτας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Spyrelli et al., 2021) τα φάσματα που χρησιμοποιούνται κατά βάση για περαιτέρω αναλύσεις ήταν κατά προσέγγιση σε εύρη μήκους κύματος από 2000 έως 1000 cm^{-1} .



Εικόνες 2.10: Διαδικασία λήψης φασμάτων από το FTIR

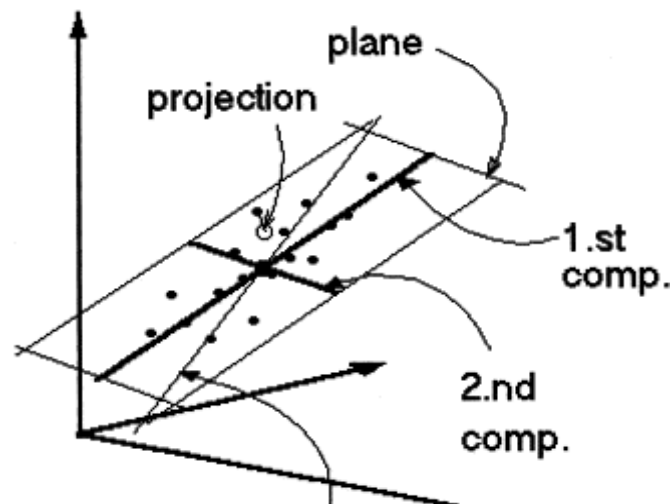
2.8 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων

Για την εκτίμηση του μικροβιολογικού φορτίου των δειγμάτων κοτόπουλου, τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τα δύο όργανα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω αναλύσεις.

2.8.1 Γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression – PLS-R)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της OMX, κατασκευάστηκαν μοντέλα βάσει της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για κάθε τρόπο συσκευασίας χωριστά. Η μέθοδος αυτή συσχετίζει δύο σύνολα δεδομένων X (ανεξάρτητη μεταβλητή) και Y (εξαρτημένη μεταβλητή), γραμμικώς, βρίσκοντας ένα νέο σύνολο-χώρο ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X-scores), με ορθογώνια διάταξη (**Εικόνα**

2.11), καθώς και ορίζει έναν αριθμό κύριων συνιστωσών (Latent variables, LVs) για τον νέο χώρο αυτό (Wold et al., 2001; Romia & Bernardez, 2009; Panagou et al., 2014). Αρκετές φορές οι πολυάριθμες και συσχετιζόμενες μεταβλητές έχουν σαν αποτέλεσμα να συμβαίνει overfitting. Με στόχο την απαλλαγή του, κάθε λογισμικό PLS-R εκπαιδεύει το μοντέλο και προβλέπει τη σημαντικότητα κάθε παράγοντα και τη διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation). Μέσω της τελευταίας, τα δεδομένα διακρίνονται σε κάποιες ομάδες, οι οποίες χρησιμοποιούνται διαδοχικά και έτσι δημιουργούνται μοντέλα με τα εναπομείναντα δεδομένα. Οι προβλεπόμενες και παρατηρούμενες τιμές της μεταβλητής Y καταμετρώνται μετά τη δημιουργία ενός μοντέλου. Κάθε μοντέλο πρέπει να επικυρώνεται πριν από τη χρήση του, ιδανικά με ανεξάρτητα αντιπροσωπευτικά δείγματα. Σε περίπτωση που δεν υπάρχουν, το μοντέλο μπορεί να επανεκτιμηθεί μετά από τυχαιοποίηση των δεδομένων (Wold et al., 2001).



Εικόνα 2.11: Γεωμετρική απεικόνιση του νέου λανθάνοντα χώρου, όπως προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Wold et al., 2001).

Επιλέχτηκε η συγκεκριμένη μέθοδος καθώς μπορούν να αναλυθούν με αυτήν, δεδομένα με πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές X και με πολύ «θόρυβο» (Wold et al., 2001; Abdi, 2003). Επιπλέον, αντίθετα με άλλες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης, με την PLS-R διατηρείται η ασυμμετρία μεταξύ των προβλεπόμενων και των εξαρτημένων μεταβλητών (Abdi, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα που σχετίζονται με το σύνολο των 333 φιλέτων από μπούτι κοτόπουλο, χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την ανάλυση των δεδομένων. Τα δεδομένα, τα οποία προήλθαν από το MSI και το FTIR, αξιολογήθηκαν με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Σε

αυτή τη μέθοδο, τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από το Videometer (n= 36, 18 Mean και 18 SD) και το FTIR τους 1038 κυματαριθμούς μεταξύ των περιοχών 1000 – 2000 cm⁻¹ (Spyrelli 2021 et al.), χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά σαν μεταβλητές εισόδου X, ενώ τα δεδομένα της OMX σαν μεταβλητές εξόδου Y. Για την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway) και κατασκευάστηκαν μοντέλα για τις αερόβιες και τις υπό κενό ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας με διαφορετική προ-επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων.

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξάχθηκαν από το Videometer:

i) αερόβιες συνθήκες: για την ανάπτυξη (calibration) και επικύρωση (cross-validation) του μοντέλου, ως δείγματα (n=99) θεωρήθηκαν όσα συντηρήθηκαν (και των δύο παρτίδων) στους 0 και 10⁰C, ενώ για την πρόβλεψη (prediction) όσα δείγματα (n=50) συντηρήθηκαν στους 5⁰C και στις 2 παρτίδες. Οι μεταβλητές X (n=36) επιλέχθηκαν, αφού πρώτα μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV)(Εξίσωση 2.2). Ο μετασχηματισμός αυτός χρησιμοποιείται συχνά σε φασματοσκοπικά δεδομένα καθώς μειώνει την αλληλοεπικάλυψη των πληροφοριών μεταξύ των φασμάτων και ελαχιστοποιεί τον «θόρυβο» (Chen et al., 2011, Panagou et al., 2014, Tsakanikas et al., 2016). Τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX χρησιμοποιήθηκαν ως Y μεταβλητές (n=1). Η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον συγκεκριμένο μετασχηματισμό είναι η εξής:

$$\text{New value} = (\text{Old value} - \text{mean}(\text{Old row})) / \text{Stdev}(\text{Old row})$$

ii) τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό: τα δεδομένα για την ανάπτυξη (calibration) και επικύρωση (cross-validation) του μοντέλου, ως δείγματα (n=105) θεωρήθηκαν όσα συντηρήθηκαν (και των δύο παρτίδων) στους 0 και 10⁰C, ενώ για την πρόβλεψη (prediction) όσα δείγματα (n=57) συντηρήθηκαν στους 5⁰C και στις 2 παρτίδες. Οι μεταβλητές X (n=36) επιλέχθηκαν, αφού πρώτα μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV)(εξίσωση 2.4).

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξάχθηκαν από το FTIR:

i) αερόβιες συνθήκες: για την ανάπτυξη (calibration) και επικύρωση (cross-validation) του μοντέλου, ως δείγματα (n=99) θεωρήθηκαν όσα συντηρήθηκαν (και των δύο παρτίδων)

στους 0 και 10⁰C, ενώ για την πρόβλεψη (prediction) όσα δείγματα (n=49) συντηρήθηκαν στους 5⁰C και στις 2 παρτίδες. Οι μεταβλητές X (n=1038) επιλέχθηκαν, αφού πρώτα μετασχηματίστηκαν με την δεύτερη παράγωγο Savitzky-Golay (δεύτερη πολυωνυμική τάξη, παράθυρο 11 σημείων) για την ανάπτυξη μοντέλων PLS-R, για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων και την μείωση του θορύβου. Επίσης τα δείγματα 5⁰C_168h_a_b1 και 5⁰C_72h_a_b4 δεν συμπεριλήφθηκαν στις αναλύσεις καθώς μετά από δοκιμές αποδείχθηκε ότι αποκλίνουν αρκετά από το μοντέλο (outliers).

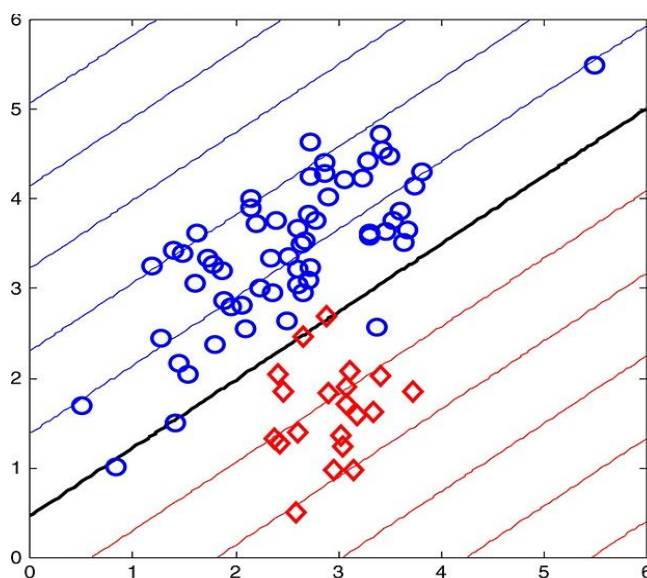
ii) τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό: τα δεδομένα για την ανάπτυξη (calibration) και επικύρωση (cross-validation) του μοντέλου, ως δείγματα (n=105) θεωρήθηκαν όσα συντηρήθηκαν (και των δύο παρτίδων) στους 0 και 10⁰C, ενώ για την πρόβλεψη (prediction) όσα δείγματα (n=57) συντηρήθηκαν στους 5⁰C και στις 2 παρτίδες. Οι μεταβλητές X (n=1038) επιλέχθηκαν, αφού πρώτα μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό Savitzky Golay smoothing (παράθυρο 11 σημείων) με στόχο τη βελτίωση της ακρίβειας της εξαγωγής δεδομένων από αυτά τα φάσματα.

Για τα μοντέλα προσδιορισμού της OMX με τη μέθοδο PLS-R, υπολογίστηκαν και λήφθηκαν υπόψιν, η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE), ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) και οι γραμμικές παράμετροι slope (κλίση της ευθείας) και offset (σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα y) για την ανάπτυξη, επικύρωση και πρόβλεψη τους (Romía & Bernardez, 2009; Dissing et al., 2013; Panagou et al., 2014; Bi et al., 2016; Rodopi et al., 2016). Οι παράγοντες συσχέτισης υπολογίζονται αυτόματα κατά την εφαρμογή των λογισμικών που χρησιμοποιούνται.

2.8.2 Διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis – PLS-DA)

Η διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων μπορεί να επιτρέψει τον διαχωρισμό των δειγμάτων κοτόπουλου σε επιλεγμένες κλάσεις ποιότητας. Ο σκοπός αυτού του αλγόριθμου είναι να δημιουργήσει μία νέα νοητή γραμμική περιοχή (περιοχή X και Y μεταβλητών), η οποία διαχωρίζει τις κλάσεις μεταξύ τους (σχήμα 2.3), και ταυτόχρονα προβάλλει τα αρχικά δεδομένα εισόδου-εξόδου σε έναν λανθάνοντα χώρο, εξάγοντας μια σειρά από κύρια στοιχεία, γνωστά και ως λανθάνουσες μεταβλητές (LVs) με ορθογώνια δομή (Panagou et al., 2014). Το πρώτο LV μεταφέρει τη μεγαλύτερη ποσότητα πληροφοριών, ακολουθούμενο από το δεύτερο LV και ούτω καθεξής, οι οποίες επιτρέπουν την πρόβλεψη των Y εξαρτημένων μεταβλητών και την θέση στο νέο χώρο των X ανεξάρτητων μεταβλητών (Ballabio & Todeschini, 2009; Brereton & Lloyd, 2014; Gromski

et al., 2015) (**Εικόνα 2.12**). Ο βέλτιστος αριθμός LVs προσδιορίζεται με τη βοήθεια των υπολειπόμενων διακυμάνσεων έτσι ώστε να μοντελοποιηθούν χρήσιμες πληροφορίες και να αποφευχθεί η υπερβολική προσαρμογή των δεδομένων (Breton, 2006).



Εικόνα 2.12: Απεικόνιση του διαχωρισμού δύο κλάσεων από μία γραμμική περιοχή με βάση τις νέες κύριες λανθάνουσες συνιστώσες (Breton and Lloyd, 2014).

Πιο συγκεκριμένα για την εργασία, τα φασματικά δεδομένα ταξινομήθηκαν πρώτα σε έναν διδύναστο πίνακα (X), όπου οι σειρές αντιπροσωπεύουν τα δείγματα κρέατος που αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρονικά διαστήματα και οι στήλες αντιπροσωπεύουν τις μεταβλητές (36 μήκη κύματος για το MSI ή 1038 κυματιριθμούς για το FTIR). Μία στήλη (Y) που περιέχει την εξαρτημένη μεταβλητή (φρέσκα-αποψυγμένα δείγματα) εισάχθηκε σε αυτόν τον πίνακα. Για να επιτευχθεί διάκριση κάθε κλάσης, η μεταβλητή Y κωδικοποιήθηκε σε αριθμητική μορφή εκχωρώντας το 0 στην «Κλάση 1» και το 1 στην «Κλάση 2» και το 0,5 ορίστηκε ως η οριακή τιμή διαχωρισμού της (Argyri et al., 2010). Η ακρίβεια ταξινόμησης του μοντέλου PLS-DA προσδιορίστηκε από τον αριθμό των σωστά ταξινομημένων δειγμάτων κρέατος σε κάθε κλάση ποιότητας, διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων της αρχικής κλάσης (recall%). Η συνολικά σωστή ταξινόμηση (accuracy %) του μοντέλου υπολογίστηκε επίσης ως ο αριθμός των σωστών ταξινομήσεων σε όλες τις κλάσεις διαιρεμένος με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν (Panagou et al., 2014).

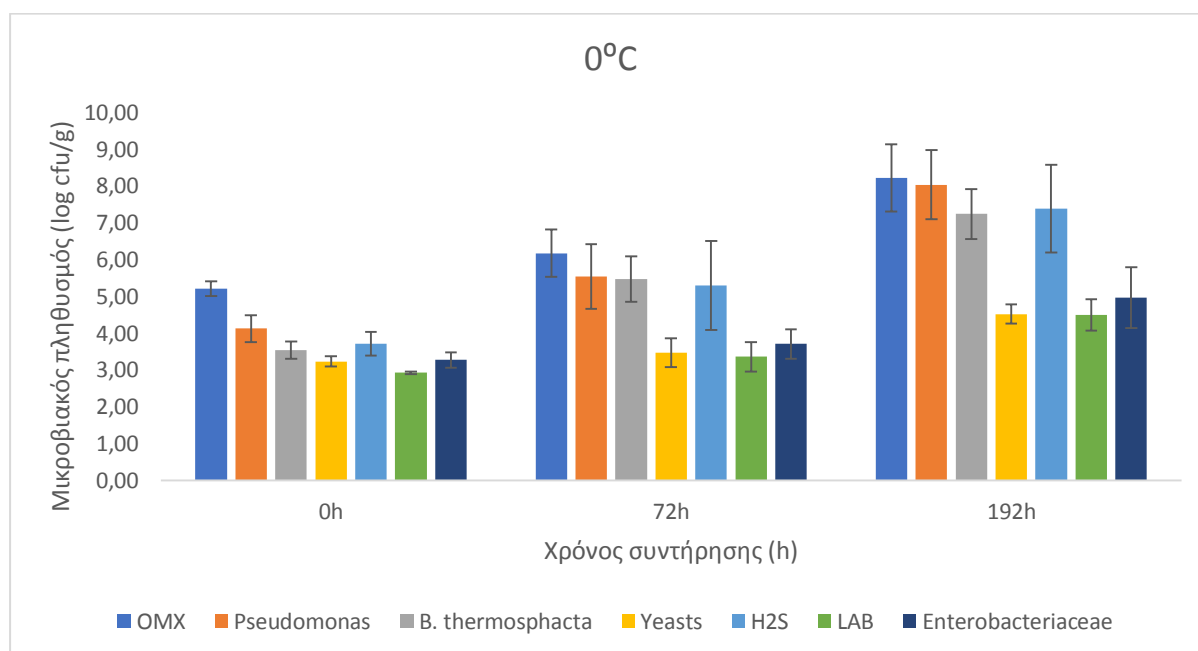
Μέσω του λογισμικού The Unscrambler© ver.9.7(CAMO Software AS, Oslo, Norway) κατασκευάστηκαν τα μοντέλα. Τα δεδομένα που προήλθαν από την πολυφασματική απεικόνιση και την φασματοσκοπία υπέρυθρου δεν έλαβαν καμία περαιτέρω προεπεξεργασία. Πιο αναλυτικά, στην πολυφασματική απεικόνιση για την ανάπτυξη (calibration) και επικύρωση (cross validation) του οργάνου, από τις συνολικά τέσσερις παρτίδες φρέσκων και αποψυγμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν όλα τα δείγματα (n=333) που ανήκουν στις τρεις παρτίδες (b2, b3, b4). Για την επικύρωση πρόβλεψης του μοντέλου αξιοποιήθηκε ο αριθμός των φρέσκων και αποψυγμένων δειγμάτων (n=120) της b1 παρτίδας. Αναφορικά με την υπέρυθρη φασματοσκοπία, χρησιμοποιήθηκαν σχεδόν τα ίδια δείγματα με την πολυφασματική απεικόνιση (n=332) για την ανάπτυξη (calibration) και επικύρωση (cross validation) του οργάνου, με εξαίρεση το δείγμα 5⁰C_72h_a_b4, το οποίο δεν συμπεριλήφθηκε στις αναλύσεις, καθώς μετά από δοκιμές αποκλείει αρκετά από τις υπόλοιπες μετρήσεις (outlier). Για την επικύρωση πρόβλεψης του μοντέλου αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα (n=118) με εξαίρεση τα δείγματα 10⁰C_48h_air_a_b1_f και 5⁰C_168h_air_a_b1 (outliers). Επιπροσθέτως για το MSI ως X μεταβλητές ορίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των 18 φασμάτων (n=36) ενώ για το FTIR οι 1038 κυματαριθμοί για κάθε δείγμα. Ως Y μεταβλητή και στις δύο περιπτώσεις ορίστηκαν οι δύο κλάσεις 0 (FROZEN) και 1 (FRESH).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

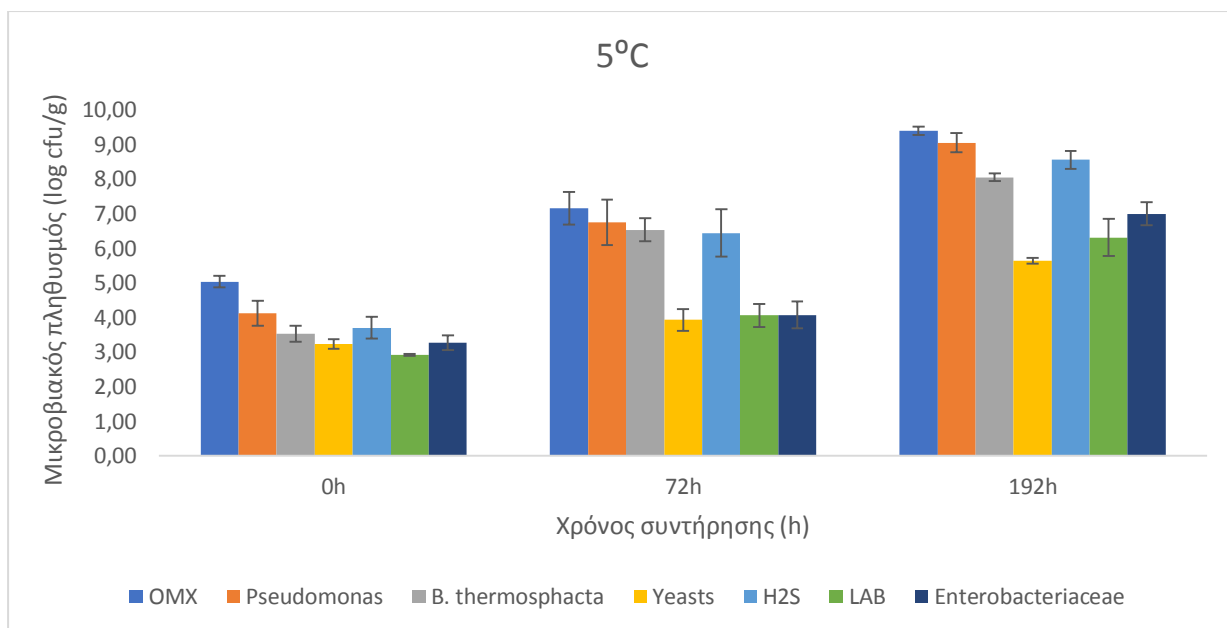
3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων

3.1.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων σε αερόβιες συνθήκες

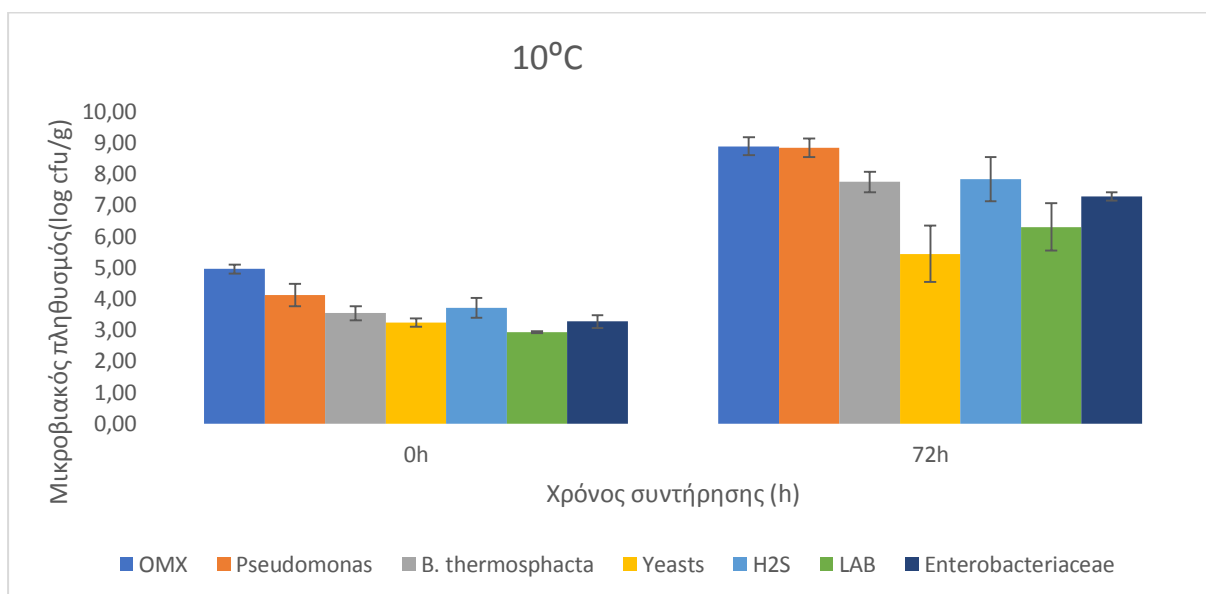
Στα παρακάτω σχήματα (διαγράμματα 3.1-3.3) παρατίθεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στις τρεις θερμοκρασίες συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι του πληθυσμού των μικροβιακών ομάδων (log cfu/g) και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις των δύο επαναλήψεων κάθε δείγματος και στις δύο παρτίδες του πειράματος (n=4). Εκτός της OMX, στους 0 και 5 °C διερευνάται η ανάπτυξη κι άλλων μικροοργανισμών σε τρεις χρονικές στιγμές, ενώ στους 10°C σε δύο. Μελετήθηκαν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, τα εντεροβακτήρια, το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S και οι ζύμες/μύκητες.



Διάγραμμα 3.1: Μετρήσεις για την συντήρηση μπούτι κοτόπουλου στους 0°C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(●), *Brochothrix thermosphacta*(●), Yeasts(●), που παράγουν H₂S(●), LAB(●) και Enterobacteriaceae(●).



Διάγραμμα 3.2: Μετρήσεις τριών χρονικών στιγμών για την συντήρηση μπούτι κοτόπουλου στους 5°C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(●), *Brochothrix thermosphacta*(●), Yeasts(●), που παράγουν H₂S(●), LAB(●) και Enterobacteriaceae(●).



Διάγραμμα 3.3: Μετρήσεις δύο χρονικών στιγμών για την συντήρηση μπούτι κοτόπουλου στους 10°C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(●), *Brochothrix thermosphacta*(●), Yeasts(●), που παράγουν H₂S(●), LAB(●) και Enterobacteriaceae(●).

Πίνακας 3.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των μετρήσεων (log cfu/g) για τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, Ζύμες/Μύκητες, που παράγουν H₂S, LAB και

Αερόβιες Συνθήκες

Enterobacteriaceae για τις θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5 και 10⁰C) σε αερόβιες συνθήκες.

Ωρα συντήρησης	Θερμοκρασία	OMX	<i>Pseudomonas</i>	<i>B. thermosphacta</i>	Enterobacteriaceae
0h	0 ⁰ C	5.08 ± 0.18	4.12 ± 0.42	3.54 ± 0.28	3.27 ± 0.01
72h	0 ⁰ C	6.18 ± 0.71	5.54 ± 0.80	5.47 ± 0.70	3.70 ± 0.38
	5 ⁰ C	7.16 ± 0.45	6.75 ± 0.65	6.54 ± 0.18	4.08 ± 0.32
	10 ⁰ C	8.89 ± 0.25	8.84 ± 0.10	7.75 ± 0.38	7.27 ± 0.10
192h	0 ⁰ C	8.38 ± 0.80	8.03 ± 1.12	7.24 ± 0.74	4.96 ± 0.95
	5 ⁰ C	9.40 ± 0.16	9.05 ± 0.01	8.05 ± 0.01	7.00 ± 0.21
Ωρα συντήρησης	Θερμοκρασία	Ζύμες/Μύκητες	H ₂ S	LAB	
0h	0 ⁰ C	3.23 ± 0.14	3.71 ± 0.36	2.92 ± 0.04	
72h	0 ⁰ C	3.47 ± 0.16	5.29 ± 1.24	3.36 ± 0.49	
	5 ⁰ C	3.94 ± 0.26	6.44 ± 0.79	4.06 ± 0.40	
	10 ⁰ C	5.45 ± 0.18	7.83 ± 0.86	6.30 ± 0.92	
192h	0 ⁰ C	4.52 ± 0.01	7.38 ± 1.43	4.50 ± 0.52	
	5 ⁰ C	5.64 ± 0.00	8.56 ± 0.21	6.32 ± 0.64	

Όπως παρατηρείται από όλα τα **Διαγράμματα (3.1-3.3)** και τον **Πίνακα 3.1** ο αρχικός πληθυσμός της OMX ισοδυναμεί με 5.08 ± 0.08 log CFU/g. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Nychas et al., 1998; Koutsoumanis et al., 2008; Doulgeraki et al., 2012) ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός στο κοτόπουλο είναι οι *Pseudomonas* spp. κάτι που επιβεβαιώνεται και στο παρόν πείραμα (9.05 ± 0.01 CFU/g), καθώς ακολουθεί αντίστοιχη ανάπτυξη με αυτή της OMX (9.40 ± 0.16 CFU/g) στους 5⁰C στις 192 ώρες συντήρησης. Μικρότερο, αλλά σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση παίζουν οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S (8.56 ± 0.21 CFU/g), και ο *B. thermosphacta* (8.05 ± 0.01 CFU/g). Οι ζύμες, οι μύκητες, (5.64 ± 0.00 CFU/g) τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) (6.32 ± 0.64 CFU/g) και τα εντεροβακτήρια (7.00 ± 0.21 CFU/g) δεν φαίνεται από τα διαγράμματα να επιδρούν σημαντικά στην αλλοίωση για τις αερόβιες συνθήκες συντήρησης.

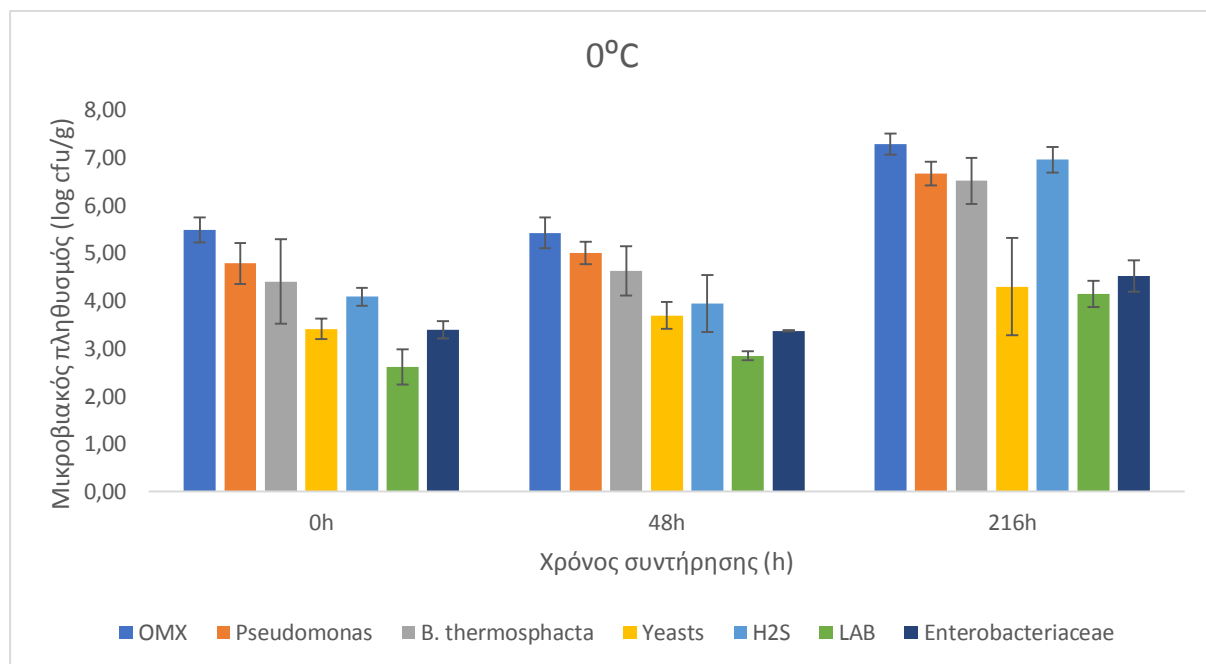
Ενδεικτικά στον **Πίνακα 3.1** φαίνεται ότι, για όλα τα είδη των μικροοργανισμών, προκύπτει αύξηση της μικροβιακής ανάπτυξης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και η χρονική διάρκεια της συντήρησης.

Οι δειγματοληψίες των δύο ανεξάρτητων παρτίδων στους 0⁰C ολοκληρώθηκαν στις 216 ώρες με τον τελικό μικροβιακό πληθυσμό της OMX να καταμετράται στους 8.58 ± 0.76 log

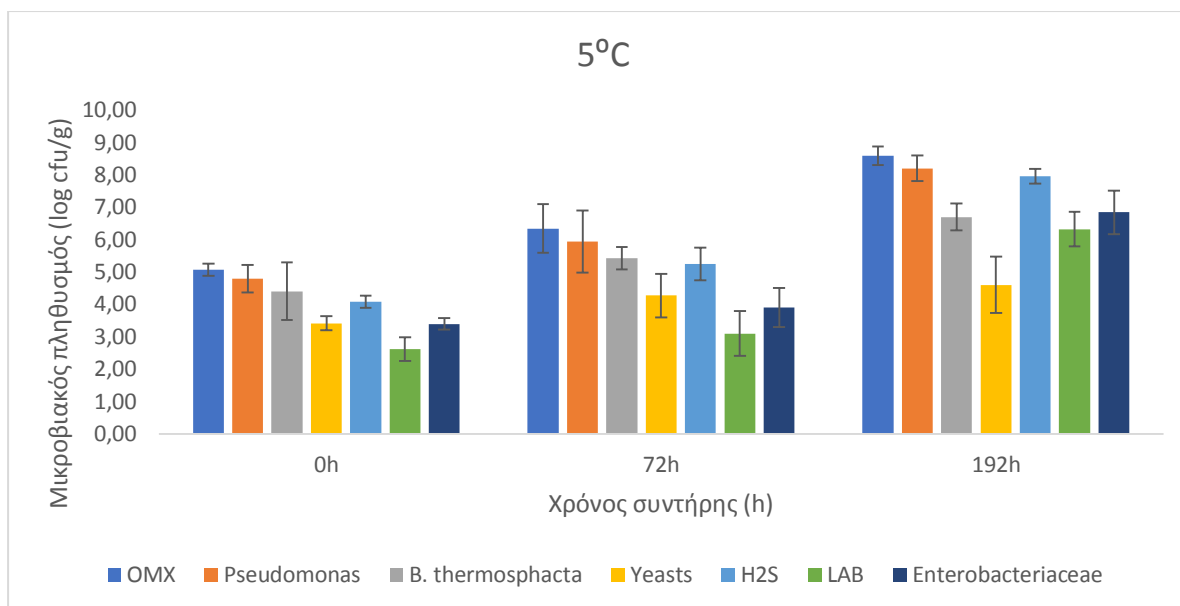
cfu/g. Αντιθέτως, τα δείγματα κοτόπουλου που συντηρήθηκαν στους 10⁰C, από τις 48 ώρες θεωρήθηκαν ήδη αλλοιωμένα με OMX 8.11 ± 0.00 log cfu/g και η πειραματική διαδικασία ολοκληρώθηκε στις 96 ώρες με 9.39 ± 0.16 log cfu/g (Διάγραμμα 3.3). Η ανάπτυξη των καμυλών στους 5⁰C συντήρησης ολοκληρώθηκε στις 192 ώρες με τελικό μικροβιακό φορτίο για την OMX 9.40 ± 0.16 log cfu/g (Πίνακας 3.1).

3.1.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων σε αναερόβιες συνθήκες

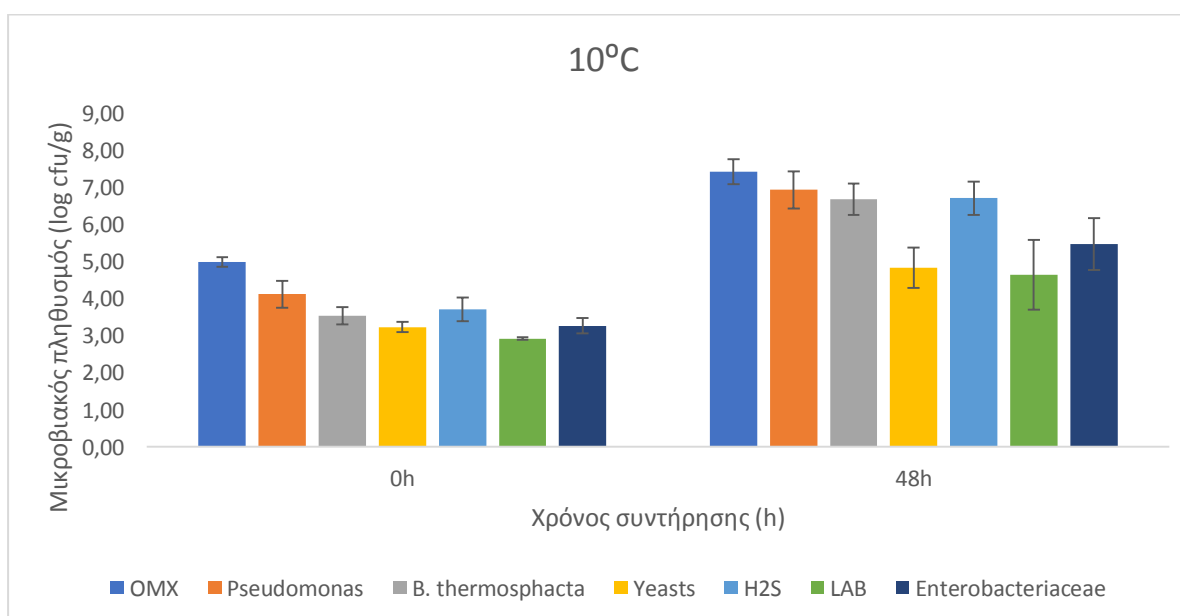
Αντίστοιχα παρουσιάζονται τα διαγράμματα και ο πίνακας ανάπτυξης των δειγμάτων κοτόπουλου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (υπό κενό) στις θερμοκρασίες 0, 5 και 10⁰C. Η πειραματική διαδικασία για την κατασκευή τους και οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί είναι ακριβώς ίδιοι με αυτούς στις αερόβιες συνθήκες που αναφέρθηκε προηγουμένως.



Διάγραμμα 3.4: Μετρήσεις τριών χρονικών στιγμών για την συντήρηση μπούτι κοτόπουλου στους 0⁰C σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(●), *Brochothrix thermosphacta*(●), Yeasts(●), που παράγουν H₂S(●), LAB(●) και Enterobacteriaceae(●).



Διάγραμμα 3.5: Μετρήσεις τριών χρονικών στιγμών για την συντήρηση μπούτι κοτόπουλου στους 5°C σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(●), *Brochothrix thermosphacta*(●), Yeasts(●), που παράγουν H₂S(●), LAB(●) και Enterobacteriaceae(●).



Διάγραμμα 3.6: Μετρήσεις δύο χρονικών στιγμών για την συντήρηση μπούτι κοτόπουλου στους 10°C σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(●), *Brochothrix thermosphacta*(●), Yeasts(●), που παράγουν H₂S(●), LAB(●) και Enterobacteriaceae(●).

Πίνακας 3.2: Συγκεντρωτικός πίνακας των μετρήσεων (log cfu/g) για τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, Ζύμες/Μύκητες, που παράγουν H₂S, LAB και

Αναερόβιες Συνθήκες

Enterobacteriaceae για τις θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5 και 10⁰C) σε συνθήκες υπό κενό.

Ωρα συντήρησης	Θερμοκρασία	OMX	<i>Pseudomonas</i>	<i>B. thermosphacta</i>	Enterobacteriaceae
0h	0 ⁰ C	5.21 ± 0.23	4.79 ± 0.50	4.41 ± 1.05	3.40 ± 0.13
48h	0 ⁰ C	5.51 ± 0.17	5.01 ± 0.29	4.63 ± 0.54	3.38 ± 0.01
	5 ⁰ C	6.41 ± 0.83	5.94 ± 1.17	5.43 ± 0.42	3.91 ± 0.68
	10 ⁰ C	7.41 ± 0.32	6.93 ± 0.50	6.68 ± 0.23	5.47 ± 0.46
216h	0 ⁰ C	7.34 ± 0.07	6.67 ± 0.12	6.52 ± 0.57	4.53 ± 0.37
	5 ⁰ C	8.55 ± 0.13	8.20 ± 0.47	6.70 ± 0.39	6.84 ± 0.79
Ωρα συντήρησης	Θερμοκρασία	Ζύμες/Μύκητες	H ₂ S	LAB	
0h	0 ⁰ C	3.42 ± 0.13	4.09 ± 0.04	2.62 ± 0.40	
48h	0 ⁰ C	3.70 ± 0.08	3.94 ± 0.72	2.85 ± 0.00	
	5 ⁰ C	4.27 ± 0.68	5.25 ± 0.62	3.10 ± 0.82	
	10 ⁰ C	4.84 ± 0.64	6.71 ± 0.20	4.65 ± 1.15	
216h	0 ⁰ C	4.30 ± 0.16	6.96 ± 0.01	4.15 ± 0.26	
	5 ⁰ C	4.61 ± 1.07	7.96 ± 0.27	6.28 ± 0.70	

Στον Πίνακα 3.2 και στα παραπάνω σχήματα παρατηρείται ότι το αρχικό φορτίο των μικροοργανισμών για τα δείγματα του κοτόπουλου, ξεπερνάει κατά λίγο τους 5 λογαριθμικούς κύκλους. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις αερόβιες συνθήκες που οι *Pseudomonas* spp. κυριάρχησαν απόλυτα από τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης, στις τροποποιημένες συνθήκες υπό κενό παρότι επικράτησαν ξανά, έχουν μεγαλύτερο ανταγωνισμό. Πιο συγκεκριμένα, το βακτήριο *B. thermosphacta* και ιδιαίτερα οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S βρίσκονται σε αντίστοιχους αριθμούς με τις ψευδομονάδες. Ρόλο σε αυτό, διαδραματίζει η θερμοκρασία συντήρησης καθώς στους 0⁰C παρατηρούνται οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S να συμβαδίζουν περισσότερο με την OMX, σε σύγκριση με τις *Pseudomonas* spp.. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα εντεροβακτήρια παρουσίασαν και σε αυτές τις συνθήκες χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης κάτι που δεν συμφωνεί με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία (Andreevskaya et al., 2015; Baylis, 2006; Samelis, 2006).

Για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 0⁰C σύμφωνα με τα Διάγραμμα 3.4 και τον Πίνακα 3.2 παρατηρήθηκε από μείωση έως ελάχιστη αύξηση στον μικροβιακό πληθυσμό

στις τροποποιημένες συνθήκες υπό κενό στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών για όλους τους μικροοργανισμούς (μεταβολή: OMX: $-0.07 \log \text{CFU/g}$, *Pseudomonas spp.*: $+0.22 \log \text{CFU/g}$, *B. thermosphacta*: $+0.23 \log \text{CFU/g}$, H₂S: $-0.17 \log \text{CFU/g}$, LAB: $+0.23 \log \text{CFU/g}$, ζύμες: $+0.28 \log \text{CFU/g}$, και Enterobacteriaceae: $-0.03 \log \text{CFU/g}$). Η συντήρηση σε αυτές τις συνθήκες διήρκησε 360 ώρες για την OMX με τελικό μικροβιακό φορτίο $8.20 \pm 0.00 \log \text{CFU/g}$, μικρότερο σχετικά με αυτό των αερόβιων συνθηκών συντήρησης όπου στις 216 ώρες καταμετρήθηκαν $8.58 \pm 0.76 \log \text{CFU/g}$. Ταυτόχρονα, παρατηρείται ότι σε αντίθεση με τις αερόβιες συνθήκες οι κυρίαρχοι αλλιογώνιοι μικροοργανισμοί που συμβαδίζουν περισσότερο με την OMX ($7.34 \pm 0.07 \log \text{CFU/g}$) είναι αυτοί που παράγουν H₂S ($6.96 \pm 0.01 \log \text{CFU/g}$), ακολουθούμενοι με μικρή διαφορά από τους *Pseudomonas spp.* ($6.67 \pm 0.12 \log \text{CFU/g}$) και τον *B. thermosphacta* ($6.52 \log \pm 0.57 \text{CFU/g}$) για τις 216 ώρες. Οι υπόλοιπες 3 κατηγορίες μικροοργανισμών παρουσιάζουν ιδιαίτερα μικρή ανάπτυξη (ζύμες: $4.30 \pm 0.16 \log \text{CFU/g}$, LAB: $4.15 \pm 0.26 \log \text{CFU/g}$, Enterobacteriaceae: $4.53 \pm 0.57 \log \text{CFU/g}$).

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 3.5** και τον **Πίνακα 3.2** για τα κοτόπουλα που συντηρήθηκαν στους 5⁰C, παρατηρείται ότι η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, επιβραδύνει την αλλοίωση τους, σε μικρότερο όμως βαθμό, συγκριτικά με τους 0⁰C. Καθώς το αρχικό επίπεδο μικροοργανισμών είναι ίδιο και στις δύο συνθήκες συντήρησης, σημειώνεται ότι η OMX σε 48 ώρες, στις υπό κενό συνθήκες αντιστοιχεί σε $6.41 \pm 0.83 \log \text{CFU/g}$, ενώ στις αερόβιες στο χρονικό διάστημα των 72 ωρών ισοδυναμεί με $7.16 \pm 0.45 \log \text{CFU/g}$, κάτι που σημαίνει ότι βρίσκεται σε επίπεδο αλλοίωσης σχεδόν ενός λογαρίθμου πάνω, μόνο ένα 24ωρο μετά. Το ίδιο συμβαίνει και με τους περισσότερους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς καθώς έχουμε τις εξής αυξομειώσεις στις αερόβιες συνθήκες: *Pseudomonas spp.*: $+0.81 \log \text{CFU/g}$, *B. thermosphacta*: $+1.11 \log \text{CFU/g}$, H₂S: $+1.19 \log \text{CFU/g}$, LAB: $+0.96 \log \text{CFU/g}$, ζύμες: $-0.34 \log \text{CFU/g}$, και Enterobacteriaceae: $+0.15 \log \text{CFU/g}$. Παρότι οι *Pseudomonas spp.* θεωρούνται μικροοργανισμοί υποχρεωτικά αερόβιοι, στις συγκεκριμένες συνθήκες συντήρησης φαίνεται να επικρατούν με τελικό μικροβιακό φορτίο στις 216 ώρες τους $8.20 \pm 0.47 \log \text{CFU/g}$ με OMX $8.55 \pm 0.13 \log \text{CFU/g}$ και ακολουθούν οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S με $7.96 \pm 0.27 \log \text{CFU/g}$.

Παρότι στις συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων υπό κενό (48 ώρες, OMX: $7.41 \pm 0.31 \log \text{CFU/g}$) στους 10⁰C (**Διάγραμμα 3.6 και Πίνακας 3.2**) παρατηρείται βραδύτερη αύξηση των μικροοργανισμών συγκριτικά με αυτή στις αερόβιες συνθήκες (48 ώρες, OMX: $8.11 \pm 0.00 \log \text{CFU/g}$), η συγκεκριμένη συσκευασία δεν είναι ικανή να κρατήσει ένα μούτι κοτόπουλου αναλοιώτο σε αυτή τη θερμοκρασία για περισσότερο από ένα 24ωρο (OMX:

6.28 ± 0.00 log CFU/g). Η εξέλιξη αυτή είναι αναμενόμενη καθώς για τέτοια θερμοκρασία δεν παρατηρείται σημαντική επιβράδυνση της ανάπτυξης λόγω της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στην συσκευασία (Koutsoumanis et al., 2008; Papadopoulou 2011). Επιπροσθέτως σημειώνεται ότι, στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών, οι τρεις μικροοργανισμοί που κυριαρχούν είναι οι *Pseudomonas spp.*: 6.93 ± 0.50 log CFU/g , *B. thermosphacta*: 6.68 ± 0.23 log CFU/g και *H₂S*: 6.71 ± 0.20 log CFU/g, χωρίς να φαίνεται κάποιος από αυτούς να υπερτερεί. Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί (LAB: 4.65 ± 1.15 log CFU/g, ζύμες: 4.84 ± 0.64 log CFU/g, και Enterobacteriaceae: 5.47 ± 0.46 log CFU/g) βρίσκονται σε ποσότητες 1 με 2 λογαριθμικούς κύκλους κάτω (**Πίνακας 3.2**).

3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH

Στις αερόβιες συνθήκες αποθήκευσης το pH παρουσιάζει αυξητική τάση στα δείγματα κοτόπουλου, με την πάροδο χρόνου. Όπως παρατηρείται στον **Πίνακα 3.3** η αρχική τιμή του pH για τις θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C είναι 6.3 ± 0.11, ενώ ως τελική ένδειξη έχουμε τις τιμές 6.32 ± 0.10, 6.42 ± 0.07 μετά από 192 ώρες και 6.39 ± 0.32 μετά από 72 ώρες αντιστοίχως. Η αύξηση αυτή οφείλεται στους μεταβολίτες που προέρχονται από την ενδογενή μικροχλωρίδα του τροφίμου και κατά πάσα πιθανότητα σε αυτούς των *Pseudomonas spp.*, ως ο κυρίαρχος μικροοργανισμός όπως φάνηκε από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα. (Ellis & Goodacre, 2001). Τα παράγωγα αυτά είναι κυρίως αμίνες, αμμωνία και σουλφίδια και ανάλογα με τη μεταβολή του pH μπορεί να υπολογιστεί και ο βαθμός αλλοίωσης του κρέατος (Nychas et al., 2007, Koutsoumanis et al., 2008). Γενικά, οι τιμές που υπολογίστηκαν είναι μέσα στο εύρος 6.2 - 6.6, που έχουν τα κοτόπουλα μετά τη σφαγή (Enfors, 2008).

Πίνακας 3.3. Τιμές του pH για τις αερόβιες συνθήκες συντήρησης του κοτόπουλου στους 0, 5 και 10°C.

Αερόβιες συνθήκες			
pH	0°C	5°C	10°C
0h	6.30 ± 0.11		
72h	6.40 ± 0.07	6.34 ± 0.16	6.39 ± 0.32
192h	6.32 ± 0.10	6.42 ± 0.07	

Σε αντίθεση με τις αερόβιες συνθήκες, στις τροποποιημένες συνθήκες συντήρησης υπό κενό το pH σταδιακά μειωνόταν στα δείγματα κοτόπουλου. Το αρχικό δείγμα υπολογίστηκε 6.45

± 0.10 , ενώ οι τελικές τιμές ήταν 6.22 ± 0.16 (0°C), 6.25 ± 0.12 (5°C) μετά από 216 ώρες και 6.25 ± 0.07 (10°C) μετά από 48 ώρες (**Πίνακας 3.4**). Σε αυτή την περίπτωση οι μεταβολίτες που φαίνεται να επηρεάζουν το pH είναι τα οργανικά οξέα που σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Οι μικροοργανισμοί που το επηρεάζουν σε αυτές τις συνθήκες, όπως αποδείχτηκε και στα μικροβιολογικά αποτελέσματα είναι οι μικροοργανισμοί που παράγουν H_2S (Briones-Gallardo et al., 2022). Επιπλέον μείωση στην τιμή του pH διαδραματίζει η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *B. thermosphacta*, καθώς συμβάλλουν στο σχηματισμό οργανικών οξέων κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης (Ellis & Goodacre, 2001; Nychas et al., 2007; Koutsoumanis et al., 2008). Να σημειωθεί ότι, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως όσο αυξάνεται η θερμοκρασία η συσκευασία υπό κενό παρουσιάζει όλο και μικρότερη επίδραση στην τιμή του pH.

Πίνακας 3.4. Τιμές του pH για τις τροποποιημένες συνθήκες υπό κενό συντήρησης του κοτόπουλου στους 0, 5 και 10°C .

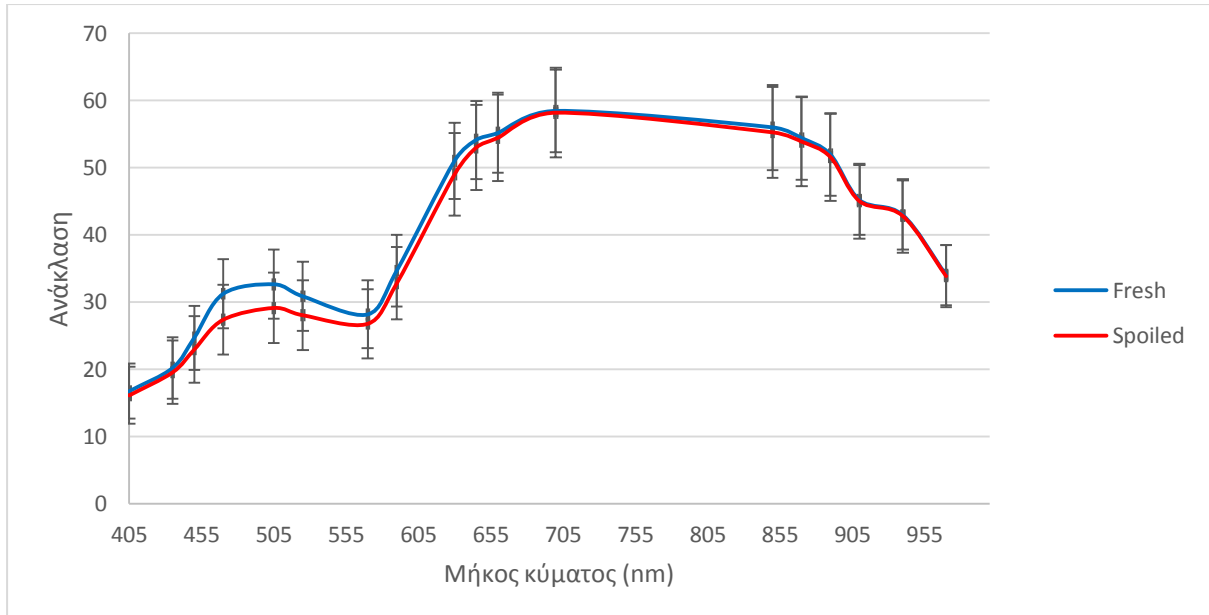
Αναερόβιες συνθήκες			
pH	0°C	5°C	10°C
0h	6.45 \pm 0.10		
48h	6.27 \pm 0.24	6.38 \pm 0.23	6.25 \pm 0.07
216h	6.22 \pm 0.16	6.25 \pm 0.12	

3.3 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων

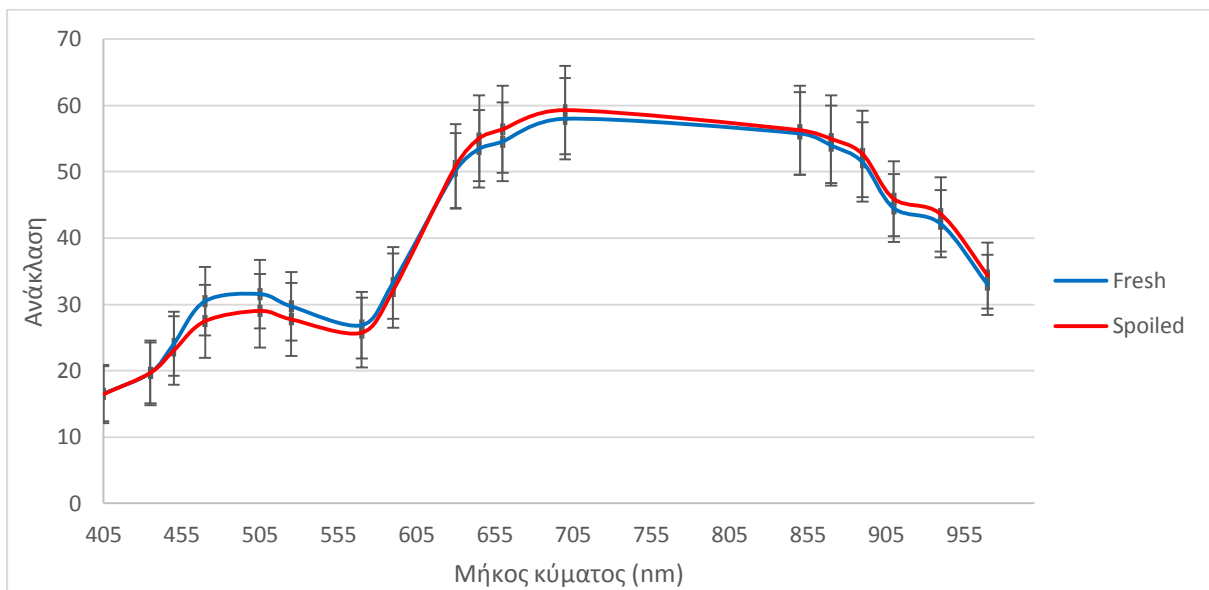
3.3.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).

Στα ακόλουθα **διάγραμματα 3.7-3.8** δίνονται τα φάσματα των φρέσκων ($< 5.7 \log \text{cfu/g}$) και αλλοιωμένων ($> 6.7 \log \text{cfu/g}$) δειγμάτων όπως προκύπτουν για τα 18 μήκη κύματος του Videometer- Lab. Παρατηρείται ότι για τις αερόβιες συνθήκες (**Διάγραμμα 3.7**) τα φρέσκα δείγματα σε κάθε μήκος κύματος αντιστοιχεί μεγαλύτερη ή αντίστοιχη ανάκλαση από ότι για τα αλλοιωμένα. Οι ενώσεις που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, και σχετίζονται άμεσα με την αλλοίωση του κρέατος, είναι η μυογλοβίνη (570 nm), η οξυμυογλοβίνη (590 nm) και η μεταμυογλοβίνη (630 nm), ενώ τα φάσματα των 700, 890, 910, 940 και 970 nm μαρτυρούν την ύπαρξη οξειδωσης (700 nm), λίπους (890, 940 nm), πρωτεϊνών (910 nm) και νερού (970 nm) (El Masry et al., 2012; Dissing et al., 2013; Ropodi et al., 2013). Στις συνθήκες συντήρησης υπό κενό (**Διάγραμμα 3.8**) παρατηρείται μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των φρέσκων και αλλοιωμένων δειγμάτων στα μήκη

κύματος 645-700 nm και 870-970 nm, το οποίο καταδεικνύει την αυξημένη ύπαρξη οξειδωσης των στοιχείων που προαναφέρθηκαν παραπάνω (Ropodi et al., 2013; 2016; Panagou et al., 2014).



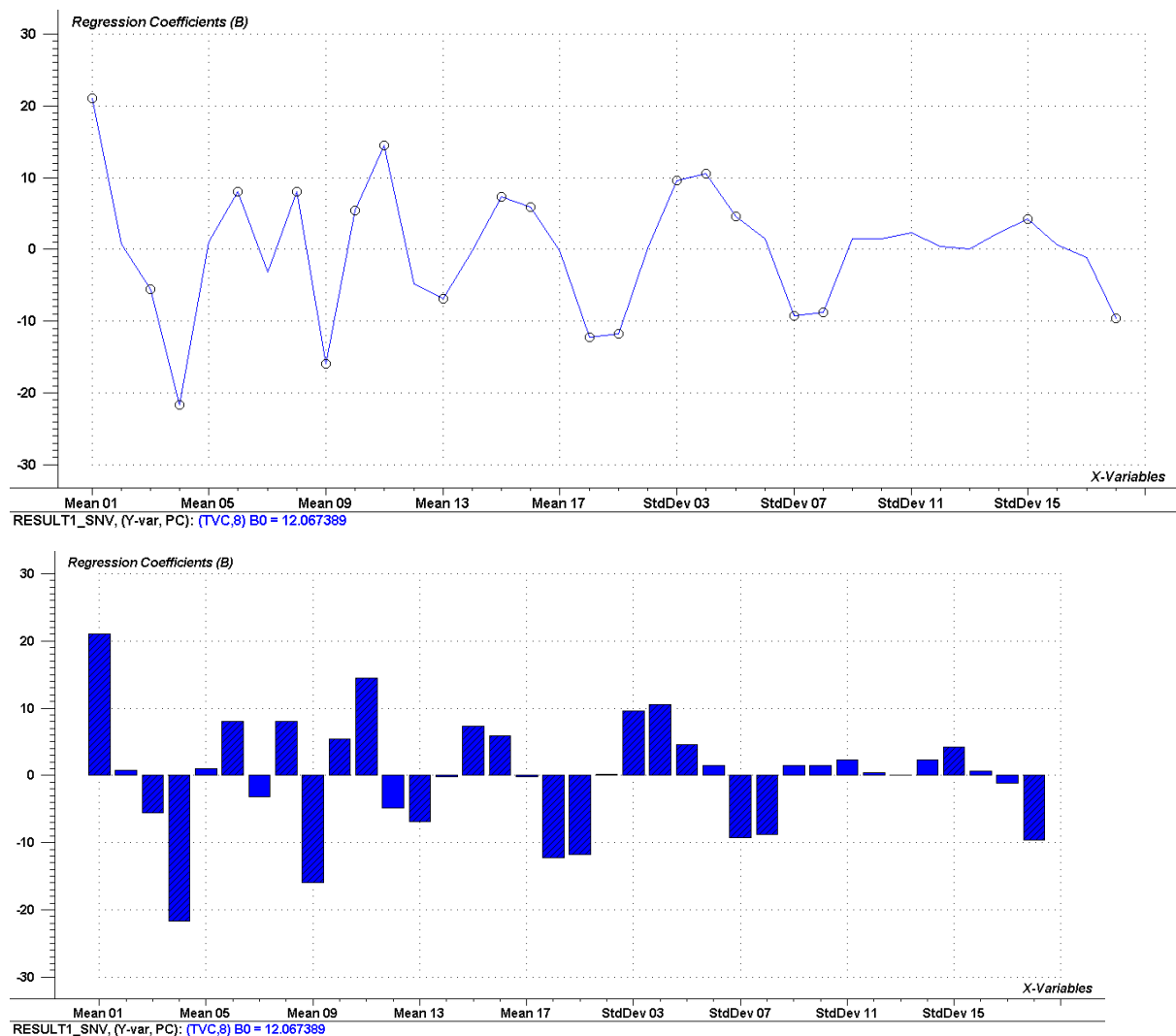
Διάγραμμα 3.7: Σύγκριση του φάσματος του φρέσκου δείγματος κοτόπουλου (—) με αυτό του αλλοιωμένου (—) για την περίπτωση συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες.



Διάγραμμα 3.8: Σύγκριση του φάσματος του φρέσκου κοτόπουλου (—) με αυτό του αλλοιωμένου (—) για την περίπτωση συντήρησης σε συσκευασία υπό κενό.

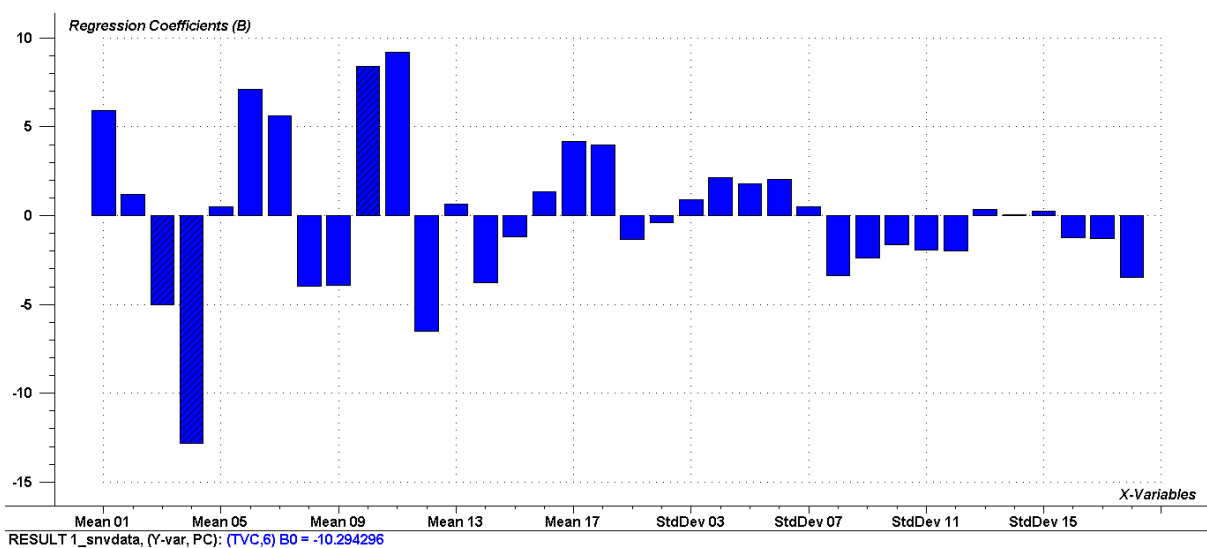
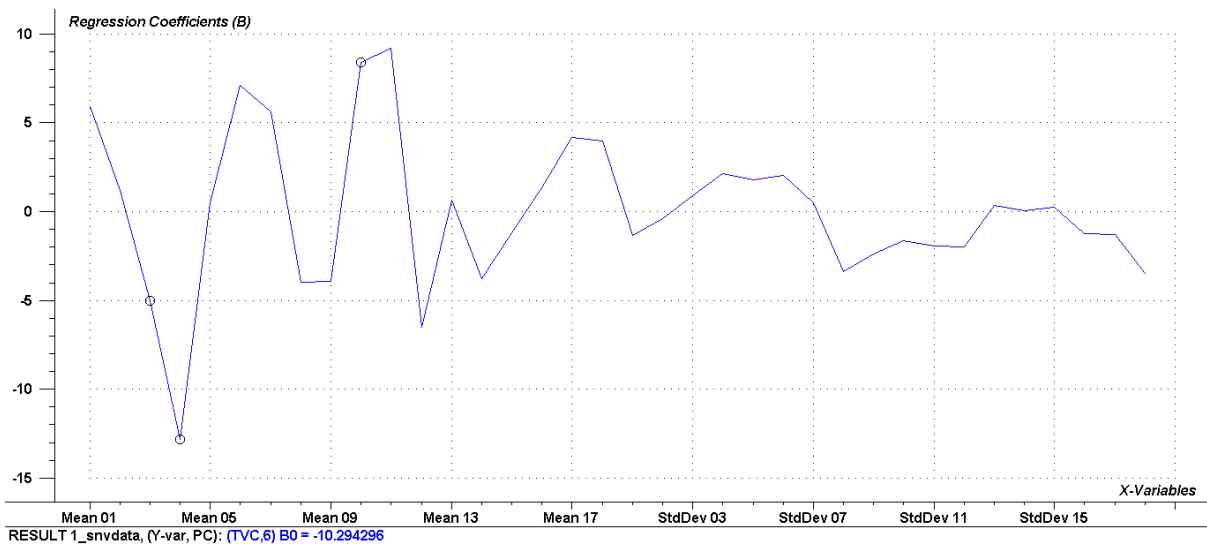
Όπως παρατηρήθηκε στα φάσματα των φρέσκων και αλλοιωμένων δειγμάτων κοτόπουλου (Διαγράμματα 3.7 και 3.8) τα διαφορετικά μήκη κύματος επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό την πρόβλεψη του μοντέλου για την OMX (ElMasry et al., 2012). Οι κατάλληλες συναρτήσεις που

προσδιορίζουν ποσοτικά την OMX, κατασκευάζονται με την βοήθεια των συντελεστών β ως οι οποίοι επηρεάζουν πιο σημαντικά την πρόβλεψη του μοντέλου (b-coefficients)(**Διαγράμματα 3.9 και 3.10**).



Διάγραμμα 3.9: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης (β) των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων για τα 18 φάσματα των δειγμάτων στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης.

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 3.9** τα φάσματα 405, 450, 470, 525, 590, 630, 645, 660, 850, 890, 910 και 970 nm φαίνεται να ασκούν σημαντική επίδραση αναφορικά με την εκτίμηση της OMX για το μοντέλο των αερόβιων συνθηκών. Πιο αναλυτικά, η οξυμυογλοβίνη (590 nm) προσδίδει στο κρέας του κοτόπουλου το ροζ χρώμα και συνδέεται με την όψη της φρεσκάδας του (Li et al, 2015). Η υψηλή τιμή του συντελεστή- β για το μήκος κύματος των 660 nm έχει να κάνει με την οξείδωση στην επιφάνεια του κοτόπουλου, η οποία συμβαίνει κατά την αλλοίωση. Τέλος, η μεγάλη επίδραση του 970 nm, οφείλεται στην παρουσία νερού στο κρέας (Barbin et al., 2013, ElMasry et al., 2012).



Διάγραμμα 3.10: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης (β) των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων για τα 18 φάσματα των δειγμάτων στις αναερόβιες συνθήκες συντήρησης.

Στην περίπτωση του μοντέλου των συνθηκών συντήρησης υπό κενό (**Διάγραμμα 3.10**) σημαντική επίδραση στην πρόβλεψη της OMX φαίνεται να επιδεικνύουν μόνο τα φάσματα των 450, 470 και 645 nm. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η μυογλοβίνη σε καμία μορφή της δεν έχει σημαντικό ρόλο στον υπολογισμό του συντελεστή- β , όπως επίσης και η οξείδωση κάποιου συστατικού.

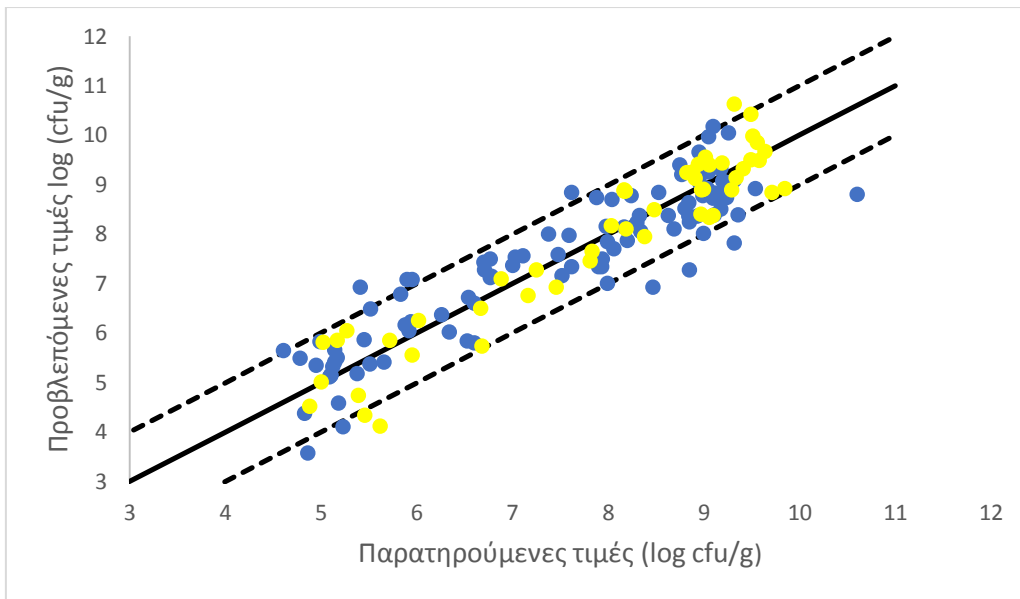
3.3.1.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα των PLS-R μοντέλων της πολυφασματικής απεικόνισης

Για την αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού της OMX σε φιλέτο από μπούτι κοτόπουλου, παρατίθενται στον **Πίνακα 3.5** οι δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη του μοντέλου στις αερόβιες και στις υπό κενό συνθήκες συντήρησης. Να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι η πρόβλεψη του μοντέλου πραγματοποιήθηκε

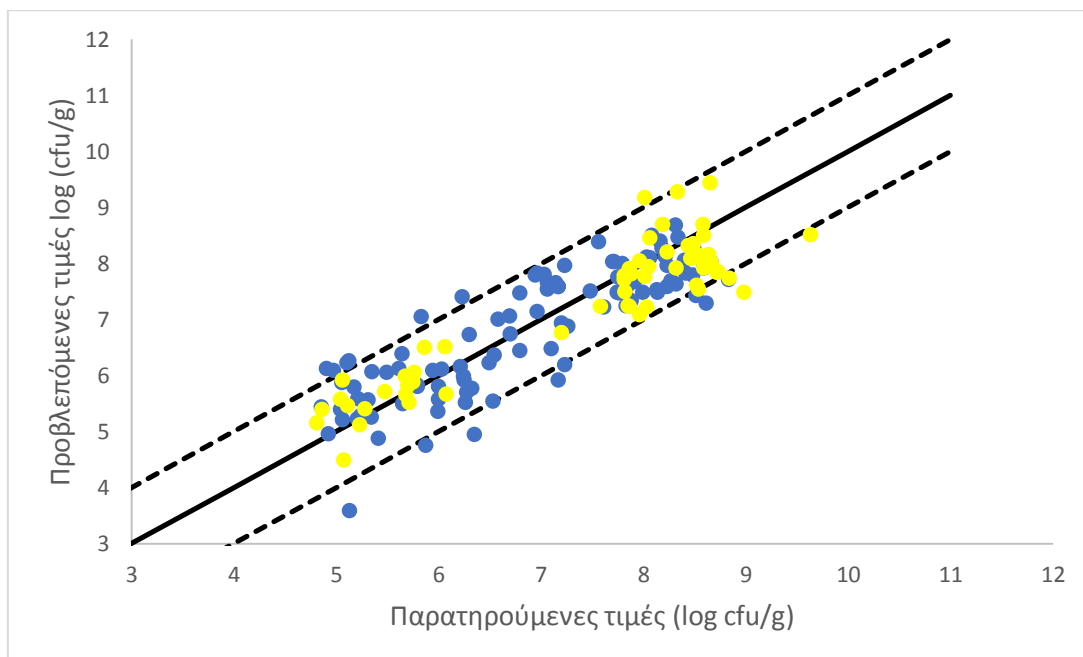
με τα δεδομένα της θερμοκρασίας των 5⁰C αποκλειστικά, με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων να είναι αντίστοιχος με τον μισό αυτού που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου. Οι συντελεστές συσχέτισης R² και για τις δύο περιπτώσεις συσκευασίας, είναι από 0.81 μέχρι 0.88 εκτός από αυτόν της επικύρωσης για τις αναερόβιες συνθήκες που αντιστοιχεί σε 0.72. Οι τιμές αυτές, συνδυαστικά με τα RMSE, όπου είναι μεταξύ 0.51 και 0.66, δείχνουν ότι τα δεδομένα από την πολυφασματική απεικόνιση συσχετίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX. Τα διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών (**Διαγράμματα 3.9 και 3.10**) ενισχύουν επίσης την άποψη για ικανοποιητική απόδοση του μοντέλου. Πιο συγκεκριμένα για τις αερόβιες συνθήκες, (**Διάγραμμα 3.9**) στην πρόβλεψη του μοντέλου το 94% (47/50) των προβλεπόμενων τιμών της OMX ήταν εντός του ορίου του ± 1 λογαρίθμου των πραγματικά παρατηρούμενων τιμών. Για τις συνθήκες συντήρησης υπό κενό (**Διάγραμμα 3.10**) περίπου το 93% (53/57) των προβλεπόμενων τιμών ήταν μέσα στο αντίστοιχο διάστημα των παρατηρούμενων τιμών.

Πίνακας 3.5 Οι επιδόσεις των PLS-R μοντέλων που συσχετίζουν την OMX των δειγμάτων από φιλέτο μπουτι κοτόπουλου με τα δεδομένα πολυφασματικής απεικόνισης.

Συντήρηση	Δεδομένα	Slope	Offset	R ²	RMSE (log cfu/g)	Εύρος OMX (log cfu/g)
Αέρας	Ανάπτυξη (n=99)	0.88	0.91	0.88	0.54	3.85-10
	Επικύρωση CV	0.85	1.09	0.82	0.66	3.57-10.17
	Πρόβλεψη (n=50)	1.04	-0.35	0.87	0.57	4.12-10.63
Κενό	Ανάπτυξη (n=105)	0.81	1.33	0.81	0.51	4.84-8.78
	Επικύρωση CV	0.80	1.37	0.72	0.62	3.59-8.68
	Πρόβλεψη (n=57)	0.80	1.33	0.83	0.57	4.49-9.45



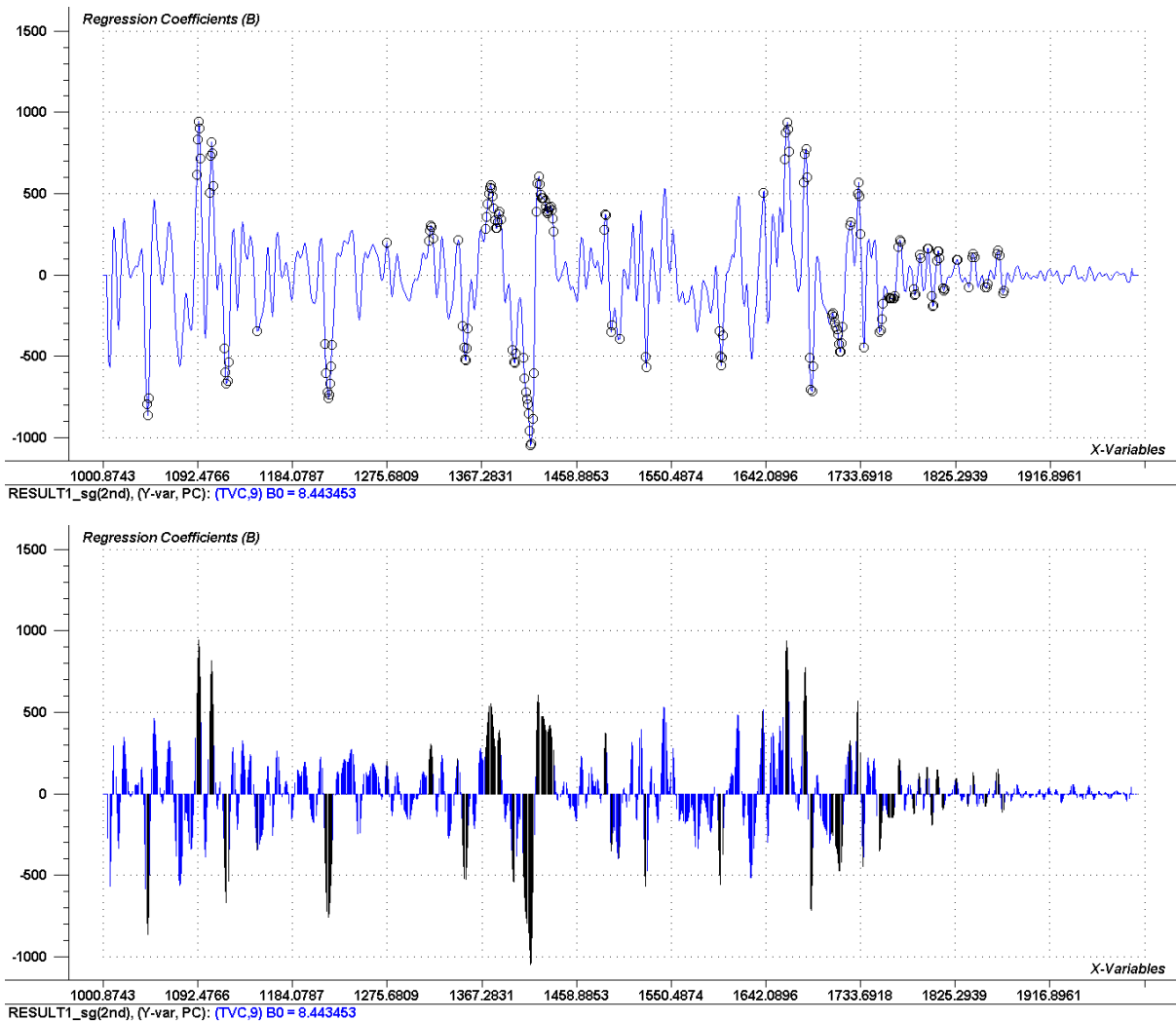
Διάγραμμα 3.9: Σύγκριση μεταξύ των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών της OMX που εκτιμήθηκαν από τα PLS-R μοντέλα με βάση την πολυφασματική απεικόνιση των δειγμάτων από φιλέτο μπουτί κοτόπουλου για την ανάπτυξη (●) και την πρόβλεψη (●) τους, αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες. Οριοθέτηση ορίων πρόβλεψης στον ± 1 λογάριθμο.



Διάγραμμα 3.10: Σύγκριση μεταξύ των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών της OMX που εκτιμήθηκαν από τα PLS-R μοντέλα με βάση την πολυφασματική απεικόνιση των δειγμάτων από φιλέτο μπουτί κοτόπουλου για την ανάπτυξη (●) και την πρόβλεψη (●) τους, αποθηκευμένα υπό αναερόβιες συνθήκες. Οριοθέτηση ορίων πρόβλεψης στον ± 1 λογάριθμο.

3.3.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπερόθρου (FTIR).

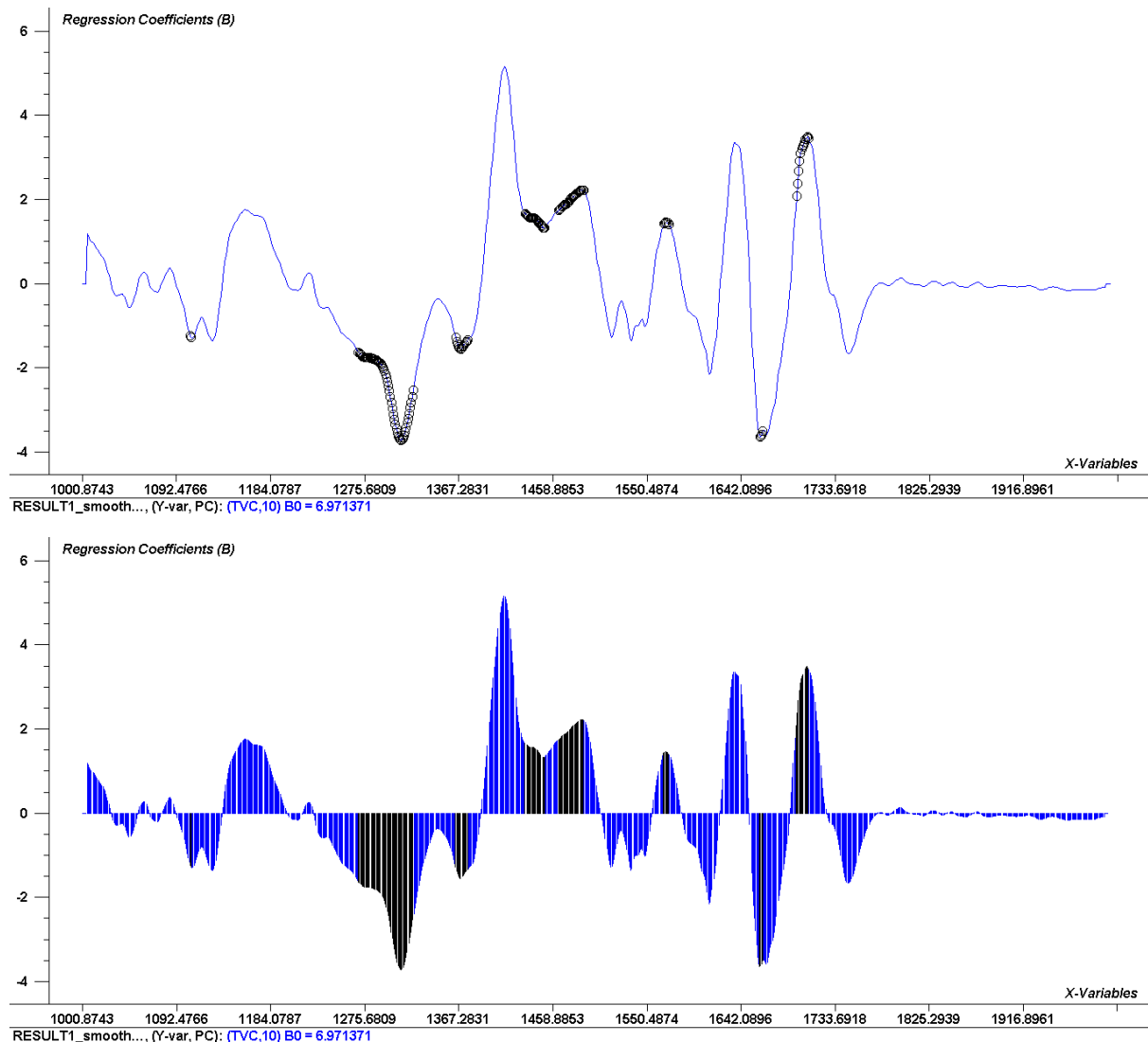
Ένα τρόφιμο κατά την αλλοίωσή του υφίσταται διάφορες βιοχημικές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να προσδιοριστούν από δακτυλικά αποτυπώματα μέσω της χρήσης των φασματοσκοπικών δεδομένων (Papadopoulou et al., 2011). Σε αυτή την εργασία, από τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν για τα φρέσκα και αλλοιωμένα δείγματα, μελετήθηκαν αυτά μεταξύ 2000 έως 1000 cm^{-1} στις διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους συντήρησης. Για το κρέας κοτόπουλου οι σημαντικότερες κορυφές παρατηρούνται στα 1639 cm^{-1} εξαιτίας της συμμετοχής του νερού (O-H δονήσεις τάσης) με ταυτόχρονη παρουσία του από αμίδιο I, στα 1550 λόγω της απορρόφησης από αμίδιο II (N-H δεσμοί, C-N δονήσεις τάσης) όπως επίσης και στα 1398. Δονήσεις αμιδίου III (C-N δονήσεις τάσης, N-H δεσμοί, C-O δονήσεις τάσης, O=C-N δονήσεις τάσης) αποδίδουν κορυφές στα 1.314 cm^{-1} και 1238 cm^{-1} . Κορυφές στα 1.460 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} και 1140 cm^{-1} οφείλονται στα λιπίδια (CO εστέρες). Τέλος, οι αμίνες δίνουν κορυφές στα 1025 έως 1140 cm^{-1} (C-N δονήσεις τάσης) (Alexandrakis et al., 2009; Vasconelos et al., 2014). Συνολικά οι αριθμοί κυμάτων για τα αμίδια I και II παρατηρούνται στα 1640 cm^{-1} και 1080 cm^{-1} , από 1320 έως 1305 cm^{-1} , από 1408 έως 1365 cm^{-1} και από 1580 έως 1480 cm^{-1} . Αυτές οι ζώνες υποδηλώνουν έντονα ότι τα φάσματα FTIR σε αυτό το εύρος των συχνοτήτων οφείλονται στην παρουσία πρωτεϊνών και πιθανών ελεύθερων αμινοξέων, αμινών η ουσιών που φέρουν άζωτο και τις αλληλεπιδράσεις τους με το νερό. Αυτό με τη σειρά του επιβεβαιώνει το γεγονός ότι οι πρωτεολυτικές αλλαγές αναγνωρίζονται ως ένα μείζον συμβάν που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μικροβιακής αλλοίωσης και συνδέεται με τη δυναμική της αλλοίωσης στο κρέας του κοτόπουλου (Ellis et al., 2004; Alexandrakis et al., 2009; Vasconelos et al., 2014). Στα παρακάτω **Διαγράμματα 3.13 και 3.14** φαίνονται οι κορυφές που δόθηκαν από τα φασματογραφήματα για τις αερόβιες και τις υπό κενό συνθήκες συντήρησης. Οι πιο σημαντικές κορυφές διαφαίνονται με μαύρο χρώμα.



Διάγραμμα 3.13: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης (β) των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων των δειγμάτων στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης.

Οι συντελεστές- β των φασματικών δεδομένων του FTIR στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων αποκάλυψαν σημαντική συμβολή ορισμένων κυματαριθμών (1045,1091-1121, 1151, 1220, 1287, 1328-1353, 1382-1435, 1487-1493, 1500, 1525, 1600, 1659-1873 cm^{-1}) για την ανάπτυξη του μοντέλου (**Διάγραμμα 3.13**) Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ζώνη απορρόφησης στα 1091-1121 cm^{-1} μπορεί να οφείλεται στις αμίνες (Alexandrakis et al., 2009; Vasconelos et al., 2014), ενώ η υψηλή απορρόφηση που συμβαίνει στις περιοχές 1220 έως και 1353 cm^{-1} σχετίζονται με την παρουσία λιπιδίων, νουκλεϊκών οξέων και αμινών από τα ελεύθερα αμινοξέα και αμιδίου III (Argyri et al., 2014). Επιπλέον, Ο κρίσιμος ρόλος των αμιδίων και των ελεύθερων αμινών για την πρόβλεψη της αλλοίωσης στο κρέας παρουσιάζεται μέσω υψηλών συντελεστών- β στα 1382-1435 cm^{-1} και 1487-1493 cm^{-1} (Brocker et al., 2007). Οι κορυφές πάνω από τα 1600 cm^{-1} μπορεί να οφείλονται στην

αυξημένη παρουσία πεπτιδίων και αμινοξέων λόγω της πρωτεόλυσης (Alexandrakis et al., 2009).



Διάγραμμα 3.14: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης (β) των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων των δειγμάτων στις αναερόβιες συνθήκες συντήρησης.

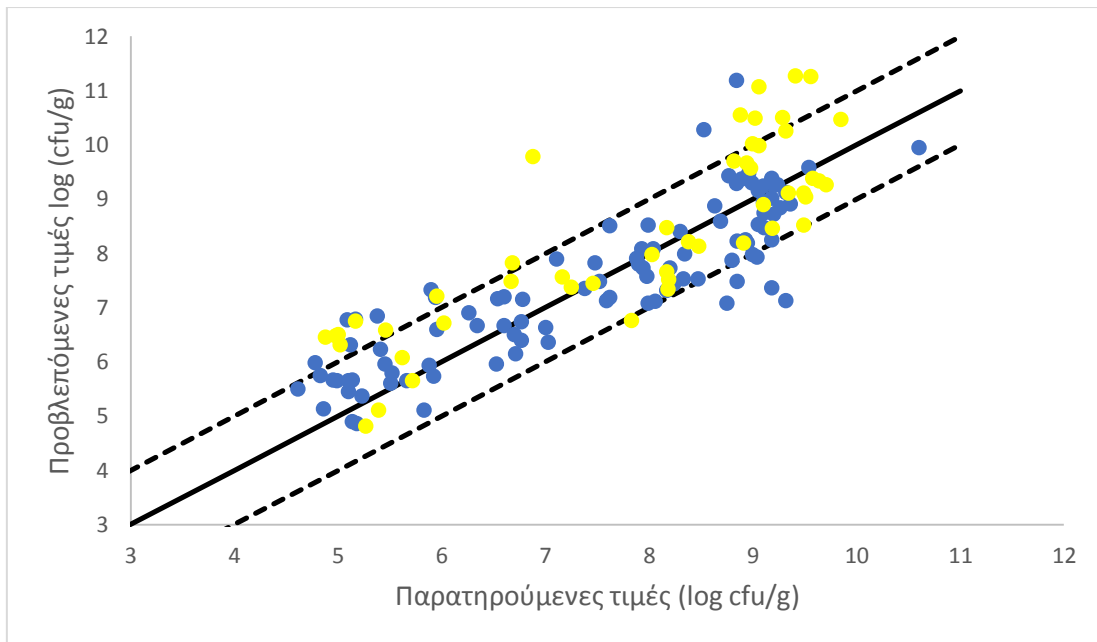
Στις συνθήκες συντήρησης υπό κενό (**Διάγραμμα 3.14**) παρατηρείται στο διάγραμμα ότι οι κρίσιμες ζώνες απορρόφησης για την ανάπτυξη του μοντέλου είναι στα 1123, 1278-1325, 1379-1386, 1433-1495, 1574 και 1665-1712 cm^{-1} . Η ζώνες απορρόφησης 1278-1325 και 1379-1386 cm^{-1} συνδέονται με το αμίδιο I, II, III και στη συνέχεια στη πρωτεολυτική δράση του *Pseudomonas spp.* στο κρέας (Nychas & Tassou, 1997; Ellis et al., 2002), όπως και η υψηλή κορυφή στα 1754 και 1665 cm^{-1} μπορεί να σημαίνει αυξημένη περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια ως αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης (Alexandrakis et al., 2009).

3.3.2.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα των PLS-R μοντέλων της φασματοσκοπίας υπερύθρου

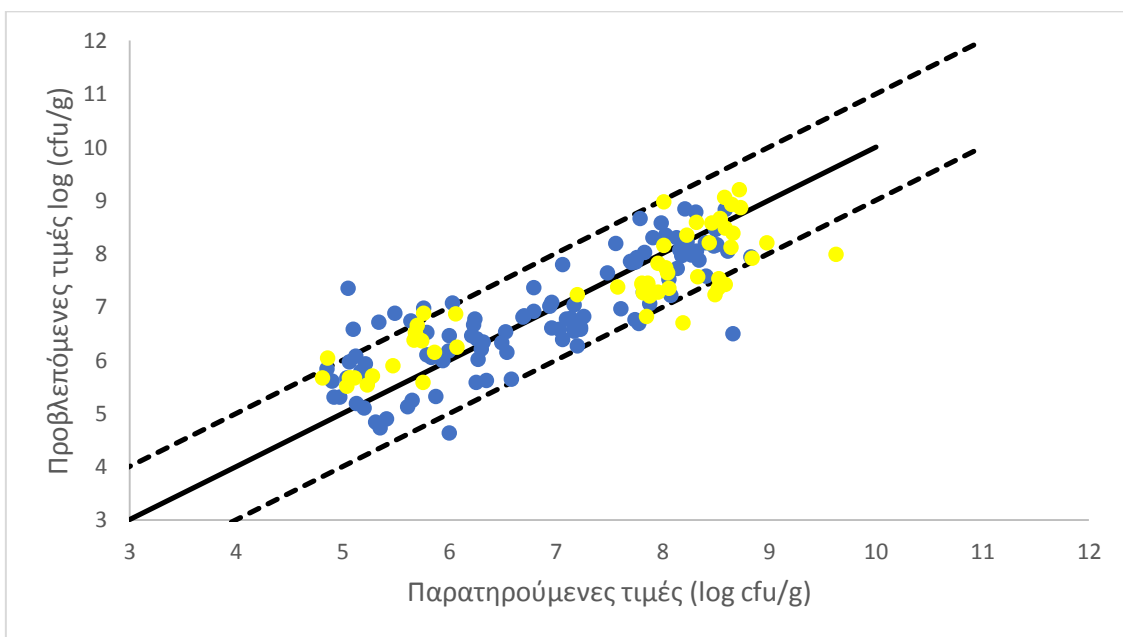
Αναφορικά με την αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού της OMX σε φιλέτο από μπούτι κοτόπουλου από τα δεδομένα του FTIR, παρατίθενται στον **Πίνακα 3.6** οι δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη του μοντέλου στις αερόβιες και στις υπό κενό συνθήκες συντήρησης. Αντίστοιχα όπως και στην ανάλυση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης έτσι η πρόβλεψη του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με τα δεδομένα της θερμοκρασίας των 5⁰C αποκλειστικά, με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων να είναι ίσο με το μισό αυτού που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου. Οι συντελεστές συσχέτισης R² και για τις δύο περιπτώσεις συσκευασίας είναι για την ανάπτυξη 0.83(αέρας) και 0.77(κενό), για την επικύρωση 0.76(αέρας) και 0.67(κενό) και για την πρόβλεψη 0.59 (αέρας) και 0.76 (κενό). Οι τιμές αυτές, συνδυαστικά με τα RMSE, όπου κυμαίνονται μεταξύ 0.56 και 1.03, δείχνουν ότι τα δεδομένα από την φασματοσκοπία υπερύθρου συσχετίζονται με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX, σε λιγότερο ικανοποιητικό βαθμό όμως συγκριτικά με αυτά της πολυφασματικής απεικόνισης. Τα διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών (**Διαγράμματα 3.15 και 3.16**) ενισχύουν επίσης αυτόν τον ισχυρισμό, ειδικότερα για τις αερόβιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα για τις αερόβιες συνθήκες, (**Διάγραμμα 3.15**) στην πρόβλεψη του μοντέλου περίπου το 71% (35/49) των προβλεπόμενων τιμών της OMX ήταν εντός του ορίου του ± 1 λογαρίθμου των πραγματικά παρατηρούμενων τιμών. Για τις συνθήκες συντήρησης υπό κενό (**Διάγραμμα 3.16**) περίπου το 88% (50/57) των προβλεπόμενων τιμών ήταν μέσα στο αντίστοιχο διάστημα των παρατηρούμενων τιμών.

Πίνακας 3.6: Οι επιδόσεις των PLS-R μοντέλων που συσχετίζουν την OMX των δειγμάτων από φιλέτο μπούτι κοτόπουλου με τα δεδομένα φασματοσκοπίας υπερύθρου.

Συντήρηση	Δεδομένα	Slope	Offset	R ²	RMSE (log cfu/g)	Εύρος OMX (log cfu/g)
Αέρας	Ανάπτυξη (n=99)	0.83	1.28	0.83	0.65	4.86-11.18
	Επικύρωση CV	0.75	1.84	0.76	0.78	4.86-11.20
	Πρόβλεψη (n=49)	0.85	1.66	0.59	1.03	4.82-11.28
Κενό	Ανάπτυξη (n=104)	0.77	1.58	0.77	0.56	4.81-8.86
	Επικύρωση CV	0.73	1.83	0.67	0.67	4.63-8.85
	Πρόβλεψη (n=57)	0.66	2.43	0.76	0.69	5.51-9.20



Διάγραμμα 3.15: Σύγκριση μεταξύ των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών της OMX που εκτιμήθηκαν από τα PLS-R μοντέλα με βάση την φασματοσκοπία υπερύθρου των δειγμάτων από φιλέτο μπουτι κοτόπουλου για την ανάπτυξη (●) και την πρόβλεψη (●) τους, αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες. Οριοθέτηση ορίων πρόβλεψης στον ± 1 λογάριθμο.



Διάγραμμα 3.16: Σύγκριση μεταξύ των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών της OMX που εκτιμήθηκαν από τα PLS-R μοντέλα με βάση την φασματοσκοπία υπερύθρου των δειγμάτων από φιλέτο μπουτι κοτόπουλου για την ανάπτυξη (●) και την πρόβλεψη (●) τους, αποθηκευμένα υπό αναερόβιες συνθήκες. Οριοθέτηση ορίων πρόβλεψης στον ± 1 λογάριθμο.

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

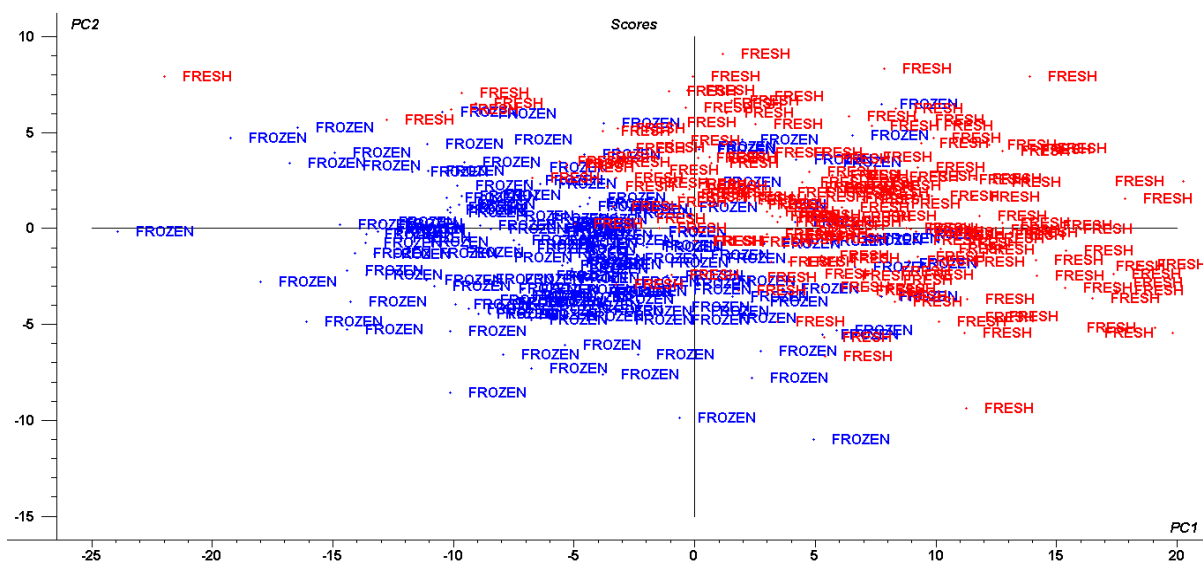
3.3.3.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα των PLS-DA μοντέλων της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).

Η διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων δίνει την δυνατότητα στον διαχωρισμό και την ταξινόμηση σε υπο-σύνολα φρέσκα - αποψυγμένα. Τα αποτελέσματα της ελεγχόμενης μεθόδου ανάλυσης δεδομένων δίνονται αριθμητικά (% ευαισθησία, % ακρίβεια και % συνολική ακρίβεια) υπό την μορφή του **Πίνακα 3.7**. Παρατηρείται ότι τα μοντέλα ταξινόμησης δειγμάτων κοτόπουλου έχουν μεγάλη ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των κλάσεων του φρέσκου και του αποψυγμένου. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζει 97.65% (φρέσκο) και 93.87 % (κατεψυγμένο) ευαισθησία κατά την ανάπτυξη, 97.65 % (φρέσκο) και 92.02% (κατεψυγμένο) κατά την επικύρωση καθώς και 83.33 % για το φρέσκο και 91.67 % για το κατεψυγμένο κατά την διαδικασία της πρόβλεψης. Επίσης, σε όλες τις διαδικασίες για την δημιουργία του μοντέλου η % συνολική ακρίβεια συγκέντρωνε ποσοστά από 95.80% μέχρι 87.50 %. Όπως γίνεται αντιληπτό, το μοντέλο που κατασκευάστηκε μπορούσε επιτυχώς σε μεγάλο βαθμό να διαχωρίσει και εν συνεχεία να ταξινομήσει σωστά τα φρέσκα και τα αποψυγμένα δείγματα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από το **Διάγραμμα 3.17**, όπου παρατηρείται σχετικά σαφής διαχωρισμός τους.

Πίνακας 3.7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φιλέτου από μπούτι κοτόπουλου για τις δύο κλάσεις αλλοίωσης με τα δεδομένα από την πολυφασματική απεικόνιση.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ	ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ %
		ΦΡΕΣΚΟ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ		
ΑΝΑΠΤΥΞΗ	ΦΡΕΣΚΟ	166	4	170	97.65
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	10	153	163	93.87
	ΑΚΡΙΒΕΙΑ %	94.32	97.45	333	
	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ %				95.80
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	ΦΡΕΣΚΟ	ΦΡΕΣΚΟ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ %
		166	4		
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	13	150	163	92.02
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ %	94.32	95.54	333
	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ %				94.89

ΠΡΟΒΛΕΨΗ		ΦΡΕΣΚΟ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ %
	ΦΡΕΣΚΟ	50	10	60	83.33
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	5	55	60	91.67
	ΑΚΡΙΒΕΙΑ %	90.91	84.62	120	
ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ %					87.50



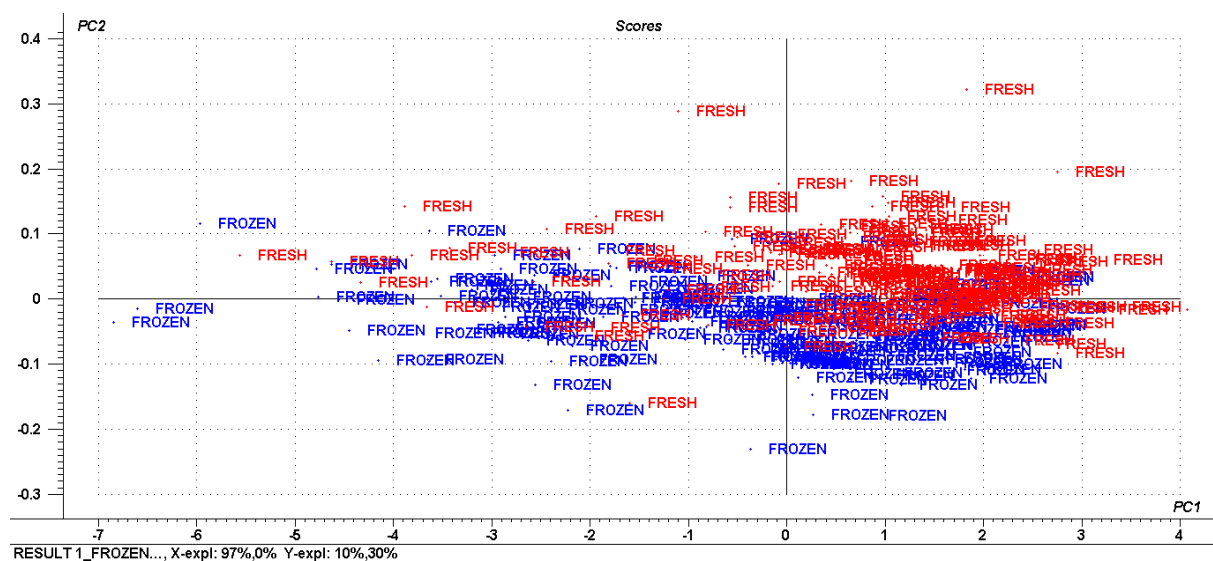
Διάγραμμα 3.17: Χωροταξική απεικόνιση των δυο κλάσεων (Φρέσκο: **Fresh**, Κατεψυγμένο: **Frozen**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λαθάνουσες συνιστώσες, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα φιλέτου από μπούτι κοτόπουλο.

3.3.3.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα των PLS-DA μοντέλων της φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR).

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.8, το μοντέλο που κατασκευάστηκε για τα δεδομένα του FTIR κατάφερε σε μεγαλύτερο βαθμό από τη μέθοδο MSI να διαχωρίσει και εν συνεχεία να ταξινομήσει σωστά τα φρέσκα από τα κατεψυγμένα δείγματα, καθώς υπολογίστηκε ευαισθησία 99.41 % (ανάπτυξη), 98.22 % (επικύρωση) και 100 % (πρόβλεψη). Παρότι τα ποσοστά της ευαισθησίας για την διάκριση των κατεψυγμένων δειγμάτων ήταν πολύ ικανοποιητικά κατά την ανάπτυξη (100%) και την επικύρωση (98.77%), το μοντέλο δεν λειτούργησε καλά για την πρόβλεψη (55.93%). Η συνολική ακρίβεια αντίστοιχα ανέρχεται στο 99.70 % για την ανάπτυξη, 98.49 % για την επικύρωση και 77.97 % για την πρόβλεψη του μοντέλου, ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την επιτυχία του μοντέλου. Επιβεβαίωση αυτών των ποσοτικών δεδομένων μπορεί να παρατηρηθεί και από την χωροταξική απεικόνιση του μοντέλου (Διάγραμμα 3.18)

Πίνακας 3.8: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φιλέτου από μπουτί κοτόπουλου για τις δύο κλάσεις αλλοίωσης με τα δεδομένα από την φασματοσκοπία υπερύθρου.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ %	
	ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΦΡΕΣΚΟ			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ	ΦΡΕΣΚΟ	168	1	169	99.41
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	0	163	163	100.00
	ΑΚΡΙΒΕΙΑ %	100.00	99.39	332	
	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ %				99.70
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	ΦΡΕΣΚΟ	166	3	169	98.22
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	2	161	163	98.77
	ΑΚΡΙΒΕΙΑ %	98.81	98.17	332	
	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ %				98.49
ΠΡΟΒΛΕΨΗ	ΦΡΕΣΚΟ	59	0	59	100.00
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ	26	33	59	55.93
	ΑΚΡΙΒΕΙΑ %	69.41	100.00	118	
	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ %				77.97



Διάγραμμα 3.18: Χωροταξική απεικόνιση των δυο κλάσεων (Φρέσκο: **Fresh**, Κατεψυγμένο: **Frozen**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες **LVs: 1-2**, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα φιλέτου από μπουτί κοτόπουλο.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης συμβαδίζουν με την διεθνή βιβλιογραφία, καθώς δείχνουν την καθοριστική επίδραση της θερμοκρασίας αλλά και του είδους της συσκευασίας στην ανάπτυξη της αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας στο μπούτι του κοτόπουλου. Στις αερόβιες συνθήκες, οι *Pseudomonas spp.* ανέπτυξαν τους μεγαλύτερους πληθυσμούς σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης και ακολουθούν οι μικροοργανισμοί που παράγουν H₂S και ο *B. thermosphacta*. Στους 0°C μπορεί να χαρακτηριστεί οριακά αλλοιωμένο μετά από 96 ώρες επώασης (OMX: 6.76 ± 0.66 log cfu/g), ενώ στους 5°C στις 48 ώρες ο πληθυσμός ήταν 6.87 ± 0.00. Για το ίδιο χρονικό διάστημα στους 10°C τα δείγματα ήταν αλλοιωμένα με πληθυσμό (OMX) και 8.11 ± 0.00 log cfu/g.

Στις τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες υπό κενό βάση της διεθνούς βιβλιογραφίας (Hernandez-Macedo et al., 2011; Andreevskaya et al., 2015), επικρατούν κυρίως οι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, και από αυτούς σε μεγαλύτερο βαθμό τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB). Στις παρούσες μικροβιολογικές αναλύσεις όμως, αν και αυτή η κατηγορία μικροοργανισμών συναντάται σε αρκετά μικρούς λογαριθμικούς κύκλους συγκριτικά με την OMX, όπως για παράδειγμα στους 0°C και στις 216 ώρες (4.30 ± 0.16 log cfu/g, με OMX 7.34 ± 0.07 log cfu/g), παρατηρήθηκε αύξηση της τάξεως των περίπου τεσσάρων λογαρίθμων, κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων στους 5°C. Αυτή είναι και η μεγαλύτερη αύξηση ανάμεσα στους μικροοργανισμούς. Αντιστρόφως οι *Pseudomonas spp.* (6.67 ± 0.12 log cfu/g) που αναμένονταν σε μικρούς πληθυσμούς ως υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, σε συνέργεια με εκείνους που παράγουν H₂S (6.96 ± 0.01 log cfu/g), φαίνονται ως οι κύριοι υπαίτιοι για την αλλοίωση στα φιλέτα από μπούτι κοτόπουλου, ακολουθώντας την πορεία της OMX. Στη συσκευασία υπό κενό αέρος, παρουσιάζεται καθυστέρηση στην ανάπτυξη συγκριτικά με αυτή στον αέρα για την OMX, κυρίως στους 0°C συντήρησης καθώς η αλλοίωση επέρχεται μετά από 168 ώρες (6.84 ± 0.00 log cfu/g). Όσον αφορά τα κοτόπουλα που συντηρήθηκαν στους 5 και 10°C, παρατηρείται ότι η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, επιβραδύνει την αλλοίωση τους, σε μικρότερο όμως βαθμό, συγκριτικά με τις αερόβιες συνθήκες κάτι που συμφωνεί και με την βιβλιογραφία (Koutsoumanis et al., 2008; Papadopoulou, 2011).

Γενικά, το pH των δειγμάτων φαίνεται να μην επηρεάζεται καθόλου από τη θερμοκρασία γιατί κατά τη διάρκεια της συντήρησης παρουσιάστηκε με αυξομειώσεις μεταξύ των 0, 5 και 10°C. Αντίθετα, σημαντικό ρόλο πιθανότατα διαδραματίζει η συσκευασία συντήρησης, καθώς στις αερόβιες συνθήκες το pH αυξάνεται έστω και οριακά με το πέρασ του χρόνου,

ενώ στις συνθήκες υπό κενό παρατηρείται μείωση. Άρα η τιμή του pH για το κοτόπουλο επηρεάζεται κυρίως από τις ενδογενείς μεταβολές του προϊόντος, οι οποίες οφείλονται κατά κύριο λόγο στην πρωτεολυτική δραστηριότητα των *Pseudomonas spp.*, στην παραγωγή οργανικών οξέων από τον *B. thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) (Ellis & Goodacre, 2001) και στην παρουσία του H₂S που προκύπτει από αυτή τη συγκεκριμένη ομάδα μικροοργανισμών η οποία φαίνεται να επικρατεί στις αναερόβιες συνθήκες (Briones-Gallardo et al., 2022).

Τα μοντέλα εκτίμησης της OMX σε μπούτι κοτόπουλου κάτω υπό αερόβιες και υπό κενό ατμοσφαιρικές συνθήκες σύμφωνα με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) μπορούν να θεωρηθούν αρκετά ικανοποιητικά. Πιο συσκευασμένα, οι δείκτες για την πρόβλεψη μετρήθηκαν RMSE = 0.57, R² = 0.87 για τις αερόβιες συνθήκες και RMSE = 0.57, R² = 0.83, για τις συνθήκες υπό κενό αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον συντελεστή-β, τα μήκη κύματος που συνεισφέρουν περισσότερο στην κατασκευή του μοντέλου είναι στα 590, 660 και 970 nm καθώς αυτές οι τιμές συνδέονται με την οξυμυογλοβίνη, την οξειδωση και την παρουσία νερού στην επιφάνεια του κρέατος κοτόπουλου (Barbin et al., 2013; El Masry et al., 2013; Li et al., 2015). Αντίθετα, τα μήκη κύματος που ανέδειξε ο συντελεστής παλινδρόμησης στον υπολογισμό του για τις υπό κενό συνθήκες (450, 470 και 645 nm), σύμφωνα με την βιβλιογραφία, δεν συνδέονται με κάποια αξιολογη μεταβολή στα συστατικά του κοτόπουλου και για αυτό χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Τα αντίστοιχα μοντέλα πρόβλεψης με βάση τα δεδομένα όμως της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FTIR), αν και λιγότερο ακριβή από τα προηγούμενα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της αλλοίωσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι δείκτες πρόβλεψης ήταν RMSE = 1.03, R² = 0.59 για τις αερόβιες συνθήκες και RMSE = 0.69, R² = 0.76, για τις συνθήκες υπό κενό αντίστοιχα. Ο συντελεστής παλινδρόμησης επέδειξε διαφορετικές κορυφές απορρόφησης στα φασματικά δεδομένα των αερόβιων (1045, 1091-1121, 1151, 1220, 1287, 1328-1353, 1382-1435, 1487-1493, 1500, 1525, 1600, 1659-1873 cm⁻¹) και αναερόβιων συνθηκών (1123, 1278-1325, 1379-1386, 1433-1495, 1574 και 1665-1712 cm⁻¹).

Ο ποιοτικός διαχωρισμός των δειγμάτων του κοτόπουλου σε δύο υπο-κατηγορίες, αυτές του φρέσκου και του κατεψυγμένου παρουσίασαν ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο μεθόδων φασματοσκοπίας. Για την περίπτωση της πολυφασματικής απεικόνισης, το μοντέλο εκτίμησης της αλλοίωσης PLS-DA επέδειξε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 87.50%.

Αντίστοιχα, τα μοντέλα εκτίμησης της αλλοίωσης για την υπέρυθη φασματοσκοπία, παρότι ικανοποιητικά, παρουσιάστηκαν λιγότερο αποδοτικά από τα προηγούμενα, καθώς διαχώρισαν τα φρέσκα και κατεψυγμένα δειγμάτων με συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 77.97%.

Συμπερασματικά, τα μικροβιολογικά αποτελέσματα ανέδειξαν την συνδυαστική επίδραση της θερμοκρασίας και των τροποποιημένων συνθηκών υπό κενό στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας στο φιλέτο από μπούτι κοτόπουλου. Τα μοντέλα εκτίμησης της OMX που κατασκευάστηκαν με βάση τα δεδομένα πολυφασματικής απεικόνισης παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και καλύτερη συγκριτικά με αυτά που βασίστηκαν στην υπέρυθη φασματοσκοπία. Αντίστοιχα, στα μοντέλα διακριτικής ανάλυσης με βάση τα δεδομένα (MSI) επιτεύχθηκε ακόμα καλύτερη πρόβλεψη στην ακρίβεια διαχωρισμού συγκριτικά με την άλλη μέθοδο, των φρέσκων και κατεψυγμένων δειγμάτων. Κλείνοντας, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι κυρίως η μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης με το Videometer και δευτερευόντως η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχισμό κατά Fourier αποτελούν γρήγορες χρήσιμες και μη-επεμβατικές μέθοδοι που είναι ικανές να ανιχνεύσουν την αλλοίωση στην επιφάνεια του προϊόντος. Ωστόσο για την αντικατάσταση των χρονοβόρων μικροβιολογικών μεθόδων με άλλες αντίστοιχες ταχείες μεθόδους ανάλυσης, απαιτείται αξιοποίηση δεδομένων και δειγμάτων σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών και σε διάφορες συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, έτσι ώστε να γίνει ευκολότερα αντιληπτή η πορεία αλλοίωσης με βάση τις βιοχημικές μεταβολές του κοτόπουλου όπως και άλλων κρεάτων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdi H., 2003. Partial Least Squares (PLS). Regression. In: Lewis-Beck M., Bryman, A., Futing T. (eds.). Encyclopedia of Social Sciences Research Methods. Thousand Oaks (CA): Sage.

Adams M. R., Moss M. O., 1995. Food microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Adams M. R., Moss M. O., 2008. Food Microbiology, In: *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry. Cambridge: UK.

Alexandrakis D., Downey G., Scannell A., 2009. Rapid Non-destructive Detection of Spoilage of Intact Chicken Breast Muscle Using Near-infrared and Fourier Transform Mid-infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 5(1): 338-347.

Allen C., Russel S., Fletcher D., 1997. The relationship of broiler breast meat colour and pH to shelf-life and odor development. *Poultry science*, Vol. 76: 1042-1046.

Alonso-Calleja C., Martinez-Fernandez B., Prietto M., Capita R., 2004. Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiology*, Vol. 21(2): 241-246.

Ammor M. S., Argyri A., Nychas G. J. E., 2009. Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, Vol. 81: 507-514.

Andreevskaya M., Johansson P., Laine P., Smolander O. P., Sonck M., Rahkila R., Bjorkroth J., 2015. Genome sequence and transcriptome analysis of meat-spoilage-associated lactic acid bacterium *Lactococcus piscium* MKFS47. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 81(11): 3800-3811.

Argyri A. A., Panagou E. Z., Tarantilis P.A., Polysiou M., Nychas, G. J. E., 2010. Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial networks. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 145: 146-154.

Argyri, A. A., Doulgeraki A. I., Blana V. A., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2011. Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.

Argyri A. A., Jarvis R. M., Wedge D., Xu Y., Panagou E. Z., Goodacre R., Nychas G. J. E., 2013. A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, Vol. 29(2): 461-470.

Argyri A. A., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2014. Monitoring microbial spoilage of foods by vibrational spectroscopy (FT-IR & Raman). *Novel food preservation and microbial assessment techniques*, 386.

Arnaut-Rollier I., 1999. Identities of the *Pseudomonas spp.* in flora from chilled chicken. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 48(2): 87-96.

Arslan S., Eyi A., Özdemir F., 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas spp.* isolated from cheeses. *J. Dairy Sci.*, Vol. 94: 5851–5856.

Ballabio D., Todeschini R., 2009. Multivariate Classification of Qualitative Analysis. In: Sun D. W.(ed.). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Oxford: Elsevier Inc.

Ballin N. Z., Vogensen F. K., Karlsson A. H., 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, Vol. 83(2): 165-174.

Barbin D. F., Elmasry G., Sun D.-W., Allen P., 2013. Non-destructive determination of chemical composition in intact and minced pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, Vol. 138: 1162–1171.

Barbut S., 2014. Review: Automation and meat quality-global challenges. *Meat Sci.*, Vol. 96(1): 335-345.

Barnett J., Bejen F., Howes S., Regan A., McConnon A., Marcu A., Rowntree S., Verbeke W., 2016. Consumers' confidence, reflections and response strategies following the horsemeat incident. *Food Control*, Vol. 59: 721–730.

Baylis C. L., 2006. Enterobacteriaceae. Microbiology Department, Campden and Chorleywood Food RA, Chipping Campden, GL55 6LD, UK. Food spoilage microorganisms: 624-667.

Bi Y., Yuan K., Xiao W., Wu J., Shi C., Xia J., Chu G., Zhang G., Zhou G., 2016. A local pre-processing method for near-infrared spectra, combined with spectral segmentation and standard normal variate transformation. *Analytica Chimica Acta.*, Vol. 909: 30-40.

Borch E., Kant-Muemansb M. L., Blixt Y., 1996. Bacterial spoilage of meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 33: 103-120.

Brereton R. G., 2006. Consequences of sample size, variable selection, model validation and optimization for predicting classification ability from analytical data. *Trends Anal. Chem.* Vol. 25: 1103- 1111.

Brereton R. G., Lloyd G. R., 2014. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemometrics.* Vol. 28: 213-225.

Briones-Gallardo R., González-Muñoz M., García-Bautista I., Valdés-Lozano D., Toledano-Thompson T., Polanco-Lugo E., Rivera-Madrid R., Valdez-Ojeda R., 2022. Hydrogen Sulfide Production with a Microbial Consortium Isolated from Marine Sediments Offshore. *J. Mar. Sci. Eng.*, Vol. 10: 436.

Brocker U., Ofstad R., Wu Z., Bertram H. C., Sockalingum G. D., Manfait M., Kohler A., 2007. Revealing covariance structures in Fourier transform infrared and Raman microspectroscopy spectra: a study on pork muscle fiber tissue subjected to different processing parameters. *Appl. Spectrosc.*, Vol. 61 (10): 1032–1039.

Carstensen J. M., Hansen J. F., 2003. An apparatus and a method of recording an image of an object. Patent family EP1051660. Issued in 2003.

Carstensen J. M., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2013. Quantitative Analysis of Meat Spoilage using VIS/NIR Spectral Imaging.

Casaburi A., Piombino P., Nychas G. J., Villani F., Ercolini D., 2015. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food microbiology*, Vol. 45: 83-102.

- Cenci-Coga B. T., 2012.** Fattori che influenzano la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi negli alimenti. In: Colavita G. (ed.), Igiene e Tecnologie degli alimenti di origine animale. Le Point Veterinaire Italie Ed., Milano, Italy: 19-25.
- Chai S. J., Cole D., Nisler A., Mahon B. E., 2017.** Poultry: The most common food in outbreaks with known pathogens, United States, 1998–2012. *Epidemiol. Infect.*, Vol. 145: 316–325.
- Chen Q., Cai J., Wan X., Zhao J., 2011.** Application of linear/non-linear classification algorithms in discrimination of pork storage time using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 44: 2053-2058.
- Cortinas L., Barroeta A., Villaverde C., Galobart J., Guardiola F., Baucells M. D., 2005.** Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid oxidation. *Poultry Science*, Vol. 84(1): 48-55.
- Dainty, R. H., 1996.** Chemical~biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 33: 19-33.
- Daugaard S. B, Adler-Nissen J., Carstensen J. M. 2010.** New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat. *Food Control*, Vol. 21: 626-632
- Dave D., Ghaly A. E., 2011.** Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, Vol. 6(4): 486-510.
- Dissing B. S., Papadopoulou O. S., Tassou C., Ersboll B. K., Carstensen J. M., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2013.** Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat. *Food Bioprocess Technol*, Vol. 6: 2268-2279.
- Doulgeraki A. I., Paramithiotis S., Kagkli D. M., Nychas G. J., 2010.** Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*, Vol. 27: 1028-1034.
- Doulgeraki A. I., Ercolini D., Villani F., Nychas G. J. E., 2012.** Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 157: 130-141.

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

Dransfield E., Sosnicki A. A., 1999. Relationship between muscle growth and poultry. *Poultry Science*, Vol. 78: 743-746.

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

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

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

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

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

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

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

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

El Romeral M., 2018. Hydrogen sulfide (H₂S)-producing bacteria (sulfate reducers, sulfite reducers, sulfur reducers, and other molecules with sulfur) - Qualitative and quantitative culture; Molecular identification (PCR and sequencing). Ctra. De Bétera (Valencia).

Enfors S. O., Molin G., Ternstroem A., 1979. Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen, or air on the microbial flora of pork stored at 4°C. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 47: 197-208.

- Enfors S. O., 2008.** Food microbiology. Department of Bioprocess Technology/KTH.
- Ercolini D., Russo F., Torrieri E., Masi P., Villani F., 2006.** Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72(7): 4663-4671.
- Ercolini D., Russo F., Blaiotta G., Pepe I., Mauriello G., Villani F., 2007.** Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis* and *P. putida* from meat by use multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73: 2354-2359.
- Ercolini D., Casaburi A., Nasi A., Ferrocino I., Di Monaco R., Ferranti P., Villani F., 2010.** Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International journal of food microbiology*, Vol. 142(1-2): 120-131.
- Estelles-Lopez L., Ropodi A., Pavlidis D., Fotopoulou J., Gkousari C., Peyrodie A., Panagou E., Nychas G.-J, Mohareb F., 2017.** An automated ranking platform for machine learning regression models for meat spoilage prediction using multi-spectral imaging and metabolic profiling. *Food Research International*, Vol. 99: 206-215.
- European Commission 852/2004, [online].** Διαθέσιμο στο: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0852-20090420>
- European Commission C853/2004, [online].** Διαθέσιμο στο: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0853-20140601>
- European Commission, 2018.** The EU Food Fraud Network and the System for Administrative Assistance - Food Fraud. Annual report 2018. [online]. [Cited 7 October 2020]. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/ff_ffn_annual-report_2018.pdf
- European Commission (EC), 2020.** EU agricultural outlook for markets, income and environment, 2020-2030. European Commission, DG Agriculture and Rural Development, Brussels. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/facts-and-figures/markets/outlook/medium-term_en
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2021.** Food fraud – Intention, detection and management. Food safety technical toolkit for Asia and the Pacific, Bangkok, Vol. 5: 1-44.

Feng C. H., Makino Y., Oshita S., Martín J. F. G., 2018. Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: current state-of-the-art research advances. *Food Control*, Vol. 84: 165-176.

Fengou L. C., Lianou A., Tsakanikas P., Mohareb F., Nychas G. J. E., 2021a. Detection of Meat Adulteration Using Spectroscopy-Based Sensors. *Foods*, Vol. 10(4): 861.

Fengou L. C., Tsakanikas P., Nychas G. J. E., 2021b. Rapid detection of minced pork and chicken adulteration in fresh, stored and cooked ground meat. *Food Control*, 125.

Froning G. W., Daddario J., Hartung T. E., 1986. Colour and myoglobin concentration in turkey meat as affected by age, sex and strain. *Poultry Science*, Vol. 47: 1827-1835.

Gill C. O., Newton K. G., 1978. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Science*, Vol. 2(3): 207-217.

Gowen A. A., Feng Y., Gaston E., Valdramidis V., 2015. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, Vol. 137: 43-54.

Gram L., Trolle G., Huss H. H., 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 4(1): 65-72.

Gromski P. S., Muhamadali H., Ellis D. I., Xu Y., Correa E., Turner M. L., Goodacre R., 2015. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 879: 10-23.

Hassoun A., Måge I., Schmidt W. F., Temiz H. T., Li L., Kim H., 2020. Fraud in Animal Origin Food Products: Advances in Emerging Spectroscopic Detection Methods over the Past Five Years. *Foods*, Vol. 9(8): 1069.

Hinton A. Jr., Cason J. A., Ingram K. D., 2004. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 91: 155–165.

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

Holzapfel W. H., 1998. The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In: Board R. G., Davies A. R. (Eds.). *The Microbiology of Meat and Poultry*, Blackie Academic and Professional, London: 615.

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

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1998. *Micro-Organisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities.* Blackie Academic and Professional, London: 615.

Iulietto F. M., Sechi P., Borgogni E., Cenci-Coga B. T., 2015. Meat Spoilage: A critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science*, Vol. 14(3): 4011.

James, C., Vincent, C., de Andrade Lima, T.I., James, S.J., 2006. The primary chilling of poultry carcasses—a review. *Int. J. Refrig.*, Vol. 29(6): 847-862.

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

Jeppesen C., 1995. Media for *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas spp.* from food and environment. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 26(1): 25-41.

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

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

Kramer M., 2021. In: Time USA, LLC 3 Bryant Park, New York, NY.

Lambropoulou K. A., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. 1996. The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 C. *International journal of food microbiology*, Vol. 30(3): 281-291.

Lambert A. D., Smith J. P., Dodds K. L., 1991. Shelf-life extension and microbiological safety of fresh meat—a review. *Food Microbiology*, Vol. 8(4): 267-297.

Law B. A., Kolstad J., 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. Anton Leeuw, Vol. 49: 225-245.

Law J. W. F., Ab Mutalib N. S., Chan K. G., Lee L. H., 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Frontiers in microbiology, Vol. 5: 770.

Lebert I., Begot C., Lebert, A., 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25 C). International journal of food microbiology, Vol. 39(1-2): 53-60.

Lesiow T., 2005. Chemical Composition of Poultry Meat. Handbook of Food Science Technology and Engineering, Vol. 1: 2.

Li H. H., Chen Q. S., Zhao J. W., Wu M. Z., 2015. Nondestructive detection of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in pork meat by integrating hyperspectral imaging and colourimetric sensor combined with a nonlinear data fusion. LWT-Food Science and Technology, Vol. 63: 268- 274.

Li Y. C., Liu S. Y., Meng F. B., Liu D. Y., Zhang Y., Wang W., 2020. Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety, 19(4), 2256-2296.

Limbo S., Torri L., Sinelli N., Franzetti L., Casiraghi E., 2010. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. Meat science, Vol. 84(1): 129-136.

Luber P., 2009. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs— Which risks need to be managed first? Int. J. Food Microbiol., Vol. 134, 21–28.

Mandal P. K., Biswas A. K., Choi K., Pal U. K., 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. American Journal of Food Technology, Vol. 6(2): 87-102.

Marangoni F., Corsello G., Cricelli C., Ferrara N., Ghiselli A., Lucchin L., Poli A., 2015. Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: an Italian consensus document. Food Nutrition & Research, Vol. 59: 276.

Marriuti L. R., Bragagnolo N., 2017. Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. Food Research International, Vol. 94: 90-100.

- McMillin K. W., 2008.** Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci*, Vol. 80: 43-65.
- McMillin K. W., 2017.** Advancements in meat packaging. *Meat science*, Vol. 132: 153-162.
- Mead G. C., Adams B. W., 1977.** A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. *British poultry science*, Vol. 18(6): 661-670.
- Mead G., 1985.** Enumeration of pseudomonads using cephaloridine-fucidincetrimide agar (CFC). *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 2(1-2): 21-26.
- Mead G. C., 2004.** Shelf-life and spoilage of poultry meat. In Mead GC, editor. *Poultry meat processing and quality*. Cambridge, UK, Woodhead, 2004, 283-303.
- Mohareb F., Iriondo M., Doulgeraki A. I., Van Hoek A., Aart H., Bessant, C., Nychas G. J. E., 2015.** Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. *Food Control.*, Vol 57: 152-160.
- Mortimore S., Wallace C., 2013.** HACCP: A practical approach. Springer Science & Business Media.
- Ndob A. M., Melas M., Lebert A., 2015.** Physical-chemical Properties of Foods: New tools for Prediction. Elsevier.
- Nychas G. J. E., Tassou C. C., 1997.** Spoilage processes and proteolysis in chicken as detected by HPLC. *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 74 (2): 199–208.
- Nychas G. J. E., Drosinos E. H., Board R. G., 1998.** Chemical changes in stored meat. *The microbiology of meat and poultry*, 288-326.
- Nychas G. J. E., Skandamis P. N., 2005.** Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In: Sofos J. N. (ed.). *Improving the safety of fresh meat*. Cambridge: WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.
- Nychas G. J. E., Marshall D. L., Sofos J. N., 2007.** Meat, Poultry, and Seafood. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 105-140. Edited by M. P. Doyle, L. R. Beuchat, Washington D.C: ASM Press.
- Nychas G. J. E., Skandamis P. N., Tassou C. C., Koutsoumanis K. P., 2008.** Meat spoilage during distribution. *Meat Sci.*, Vol. 78(1-2): 77-89.

Nychas G. J. E., Panagou E. Z., Mohareb F. 2016. Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, Vol. 12: 13-20.

OECD/FAO (2021). OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.

Padron A. P., Dockstader W. B., 1972. Selective Medium for Hydrogen Sulfide Production by Salmonella. *Appl. Microbiology*, Vol. 23(6): 1107–1112.

Panagou E. Z., Papadopoulou O., Carstensen J. M., Nychas G. J. E., 2014. Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 174: 1-11.

Papadopoulou O., Panagou E. Z., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., 2011. Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food. Res. Int.* Vol. 44: 3264–3271.

Paramithiotis S., Skandamis P., N., Nychas, G. J. E., 2009. Insights into fresh meat spoilage. *Safety of Meat and Processed Meat, Food Microbiology and Food Safety*. Springer, 55-82.

Patsias A., Badeka A., Savvaidis I., Kontominas, M. (2008). Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets. *Food Microbiology*, Vol. 25(4): 575-581.

Pawar S. C., Sarate R. M., Ghosh J. S., 2011. Spoilage of chilled chicken meat and liver by psychrophilic lipase. *American Journal of Food Technology*, Vol. 6: 166-172.

Prauser H., 1985. Krieg N. R. (Editor, Volume 1), Holt J. G. (Editor-in-chief), Murray G. E., Brenner D. J., Bryant M. P., Holt J. G., Krieg N. R., Moulder J. W., Pfennig N. (Editorial Board). *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Vol. 1: 698-699.

Praveen P. K., Debnath C., Shekhar S., Dalai N., Ganguly S., 2016. Incidence of *Aeromonas spp.* infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. *Vet. World*, Vol. 9: 6–11.

Raccach M., Baker R. C., 1978. Lactic Acid Bacteria as an Antispoilage and Safety Factor in Cooked, Mechanically Deboned Poultry Meat. *Journal of Food Protection*: September 1978, Vol. 41(9): 703-705.

Ray B., Bhunia A., 2013. Fundamental food microbiology, 5th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Reid R., Lindqvist R., Fanning S., Whyte P., Kerry J., Bolton D., 2015. The microbiology of beef chilling: do the observations fit the predictions? Poster 189, Abstract book page 111, poster presented at the EFSA Expo conference ‘Shaping the future of food safety together’, Milan, Italy, 14-16 October 2015.

Romia M. B, Bernardez M. A., 2009. Multivariate Calibration of Quantitative Analysis. In: Sun D. W.(ed.). Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Oxford: Elsevier Inc.

Ropodi A., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2013. Assessment of microbiological quality and authenticity of minced meat using multispectral image analysis. In: 8th International Conference on Predictive Modelling in Food, Paris, France, 16-19 September 2013.

Ropodi A. I., Pavlidis D. E., Mohareb F., Panagou E. Z., Nychas, G. J. E., 2015. Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. Food Research International, Vol. 67. 12-18.

Ropodi A. I., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2016. Data mining derived from Food analyses using non-invasive/non-destructive analytical techniques. Determination of Food authenticity, quality & safety in tandem with Computer Science Disciplines. Trends in Food Science & Technology, Vol. 50: 11-15.

Rouger A., Tresse O., Zagorec M., 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species and Dynamics. Microorganisms MDPI, Vol. 5(3): 50.

Sade E., Murros A., Bjorkroth J., 2013. Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. Food microbiology, Vol. 34(2): 252-258.

Samelis J., 2006. Managing microbial spoilage in the meat industry. Food spoilage microorganisms, Vol. 9: 213-286.

Savitzky A., Golay M. J. E., 1964. ‘‘Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures’’. Analytical Chemistry, Vol. 36(8): 1627-1639.

Shalaby A. R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International, Vol. 29(7): 675-690.

Sheikha A. F., El Mokhtar N. F. K., Amie C., Lamasudin D. U., Isa N. M., Mustafa S., 2017. Authentication technologies using DNA based approaches for meats and halal meats determination. *Food Biotechnology*, Vol. 31(4): 281-315.

Silvia C. M. G., Gloria M. G. A., 2002. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4⁰C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry*, Vol. 78: 241-248.

Singh P., Wani A. A., Saengerlaub S., Langowski, H. C., 2011. Understanding critical factors for the quality and shelf-life of MAP fresh meat: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, Vol. 51(2): 146-177.

Smolander M., Alakomi H. L., Ritvanen T., Vainionpaa J., Ahvenainen R., 2014. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A time-temperature indicators as quality-indicating tools. *Food Control*, Vol. 15: 217-229.

Spyrelli E. D., Doulgeraki A. I., Argyri A. A., Tassou C. C., Nychas G. J. E., 2020. Implementation of Multispectral Imaging (MSI) for Microbiological Quality Assessment of Poultry Products. *Microorganisms*, Vol. 8: 552.

Spyrelli E. D., Ozcan O., Mohareb F., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2021. Spoilage assessment of chicken breast fillets by means of fourier transform infrared spectroscopy and multispectral image analysis. *Current Research in Food Science*, Vol. 4: 121-131.

Spyrelli E. D., Papachristou C. K., Nychas G. J. E., Panagou E. Z., 2021. Microbiological Quality Assessment of Chicken Thigh Fillets Using Spectroscopic Sensors and Multivariate Data Analysis. *Foods*, Vol. 10: 2723.

Stanbridge L., Board R., 1994. A modification of the *Pseudomonas* selective medium, CFC, that allows differentiation between meat pseudomonads and Enterobacteriaceae. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 18(6): 327-328.

Stanbridge L. H., Davis, A. R., 1998. The microbiology of chill-stored meat. In: *The microbiology of meat and poultry*. Edited by Board R. G., Davies A. R., London, UK: Blackie Academic and Professional, 174–219.

Stiles M. E., Holzapfel W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36(1):1-29.

Stopforth J. D., Sofos J. N., 2005. Carcass chilling. In: Sofos J. N.(ed.), Improving the safety of fresh meat. Cambridge: WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.

Sun D. W., 2009. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Academic Press. NY.

Trivedi D. K., Hollywood K. A., Rattray N. J. W., Ward H., Greenwood J., 2016. Meat, the metabolites: an integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork. *Analyst*, Vol. 141(7): 2155–2164.

Tsakanikas P., Pavlidis D., Nychas G. J. E., 2015. High Throughput Multispectral Image Processing with Applications in Food Science. *PlosOne*.

Tsakanikas P., Pavlidis D., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., 2016. Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*, Vol. 161: 606-614.

Tsola E., Drosinos E., Zoiopoulos, P., 2008. Impact of poultry slaughterhouse modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control*, Vol. 19(4): 423-431.

Tuncer B., Sireli U. T., 2008. Microbial growth on broiler carcasses stored at different temperatures after air-or water-chilling. *Poult. Sci.* 2008, Vol. 87: 793-799.

United Nations, 2019. World Populations Prospects. Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics.

United States Department of Agriculture (USDA), 1997. Food Safety and Inspection Service. The poultry label says ‘‘Fresh’’.

United States Department of Agriculture (USDA), 2021. Agricultural Research Service. Food Data Central.

Vasconcelos H., Saraiva C., De Almeida J. M. M., 2014. Evaluation of the Spoilage of Raw Chicken Breast Fillets Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Tandem with Chemometrics.

Viana E. S., Gomide L. A. M., Vanetti M. C. D., 2005. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. *Meat Sci*, Vol. 71: 696-705.

Vihavainen E., Lundstrom H. S., Susiluoto T., Koort J., Paulin L., Auvinen P., Bjorkroth, J., 2007. Role of broiler carcasses and processing plant air in contamination of modified-atmosphere-packaged broiler products with psychrotrophic lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 73: 1136–1145.

Vlachos A., Arvanitoyannis I. S., Tserkezou P., 2016. An Updated Review of Meat Authenticity Methods and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 56(7): 1061-1096.

Warsow C. R., Orta-Ramirez A, Marks B. P., Ryser E. T., Booren A. M., 2008. Single directional migration of Salmonella into marinated whole muscle turkey breast. *J. Food Prot.*, Vol. 71: 153–156.

Wideman N., O’Bryan C. A., Crandall P. G., 2016. Factors affecting poultry meat colour and consumer preferences – A review. Department of Food Science, University of Arkansas, 2650 Young Ave., Fayetteville, AR 72704, USA.

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

Young L. L., Reviere R. D., Cole A. B., 1988. Fresh meat red meat: a place to applied modified atmosphere. *Food Techn*, Vol. 42: 65-69.

Zhang Q. Q., Han Y. Q., Cao J. X., Xu X. L., Zhou G. H., Zhang W. Y., 2012. The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. *Poult. Sci.*, Vol. 91: 208–214.

Zhou G. H., Xu X. L., Liu Y., 2010. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Sci*, Vol. 86: 119-128.

Βουδούρης Ε. Κ., Κοντομηνάς Μ. Γ., 2002. Εισαγωγή στην Χημεία Τροφίμων. ΟΕΔΒ, Αθήνα, έκδοση 2002.

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

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