



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της δράσης του *Lactiplantibacillus pentosus*  
ενάντια στους παθογόνους *L. Monocytogenes* και *E. Coli* O157:H7,  
καθώς και στον χρόνο ζωής (shelf-life) της ρόκας  
σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

**Κωνσταντίνα Μ. Μιχοπούλου**

Επιβλέπων καθηγητής:

Νικόλαος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ 2024**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της δράσης του *Lactiplantibacillus pentosus* ενάντια στους παθογόνους *L. Monocytogenes* και *E. Coli* O157:H7, καθώς και στον χρόνο ζωής (shelf-life) της ρόκας σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Effect of *Lactiplantibacillus pentosus* on *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7, as well as on the shelf-life of rocket salad in modified atmosphere packaging

**Κωνσταντίνα Μ. Μιχοπούλου**

Εξεταστική Επιτροπή:

Νικόλαος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Παναγιώτης Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

**Μελέτη της δράσης του *Lactiplantibacillus pentosus* ενάντια στους παθογόνους *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7, καθώς και στον χρόνο ζωής (shelf-life) της ρόκας σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας**

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με το πέρασμα των χρόνων έχει παρατηρηθεί αύξηση στην κατανάλωση των λαχανικών, λόγω του πιο υγιεινού τρόπου ζωής. Τα λαχανικά εξαιτίας των πολλών βιταμινών και θρεπτικών συστατικών που περιέχουν μπορούν να τονώσουν τη φυσική άμυνα του οργανισμού και να βελτιώσουν την υγεία του ανθρώπου. Οι ελάχιστες θερμίδες τα κάνουν ελκυστικά στα μάτια των καταναλωτών, για αυτό και καταναλώνονται καθημερινά. Η ρόκα είναι ένα από τα λαχανικά που βρίσκεται στην προτίμηση της αγοράς γιατί είναι πλούσια σε βιταμίνες και μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί. Η ευαλλοιώτη φύση της όμως σε συνδυασμό με την μη σωστή συντήρησή της μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, καθώς και την ποιοτική της υποβάθμιση. Για τον λόγο αυτόν καθίσταται απαραίτητη η έρευνα για την εξέλιξη της αλλοίωσης της, με στόχο τη βελτιστοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας και των μεθόδων συντήρησης. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη γρήγορων και αξιόπιστων τεχνικών, με σκοπό την ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων και την παράταση του χρόνου ζωής προς όφελος των καταναλωτών. Δύο από αυτές τις τεχνικές είναι η πολυφασματική απεικόνιση (MSI) και η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσει την δράση του βακτηρίου *Lactiplantibacillus pentosus* B281, ενάντια δύο παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα ρόκας. Για αυτό τον σκοπό έλαβαν χώρα δύο ανεξάρτητα πειράματα. Με το πρώτο να αφορά την δράση του B281 κατά δύο στελεχών της *Listeria monocytogenes* (FMCC B127 +FMCC B133) και το δεύτερο του ίδιου τεχνολογικού βακτηρίου ενάντια δύο στελεχών *Escherichia coli* O157:H7 (B290 +B289). Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν στα δείγματα ήταν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., της οικογένειας Enterobacteriaceae, τα οξυγαλακτικά βακτήρια(LAB), ζύμες και μύκητες. Ειδικότερα, τα δείγματα ρόκας συντηρήθηκαν σε

δύο διαφορετικές θερμοκρασίες τους 4 και 10°C σε διαφορετικό χρονικό διάστημα για την κάθε δειγματοληψία και συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP). Για τη μελέτη των παραπάνω περιπτώσεων χρησιμοποιήθηκαν κλασικές μικροβιολογικές μέθοδοι, καθώς και σύγχρονες τεχνικές.

Στα πλαίσια του πειράματος και μετά το πέρας των μικροβιολογικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων, όπου η αξιολόγηση τους στηρίζονταν στην οσμή και στην εμφάνιση, καθώς και η μέτρηση του pH. Από την επεξεργασία των δεδομένων του οργανοληπτικού ελέγχου φάνηκε ότι η αλλοίωση γινόταν αντιληπτή αρκετά γρήγορα στα δείγματα που είχαν συντηρηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Για τη συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων με τα φασματοσκοπικά δεδομένα εφαρμόστηκε η χρήση της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R), προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη μοντέλου εκμάθησης για την ποσοτική εκτίμηση της ΟΜΧ.

**Επιστημονική Περιοχή:** Ποιότητα άγριας ρόκας

**Λέξεις κλειδιά:** ρόκα, μικροβιακή αλλοίωση, χρόνος ζωής, τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ταχείες μέθοδοι

## **Effect of *Lactiplantibacillus pentosus* on *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7, as well as on the shelf-life of rocket salad in modified atmosphere packaging**

*MSc Food Science & Technology*

*Department of Food Science & Human Nutrition*

*Food Microbiology & Biotechnology Laboratory*

### **ABSTRACT**

Over the years, the consumption of vegetables has been increased due to a healthier lifestyle. Vegetables, because of the vitamins and nutrients they contain can stimulate the body's natural defenses and improve human health. The minimal calories make them attractive in the eyes of consumers, which is the reason of their daily consumption. Rocket is one of the vegetables that is in the market's favor due to the fact that is rich in vitamins and can be easily used. However, its perishable nature combined with its improper maintenance can cause contamination and the growth of pathogenic microorganisms, as well as its quality degradation. For this reason, research into the evolution of its deterioration become necessary, with the aim of optimizing the production process and storage methods. This has led to the development of fast and reliable techniques, aiming at product safety and quality and extending shelf life for the benefit of consumers. Two of these techniques are multispectral imaging (MSI) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The aim of the current study was to evaluate the activity of the bacterium *Lactiplantibacillus pentosus* B281 against two pathogenic microorganisms in rocket samples. For this purpose, two independent experiments took place. The first concerns the action of B281 against two strains of *Listeria monocytogenes* (FMCC B127+ FMCC B133) and the second one against two strains of *Escherichia coli* O157:H7 (B290 + B289). The microorganisms identified in the samples were total mesophilic flora (TVC), bacteria of the genus *Pseudomonas* spp., those of the family Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria (LAB), yeasts and fungi. In particular, rocket samples were stored at two different temperatures 4 and 10° C and packaged under modified atmosphere conditions (MAP). For the study of the above cases classical microbiological methods were used, in parallel with fast non-invasive techniques. In this context, sensory analysis of the samples was carried out, where their evaluation

was based on smell and appearance. pH was measured, too. The processing of organoleptic control data showed that the spoilage was evident faster in samples stored at high temperatures. For the correlation of microbiological results with spectroscopic data, the use of linear regression with the method of partial least squares (PLS-R) was applied, to achieve the development of a learning model for the quantitative assessment of TVC.

**Scientific area:** Quality of wild rocket

**Keywords:** rocket, microbial spoilage, self life, modified atmosphere, rapid methods

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της μεταπτυχιακής μου εργασίας, κ. Νικόλαο Χωριανόπουλο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Ευστάθιο Πανάγου, καθηγητή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για το ενδιαφέρον και τις συμβουλές του στη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Ευχαριστίες οφείλουν να δοθούν και στον κ. Παναγιώτη Σκανδάμη, για το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη της εργασίας και τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ερευνητική ομάδας του κ. Χωριανόπουλου και κυρίως την υποψήφια διδάκτορα Αγγελική Δουκάκη για την βοήθεια που μου προσέφερε, την υπομονή και την ανοχή σε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη στην οικογένεια μου που με τη συνεχή στήριξη τους κατάφερα να ολοκληρώσω αυτό το σημαντικό κομμάτι της ζωής μου.

---

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

## Πίνακας περιεχομένων

1.	Εισαγωγή.....	9
1.1	Ρόκα.....	9
1.2	Χρήση και Κατανάλωση.....	9
1.3	Χημική Σύσταση και Θρεπτική Αξία.....	10
1.4	Μικροβιακή Αλλοίωση.....	11
1.4.1	Κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί.....	12
1.4.1.1	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	12
1.4.1.2	Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB).....	12
1.4.1.3	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	13
1.4.1.4	Μύκητες.....	13
1.4.2	Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	14
1.4.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	14
1.4.2.2	<i>Escherichia coli</i> O157: H7.....	14
1.5	Παράγοντες που προκαλούν την αλλοίωση.....	15
1.6	Μέθοδοι παράτασης της διάρκειας ζωής της ρόκας.....	15
1.6.1	Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας (MAP).....	15
1.6.1.1	Σύσταση αέριων στις MAP συσκευασίες.....	16
1.6.2	Προβιοτικοί μικροοργανισμοί.....	17
1.6.2.1	<i>Lactiplantibacillus Pentosus</i> (B281).....	17
1.7	Σύγχρονες μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης.....	18
1.8	Σκοπός του Πειράματος.....	22
2.	Υλικά και Μέθοδοι.....	23
2.1	Συντήρηση ρόκας.....	23
2.1.1	Πειραματικός Σχεδιασμός.....	23
2.1.2	Παρασκευή ζυμού λαχανικών.....	24
2.1.3	Βακτηριακά στελέχη και προετοιμασία εμβολίου.....	24
2.1.4	Δράση B281, FMX3 και T571 κατά των παθογόνων μικροοργανισμών.....	26
2.1.5	Προετοιμασία παθογόνου και τεχνολογικού μικροοργανισμού.....	27
2.1.6	Προετοιμασία Δειγμάτων.....	28
2.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	29
2.3	Μέτρηση pH.....	31
2.4	Εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης MSI.....	32
2.5	Χρήση VideometerLite.....	33
2.6	Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	33
2.7	Οργανοληπτικός έλεγχος.....	35
2.8	Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων.....	35
3.	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	37
3.1	Εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας.....	37
3.1.1	Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων.....	37
3.3	Αποτελέσματα μέτρησης pH.....	47
3.5	Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων.....	51
3.5.1	Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR).....	51
3.5.2	Αποτελέσματα από τα δεδομένα MSI.....	53
3.5.3	Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο PLS-R.....	55
3.5.3.1	FTIR.....	55
3.5.3.2	MSI.....	57
4.	Συμπεράσματα.....	60
5.	Βιβλιογραφία.....	63



## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Ρόκα

Η ρόκα (*Eruca sativa*) είναι μονοετές φυτό με μαλακό βλαστό, η οποία ανήκει στην οικογένεια των σταυρανθών. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και φυτά του γένους *Brassica* (μπρόκολο, λάχανο, κουνουπίδι). Προέρχεται από τις περιοχές της Μεσογείου και είτε φυτρώνει μόνη της (άγρια ρόκα), είτε καλλιεργείται (Urhof, 1968). Η ρόκα χαρακτηρίζεται από σύντομο βιολογικό κύκλο των 6-9 εβδομάδων. Έχει ύψος 80-100 εκατοστά, άνθη που έχουν διάμετρο 2-4 εκατοστά, είναι λευκά και έχουν σταυρωτό σχήμα. Τα φύλλα της έχουν σκούρο πράσινο χρώμα, ποικίλλουν στο σχήμα, από ομαλά και στρογγυλεμένα, έως αρκετά λοβωτά ή και οδοντωτά. Το μικρό μέγεθος του φυτού, σε συνδυασμό με τη μεγάλη παραγωγή σπόρων, το καθιστά ιδανικό φυτό για εργαστηριακή μεταχείριση (Perry & Metzger, 1978).



Εικόνα 1.1: Ρόκα *Eruca sativa* (Varga et al., 2009)

### 1.2 Χρήση και Κατανάλωση

Η ρόκα καταναλώνεται από την εποχή του Μεσαίωνα ως και σήμερα λόγω των ευεργετικών της ιδιοτήτων και της εύκολης χρήσης της στην μαγειρική. Χρησιμοποιείται σε θεραπείες λόγω της περιεκτικότητας της σε ενώσεις που διαθέτουν διουρητική, αντιοξειδωτική, ενυδατική, αντιβακτηριδιακή και διεγερτική δράση (Yaniv et al., 1998, Perry & Metzger, 1978). Η τακτική κατανάλωση της ενισχύει τη γαστρεντερική οδό και το ανοσοποιητικό σύστημα, ενδυναμώνει το νεφρικό

σύστημα και βελτιώνει την διαδικασία της πέψης (Varga et al., 2009). Στο ευρύ φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων της ρόκας συμπεριλαμβάνονται και η αντικαρκινική της δράση (Michael et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, έλαια σπόρων του φυτού μπορούν να μειώσουν την πιθανότητα ανάπτυξης μελανώματος (Khoobhandani et al. 2011). In vitro μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα ρόκας αναστέλλουν την δημιουργία καρκινικών όγκων στον καρκίνο του πνεύμονα (Melchini et al., 2009), καθώς και στον καρκίνο του ήπατος (Lamy et al., 2008).

Τα παραπάνω οφέλη της ρόκας σε συνδυασμό με την συνεχή κατανάλωση της έχουν αυξήσει την καλλιέργεια της τόσο όσον αφορά στην έκταση, όσο και στην παραγωγή της σε όλη την Ελλάδα.

### *1.3 Χημική Σύσταση και Θρεπτική Αξία*

Η ρόκα ως φυλλώδες λαχανικό αποδίδει ελάχιστες θερμίδες ,αλλά σημαντικές ποσότητες φυτικών ινών και βιταμινών A, C, K, B1 και B3. Είναι πλούσια σε φολικό οξύ, καθώς και σε ποσότητες σιδήρου, ασβεστίου και φωσφόρου. Περιέχει σε μεγάλο ποσοστό μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, μαγνήσιο και μαγγάνιο ενώ η περιεκτικότητά της σε λίπη και υδατάνθρακες είναι πολύ μικρή (USDA, 2022) Η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται στην παρουσία των καροτενοειδών και των πολυφαινολών, που την καθιστά ως τρόφιμο με υψηλή διατροφική αξία (Heimler et al., 2007, Martinez-Sanchez et al., 2008). Επιπλέον, 100gr ρόκας καλύπτουν το 6% της Ενδεικτικής Ημερήσιας Πρόσληψης των πολύτιμων για τον οργανισμό φυτικών ινών(USDA, 2022).

Διατροφική αξία	ανά 100 γρ <sup>1</sup>	ανά μερίδα: (1 κούπα = 20 γρ.) <sup>1</sup>
<b>Ενέργεια και Βασικά Συστατικά</b>		
Θερμίδες (kcal)	25,0	5,0
Λιπαρά (γρ)	0,7	0,1
Κορεσμένα λιπαρά (γρ)	0,07	0,0
Υδατάνθρακες (γρ)	3,7	0,7
Φυτικές ίνες (γρ)	1,6	0,3
Σάκχαρα (γρ)	2,1	0,4
Πρωτεΐνη (γρ)	2,6	0,5
Νάτριο (mg)	27,0	5,4
<b>Βιταμίνες και Ιχνοστοιχεία</b>		
Βιταμίνη Κ (μg)	109,0	21,8
Φυλλικό οξύ (μg)	97,0	19,4

Εικόνα 1.2: Διατροφικός πίνακας (USDA, 2022)

#### 1.4 Μικροβιακή Αλλοίωση

Τα φυτικά προϊόντα ως ευαλλοίωτα τρόφιμα, μπορεί να υποστούν μικροβιολογική επιμόλυνση καθ' όλη την διάρκεια ζωής τους. Η επιμόλυνση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, από την καλλιέργεια τους μέχρι και την κατανάλωση τους (Ahvenainen Raija, 2000). Gram<sup>-</sup> βακτήρια κυριαρχούν στην μικροχλωρίδα των περισσότερων λαχανικών (Burnett & Beuchat, 2000; Tournas, 2006), με την *Pseudomonas* spp. να αποτελεί το 50-90% του μικροβιακού πληθυσμού (Arvanitoyannis & Stratakos, 2010; Nguyenthe & Carlin, 1994; Zagory, 1999). Επίσης, ο βακτηριακός πληθυσμός των λαχανικών και πιο συγκεκριμένα των φρεσκοκομμένων προϊόντων αυξάνεται και εξαιτίας διαφόρων περιβαλλοντικών συνθηκών όπως, η υγρασία και η υψηλή θερμοκρασία. Τα λαχανικά λοιπόν έχουν την δυνατότητα να υποστηρίξουν την ανάπτυξη ζυμών, μυκήτων και βακτηρίων και συνεπώς να επιμολυνθούν από αυτά (Singh, 2003).

Εκτός από την ανάπτυξη αλλοιογόνων βακτηρίων, γίνεται και επιμόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η μόλυνση αυτή οφείλεται στην κακή υγιεινή και προκαλείται συνήθως από περιττώματα πουλιών, ζώων, ανθρώπων, λυμάτων, κοπριάς, και λιπασμάτων (Elizaquivel et al., 2012). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί

που έχουν ανιχνευθεί πάνω στην επιφάνεια των λαχανικών είναι τα βακτήρια όπως: *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* (B. Ramos et al., 2013). Στο παρόν πείραμα θα μελετήσουμε την *L. monocytogenes*, καθώς και *E. Coli*.

#### 1.4.1 Κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί

##### 1.4.1.1 *Pseudomonas* spp.

Οι ψευδομονάδες είναι ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός που επικρατεί στην ρόκα (Arvanitoyannis & Stratakos, 2010; Nguyenthe & Carlin, 1994; Zagory, 1999), χαρακτηρίζονται ως αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μη σπορογόνα που εντοπίζονται στο χώμα, στο νερό και είναι αρκετά διαδεδομένες στην φύση. Είναι ανθεκτικές στις χαμηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να κατατάσσονται στους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς (Adams & Moss, 2008). Η ψευδομονάδα ως αλλοιογόνος μικροοργανισμός μπορεί να φέρει αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων, αφού τους δίνει μια χαρακτηριστική υδαρή και γλοιώδη όψη (Ellis and Goodacre, 2001). Επίσης, κατά την διαδικασία διάσπασης των πρωτεϊνών και κατά επέκταση την δημιουργία προϊόντων  $H_2S$ ,  $NH_3$ , προκαλούνται δυσάρεστες οσμές, καθώς και αλλοίωση στο χρώμα του τροφίμου με αποτέλεσμα να καθίσταται ως μη επιθυμητό από τους καταναλωτές (Borch et al., 1996).

##### 1.4.1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB)

Αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια θετικών κατά Gram βακτηρίων, είναι μη-σπορογόνα και παράγουν γαλακτικό οξύ κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με παρουσία ή απουσία οξυγόνου για αυτό και χαρακτηρίζονται ως προαιρετικά αναερόβια βακτήρια (Adams & Moss, 2008). Επιφέρουν αλλοιώσεις στην υφή, στο χρώμα και στην οσμή του προϊόντος, οι οποίες εμφανίζονται τυπικά όταν ο μικροβιακός πληθυσμός φτάσει στους 8 log cfu/g δημιουργώντας κυρίως ξίνισμα του τροφίμου (Borch et al., 1996, Ellis & Goodacre, 2001). Επίσης, μπορεί να αλλοιώσουν το τρόφιμο κατά την συντήρησή του σε

συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP), λόγω της αντοχής τους σε υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> (Borch et al., 1996).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό και πιο συγκεκριμένα στον εντερικό σωλήνα, αφού αποτελούν μέρος της υγιούς μικροχλωρίδας του. Εκτός από τον άνθρωπο βρίσκονται και στα ζώα, καθώς και σε διάφορα προϊόντα, όπως γαλακτοκομικά, ζυμούμενο κρέας και ψάρια, πατάτες, λαχανικά τουρσί, ποτά, φυτά, νερό, απόβλητα. Αυτά τα βακτήρια μπορεί να είναι και ωφέλιμα για τον οργανισμό, καθώς χρησιμοποιούνται ως εν δυνάμει προβιοτικά (Denev et al., 2000).

#### 1.4.1.3 *Enterobacteriaceae*

Τα εντεροβακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια, έχουν σχήμα ράβδου με μήκος 1-5 μm και δεν φέρουν σπόρια για αυτό χαρακτηρίζονται ως μη-σπορογόνα. Ορισμένα μετακινούνται με μαστίγια, ενώ άλλα δεν έχουν μηχανισμούς κίνησης. Κατατάσσονται στην οικογένεια των προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων, πράγμα που σημαίνει ότι είναι σε θέση να αναπτύσσονται τόσο σε αερόβιο όσο και σε αναερόβιο περιβάλλον. Τα βακτήρια αυτά απαντώνται είτε στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντερικού συστήματος των ανθρώπων και των ζώων, είτε στο νερό, στο έδαφος ή ως παράσιτα σε ζώα και φυτά. Τα εντεροβακτήρια ως αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί προκαλούν αλλαγές στην μυρωδιά του τροφίμου, κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης, των υδατανθράκων και κατά συνέπεια των αμινοξέων, δημιουργούνται δύσοσμες πτητικές ενώσεις όπως είναι οι διαμίνες και οι θειικές ενώσεις, και ευνοείται επίσης η διάσπαση λιπιδίων και η παραγωγή αερίων (Baylis, 2006; Samelis, 2006).

#### 1.4.1.4 Μύκητες

Οι μύκητες θεωρούνται δευτερεύοντες αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, λόγω της ταχείας ανάπτυξης των βακτηρίων. Είναι ευκαρυωτικοί, συνήθως πολυκύτταροι μικροοργανισμοί και δεν διαθέτουν αυτόνομη κίνηση. Επιβιώνουν σε υψηλές

θερμοκρασίες και σε περιβάλλοντα με υγρασία και είναι αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι. Όταν αναπτύσσονται και αλλοιώνουν τα τρόφιμα, σχηματίζουν μυκήλιο που είναι ορατό στην επιφάνεια του τροφίμου, με αποτέλεσμα να είναι ποιοτικά μη αποδεκτό από τους καταναλωτές (Jacxsens et al, 2001).

#### 1.4.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

##### 1.4.2.1 *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram, ραβδοειδές βακτήριο που μπορεί και αναπτύσσεται παρουσία ή απουσία οξυγόνου με αποτέλεσμα να ταξινομείται στα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Μπορεί να επιβιώσει και να αυξηθεί μέσα στα κύτταρα του ξενιστή και είναι ένα από τα πιο παθογόνα τροφιμογενή βακτήρια, καθώς το 20 έως το 30% των τροφιμογενών λοιμώξεων από λιστερίωση σε άτομα ευπαθών ομάδων μπορεί να προκαλέσει ακόμα και θανάτωση (Pizarro et al, 2019). Η δυνατότητα αντοχής του σε χαμηλές θερμοκρασίες (0°C) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του σε συνθήκες ψύξης, αυξάνοντας σημαντικά την ικανότητά του να αποφεύγει τον έλεγχο στα ανθρώπινα τρόφιμα, μπορεί όμως να καταστραφεί εύκολα με το μαγείρεμα (Grundling et al, 2004).

##### 1.4.2.2 *Escherichia coli* O157: H7

Το *Escherichia coli* κατατάσσεται στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, έχει σχήμα ράβδου και χαρακτηρίζεται ως κολοβακτήριο (Enterobacteriaceae). Τα περισσότερα από αυτά τα είδη είναι μη βλαβερά και σε πολλές περιπτώσεις επωφελή για την ανθρώπινη υγεία, αφού απαντώνται φυσικά στον οργανισμό συμπληρώνοντας την εντερική χλωρίδα (Tenailon et al, 2010). Στελέχη όπως το O157:H7 χαρακτηρίζονται ως βλαβερά για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς μπορεί να προκαλέσουν διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Το βακτήριο αυτό διακρίνεται για την ανθεκτικότητά του καθώς επιβιώνει σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ μπορεί να αντέξει και σε συνθήκες ψύξης για αρκετές μέρες υπό συγκεκριμένες περιπτώσεις (Money et al, 2010).

## *1.5 Παράγοντες που προκαλούν την αλλοίωση*

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την ποιότητα ενός προϊόντος, κάποιιοι από αυτούς είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες, οι διαδικασίες χειρισμού κατά την συγκομιδή και την επεξεργασία, η χρονική διάρκεια και η θερμοκρασία αποθήκευσης, καθώς και λανθασμένη χρήση από τον καταναλωτή. Σε όλα τα στάδια παραγωγής, από τον πρωτογενή τομέα μέχρι την κατανάλωση, πρέπει να τηρούνται τα κατάλληλα μέτρα με σκοπό την παραγωγή ασφαλούς και ποιοτικού προϊόντος (Kader, 2003). Ως εκ τούτου, η ποιότητα, εξαρτάται από τον συνδυασμό σωστής θερμοκρασίας συντήρησης, τις τροποποιημένες συνθήκες συσκευασίας και τις ορθές βιομηχανικές πρακτικές (GMP), που έχουν ως στόχο την διασφάλιση της ποιότητας, της ασφάλειας και την μείωση των απωλειών. Όπως κάθε ευαλλοίωτο προϊόν, έτσι και τα φρεσκοκομμένα λαχανικά δεν μπορούν να ανατρέψουν την αλλοίωση τους με περαιτέρω αποθήκευση, γίνεται όμως να την καθυστερήσουν με την εφαρμογή βέλτιστων τεχνικών επεξεργασίας και συσκευασίας. (Watada and Qi, 1999)

## *1.6 Μέθοδοι παράτασης της διάρκειας ζωής της ρόκας*

### *1.6.1 Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας (MAP)*

Η δυνατότητα των λαχανικών να αναπνέουν και μετά την συγκομιδή μπορεί να οδηγήσει στην αλλοίωση τους. Η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) είναι μια τεχνική που έχει ως στόχο την αποφυγή της αλλοίωσης αυτής, καθώς και την επέκταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, η MAP συσκευασία παρέχει μια ατμόσφαιρα διαφορετικής σύστασης από αυτή του αέρα έτσι ώστε να βελτιώσει και να παρατείνει των ζωή των τροφίμων. Κατά αυτό τον τρόπο η αλλοίωση του τροφίμου μειώνεται ως ένα βαθμό (Young et al. 1988). Ο σχεδιασμός μιας συσκευασίας MAP εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τον ρυθμό αναπνοής του προϊόντος, την θερμοκρασία και την υγρασία του περιβάλλοντος καθώς και την διαπερατότητα της συσκευασίας (Toivonen, 1997). Πιο συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την διαπερατότητα της μεμβράνης, προκαλώντας της αύξηση ενώ η υγρασία μπορεί να οδηγήσει στην αποξήρανση του προϊόντος (Sandhya, 2010). Για να αποφευχθεί η

οργανοληπτική και μικροβιολογική αλλοίωση των λαχανικών εξαιτίας της κυτταρικής τους αναπνοής, θα πρέπει η συσκευασία να αποτελείται από μειωμένο επίπεδο O<sub>2</sub> και ένα αυξημένο επίπεδο CO<sub>2</sub> (Toivonen, 1997).

Εκτός από τα παραπάνω ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επιδρά στην συσκευασία είναι και η ηλικία των φύλλων. Η ρόκα μετά την συγκομιδή της μπορεί να έχει φύλλα διαφόρων ηλικιών, λόγω του τρόπου που συλλέγεται. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την συσκευασία καθώς τα φύλλα μικρότερης ηλικίας έχουν υψηλότερο ρυθμό αναπνοής από τα γηραιότερα (Siomos et al., 2006).

#### 1.6.1.1 Σύσταση αέριων στις MAP συσκευασίες

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επιλογή των αερίων της συσκευασίας πρέπει να γίνεται με βάση τις ιδιότητες του τροφίμου. Για αυτό τον λόγο και με σκοπό την ασφαλή συντήρηση και τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, τα αέρια μπορούν να χρησιμοποιούνται είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό (McMillin, 2008).

- Ένα αέριο που χρησιμοποιείται για την συντήρηση των λαχανικών είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Με υψηλή ποσότητα CO<sub>2</sub> υπάρχει δυνατότητα να περιοριστεί η ανάπτυξη των αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών, και ιδιαίτερα των *Pseudomonas* spp., όπου φέρουν ευθύνη για την ποιοτική αλλοίωση των τροφίμων υποβαθμίζοντας την γεύση και την οσμή τους. Η ύπαρξη αυτού του αερίου στην ατμόσφαιρα μπορεί να επεκτείνει το χρόνο που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί για να διπλασιαστούν, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αύξησή τους (Koutsoumanis et al., 2008).
- Το οξυγόνο O<sub>2</sub> είναι επίσης ένα αέριο που χρησιμοποιείται στην MAP συσκευασία, αλλά σε αντίθεση με το CO<sub>2</sub> αποτελεί την τροφή πολλών βακτηρίων με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται σε χαμηλή ποσότητα στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας. (Rutherford et al., 2007).
- Το άζωτο N<sub>2</sub> εμποδίζει την ανάπτυξη και την δράση αερόβιων μικροοργανισμών, κάτι που δεν πετυχαίνει με τους αναερόβιους. Χρησιμοποιείται λόγω της ικανότητας του να προλαμβάνει την κατάρρευση της συσκευασίας, εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητας του (Zhou et al., 2010).



Συμπερασματικά, μια συσκευασία MAP για να θεωρηθεί ωφέλιμη προς τον προϊόν και κατά επέκταση προς τον καταναλωτή, θα πρέπει να αποτελείται από μικρή ποσότητα O<sub>2</sub> και υψηλή CO<sub>2</sub>. Ωστόσο παύει να είναι ευεργετική σε συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> χαμηλότερες από 1.5% ή σε συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> υψηλότερες από 20%, διότι ξεπερνούν τα όρια ανεκτικότητας και μπορεί να προκαλέσουν βλαβερές επιπτώσεις στην ποιότητα των λαχανικών (Zagory, 1999.)

### 1.6.2 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

Τα προβιοτικά ως ζωντανά ωφέλιμα βακτήρια, βελτιώνουν την υγεία του καταναλωτή διατηρώντας τη μικροβιακή ισορροπία του εντέρου. Στην οικογένεια των προβιοτικών ανήκουν οι λακτοβάκιλλοι, που χαρακτηρίζονται ως οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) και αντιπροσωπεύουν μία από τις σημαντικότερες μικροβιακές ομάδες (Shah, 2007). Λαμβάνονται συνήθως σε μορφή χαπιών, συμπληρωμάτων ή σκευασμάτων καθώς και μέσω της τροφής και περιέχουν ζωντανά μικρόβια τα οποία, όταν καταναλώνονται σε επαρκή ποσότητα είναι ευεργετικά ως προς τον ξενιστή (Hill et al., 2014). Για να μπορέσει όμως ένα προβιοτικό να ωφελήσει την ανθρώπινη υγεία πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια:

- Να επιβιώνει όταν εισέρχεται στον οργανισμό με σκοπό να φτάσει ζωντανό στον στόχο του ώστε να μπορέσει να δράσει (Kechagia et al., 2013).
- Η δράση προς τον ξενιστή να είναι ωφέλιμη, προσδίδοντας υψηλή αντοχή σε ασθένειες (Kechagia et al., 2013).
- Οι τεχνολογικές ιδιότητες του να είναι όσον το δυνατό καλύτερες ώστε όταν προστίθεται στα τρόφιμα να μην χάνει τη λειτουργικότητα του (Kechagia et al., 2013).

#### 1.6.2.1 Lactiplantibacillus Pentosus (B281)

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι λακτοβάκιλλοι αποτελούν βασική κατηγορία προβιοτικών και βρίσκονται σε ζυμούμενα τρόφιμα έχοντας ως στόχο την διατήρηση της ανθρώπινης ευημερίας, καθώς μπορούν να συμβάλλουν στην θεραπεία των

διαταραχών του εντέρου (Shah, 2007). Ένα από τα βακτηριακά στελέχη του *Lactobacillus* είναι το *Lactiplantibacillus pentosus* B281, το οποίο έχει απομονωθεί από ζυμωμένες πράσινες ελιές και αναστέλλει την δράση των μυκήτων, καθώς και την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Lipířska et al., 2018). Σε αυτή τη μελέτη, αξιολογήσαμε την ικανότητα δράσης του *L. pentosus* ενάντια των παθογόνων μικροοργανισμών *L.monocytogenes* και *E.coli*.

## 1.7 Σύγχρονες μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης

Τα τελευταία χρόνια, οι απαιτήσεις των καταναλωτών ως προς την ποιότητα των τροφίμων έχουν αλλάξει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υιοθέτηση νέων μεθόδων ανάλυσης οι οποίες είναι μη καταστροφικές, δεν χρησιμοποιούν τοξικά αντιδραστήρια και διαλύτες, δεν είναι χρονοβόρες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε γραμμή παραγωγής έχοντας την δυνατότητα να ανιχνεύουν αρκετές ενώσεις ταυτόχρονα (Dufour 2011). Η πολυφασματική απεικόνιση (multispectral imaging, MSI) και η φασματοσκοπία υπέρυθρων με μετασχηματισμού Fourier (FTIR) είναι δύο από τις τεχνικές αυτές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

### Πολυφασματική απεικόνιση (MSI) :

Η τεχνική ανάλυση MSI έχει την ικανότητα να δημιουργεί εικόνες δίνοντας φασματικές πληροφορίες για κάθε θέση (pixel) της εικόνας (Chevallier et al., 2006). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με την χρήση του Videometer, ένα όργανο φασματικής απεικόνισης σχεδιασμένο για τον προσδιορισμό του χρώματος, της υφής και της χημικής σύνθεσης του τροφίμου (Daugaard et al., 2010).

#### 1. VideometerLab

Το όργανο αυτό είναι ένα σύστημα που συνδέει την τεχνολογία φωτισμού, την φασματοσκοπία δονήσεων καθώς και την τεχνολογία του υπολογιστή (Rorodi et al., 2016). Κατά την εφαρμογή της πρώτης, το τρόφιμο απορροφά την ενέργεια της δέσμης του φωτός με αποτέλεσμα να φέρει αλλαγή στις θέσεις των ηλεκτρονίων στην τροχιά του ατόμου (Ebbing and Gammon, 2002). Στην φασματοσκοπία δονήσεων μία

δέσμη φωτός πέφτει πάνω στο δείγμα με αποτέλεσμα να απορροφηθεί η ενέργεια αυτή από τα δονούμενα μόρια τα οποία περιστρέφονται (Dufour, 2009). Τέλος, ο υπολογιστής πρακτικά χρησιμοποιεί το ορατό φως φάσματος 350-800 nm, για να αναπαραστήσει τα φυσικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (σχήμα, χρώμα, υφή, μέγεθος (Dufour, 2009; Sun, 2009; Elmascry et al., 2012; Gowen et al., 2015). Η τεχνική αυτή θεωρείται μια ταχεία, μη τοξική προς το περιβάλλον μέθοδος, ασφαλές ως προς το προϊόν. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί εύκολα να εισαχθεί στην γραμμή παραγωγής καθώς συμφέρει οικονομικά, διότι μετά από καιρό ελαττώνονται τα έξοδα εκμάθησης του προσωπικού, τα υπό εξέταση δείγματα, οι δεσμευμένες παρτίδες καθώς και οι παρτίδες που αποσύρονται (Nychas et al., 2016; Feng et al., 2018).

Η διάταξη αυτού του οργάνου αποτελείται από μία πηγή δέσμης φωτός, ένα φωτοαισθητήρα, ένα φασματογράφο, μία φωτογραφική κάμερα, ένα προσαρμογέα σήματος και τέλος έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με ειδικό λογισμικό ώστε να επεξεργάζονται οι εικόνες (Tsakanikas et al., 2016; Feng et al., 2018). Ύστερα από την λήψη της εικόνας πρέπει να γίνει επεξεργασία με σκοπό να οριστούν οι σημαντικές περιοχές, γιατί η εικόνα μπορεί να περιέχει και μη σημαντικά τμήματα από το εξωτερικό περιβάλλον του τροφίμου (Carstensen et al., 2003; Daugaard et al., 2010; Carstensen et al. 2013). Τα δεδομένα που δημιουργούνται, αξιοποιούνται και με άλλα φασματοσκοπικά δεδομένα με στόχο να δημιουργήσουν μοντέλα πρόβλεψης για την αλλοίωση των τροφίμων (Huang et al., 2014, Ropodi et al., 2015, Feng et al., 2018).



Εικόνα 1.3: όργανο πολυφασματικής απεικόνισης MSI (VideometerLab)

## 2. VideometerLite

Το VideometerLite είναι μια τεχνική πολυφασματικής απεικόνισης σαν το VideometerLab, με την διαφορά ότι το πρώτο είναι φορητό και η ανάλυση του ορίζεται σε 10 ζώνες. Η λειτουργία του είναι όμοια με του VideometerLab καθώς και αυτό ελέγχει ποιοτικά το υπό εξέταση τρόφιμο λαμβάνοντας εικόνες στην φασματική περιοχή 405 – 850 nm, σε χρονικό διάστημα 7-10 δευτερολέπτων. Τέλος, το VideometerLite μέσω της προηγμένης τεχνολογίας του μπορεί να μελετήσει το δείγμα μετρώντας το χρώμα, την υφή και την χημική σύνθεση της επιφάνειάς του, καθώς και να συνδεθεί σε WiFi για την ταχεία και σαφή ανάλυση των αποτελεσμάτων (Carstensen and Hansen 2003, [www.videometer.com](http://www.videometer.com)).



Εικόνα 1.4: Λήψη εικόνων από το MSI (VideometerLite)

### Φασματοσκοπία υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Η φασματοσκοπία FTIR θεωρείται από τις πιο σημαντικές σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης, όπου η διαδικασία λήψης της είναι σχετικά εύκολη και γρήγορη. Είναι μια αποτελεσματική μέθοδος που έχει ως στόχο την μελέτη της αλλοίωσης των διαφόρων ειδών των τροφίμων (Ellis et al., 2004). Αποτελείται από μια πλάκα που λειτουργεί ως διαχωριστής δέσμης, καθώς χωρίζει μια δέσμη φωτός σε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις. Πιο συγκεκριμένα, όταν το φως πέσει πάνω σε αυτήν την πλάκα, διαιρείται στα δύο και οι δέσμες που δημιουργούνται κατευθύνονται σε δύο κάθετα

κάτοπτρα, ένα σταθερό και ένα κινητό. Στην συνέχεια, τα κάτοπτρα επιστρέφουν τις δέσμες πίσω στην πλάκα-διαχωριστή όπου αυτές ενώνονται και οδηγούνται προς το δείγμα. Το σήμα του ανιχνευτή καταγράφεται ως συμβολόγραμμα, το οποίο υφίσταται μετασχηματισμό Fourier δίνοντας το τελικό φάσμα (Nicolet 2001).



Εικόνα 1.5: Φασματοφωτόμετρο FT/IR 6200 JASCO

## 1.8 Σκοπός του Πειράματος

Η παρούσα διπλωματική διατριβή έχει ως βασικό στόχο τη μελέτη επίδρασης του βιοπροστατευτικού *Lactiplantibacillus pentosus* στους παθογόνους μικροοργανισμούς *L.monocytogenes* και *E.coli* σε δείγματα ρόκας, συσκευασμένα σε MAP συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το τεχνολογικό βακτήριο B281 ενάντια δύο στελεχών της *L. monocytogenes* (1<sup>ο</sup> κύκλος πειράματος), καθώς και δύο στελεχών *E. coli* O157:H7 (2<sup>ο</sup> κύκλος). Το παρόν πείραμα μελετά επίσης την συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων, της αλλοίωσης της ρόκας, με τα δεδομένα που προέκυψαν από την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και την φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR), προσδοκώντας την έγκαιρη ανίχνευση της μικροβιολογικής ποιότητας.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Συντήρηση ρόκας

#### 2.1.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Το πείραμα αποτελείται από δύο κύκλους. Στον πρώτο κύκλο, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της δράσης του τεχνολογικού βακτηρίου B281 ενάντια δύο στελεχών της *L. monocytogenes*, τον B127 και τον B133. Στον δεύτερο κύκλο, μελετήθηκε η δράση του ίδιου τεχνολογικού βακτηρίου κατά δύο στελεχών *E.coli*, τον B290 και τον B289. Και στους δύο κύκλους αφού πρώτα τα δείγματα εμβολιάστηκαν με τον εκάστοτε παθογόνο μικροοργανισμό, ακολούθησε ο ψεκασμός τους με τρεις διαφορετικές περιπτώσεις. Στην πρώτη περίπτωση έγινε ψεκασμός με ζυμό λαχανικών (B). Στην δεύτερη και στην τρίτη περίπτωση ο ψεκασμός πραγματοποιήθηκε με το υπερκείμενο (S) και την βιομάζα (M) του τεχνολογικού βακτηρίου, αντίστοιχα. Στην συνέχεια, τα δείγματα ρόκας συσκευάστηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP) με περιεκτικότητα 10% CO<sub>2</sub> - 10%O<sub>2</sub> – 80%N<sub>2</sub> και αποθηκεύτηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, των 4°C και 10°C.

Έγιναν δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις για το κάθε είδος συσκευασίας. Οι δειγματοληψίες γίνονταν ανά 48 ώρες, για κάθε θερμοκρασία ενώ σε περιπτώσεις που κρίθηκε αναγκαίο πραγματοποιούνταν σε περισσότερο από 48 ώρες. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε την ημέρα που εμβολιάστηκε η ρόκα (0 day). Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν προσδιορισμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), καθώς και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, όπως *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες/μύκητες καθώς και η μέτρηση του pH.

Για την εφαρμογή των ταχείων μεθόδων, έπειτα από τις δειγματοληψίες, ένα μέρος του δείγματος μεταφερόταν σε τρυβλίο και ακολουθούσε η λήψη δεδομένων με την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI), καθώς και της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR).

### 2.1.2 Παρασκευή ζυμού λαχανικών

Η παρασκευή του ζυμού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που ακολούθησαν οι Manios et al., (2012) στην ερευνά τους. Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευή του ζυμού αγοράστηκαν από ελληνικό σουπερμάρκετ δείγματα μαρουλιού (n=2) και δείγματα λάχανου (n=2). Αρχικά, αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα και ζυγίστηκαν 250 gr από το κάθε είδος δειγμάτων. Στην συνέχεια, πλύθηκαν τα φύλλα με νερό βρύσης, ώστε να φύγουν τα οργανικά άλατα και βυθίστηκαν σε λεκάνη με χλωρίνη και νερό σε αναλογία 1:1 (σε ένα λίτρο νερό αντιστοιχούσε ένα κουταλάκι χλωρίνης). Ύστερα, αφού ξεπλύθηκαν καλά με νερό για περίπου 5 min και στέγνωσαν σε θάλαμο νηματώδης ροής αναμείχθηκαν σε μπλέντερ οικιακής χρήσης με 250 ml απιονισμένο νερό το οποίο είχαμε θερμάνει νωρίτερα σε θερμοκρασία 45°C για περίπου 1 λεπτό, σε υψηλή ταχύτητα. Ο πολτός που παράχθηκε, θερμάνθηκε στους 80°C για 2 ώρες περίπου, με παράλληλη ανάδευση σε Stirrer, ώστε να ομογενοποιηθεί. Το μίγμα διηθήθηκε μέσω χαρτιού whatman 0,2 μm για να απομονωθεί ο ζυμός και τοποθετήθηκε σε φιάλη Duran των 100 ml, όπου αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά. Τέλος, συντηρήθηκε στους 4°C.

### 2.1.3 Βακτηριακά στελέχη και προετοιμασία εμβολίου

Εννιά βακτηριακά στελέχη ανανεώθηκαν με σκοπό να πραγματοποιηθεί η δοκιμή της κηλίδας (spot test), η οποία είχε ως στόχο να ελέγξει την αλληλεπίδραση των βακτηρίων αυτών με τους παθογόνους μικροοργανισμούς (*L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7) (Thomas, Pious, et al., 2015). Μέσω αυτής της τεχνικής κρίθηκε ποιο τεχνολογικό βακτήριο θα χρησιμοποιηθεί στο παρόν πείραμα. Αρχικά, έγινε η τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking), όπου με την βοήθεια ενός κρίκου υπό ασηπτικές συνθήκες, μεταφέρθηκε ποσότητα από τον μικροοργανισμό πάνω σε τρυβλίο υποστρώματος Tryptone soy Agar (TSA) σχηματίζοντας το γράμμα z τρεις φορές σε συγκεκριμένα σημεία του τρυβλίου. Στην συνέχεια, τα τρυβλία TSA επωάστηκαν στους 25-30°C για 24-48 ώρες, μέχρι να αναπτυχθούν αποικίες. Στην περίπτωση που εμφανιστεί μια ομάδα αποικιών, η καλλιέργεια είναι καθαρή και τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν (Μαλισιόβα, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις,



2015). Τα βακτήρια αυτά είναι: ο B281, FMX3 broth, Bacillus Subtilis, L125, SMX2 broth, B282, T571<sup>2</sup>, L33 broth και T571<sup>1</sup>. Κατά την διάρκεια του streaking, έγινε και εμβολιασμός όλων των μικροοργανισμών σε σωληνάκια De Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS), ώστε να αποφασιστεί τι ποσότητα από τα βακτήρια θα εμβολιαστεί. Πιο συγκεκριμένα, από τα σωληνάκια που ήταν πιο θολά χρησιμοποιήθηκαν 20 μl, ενώ από τα λιγότερο θολά 100 ml. Με αυτές τις ποσότητες έγινε η ανανέωση των βακτηρίων σε σωληνάκια Tryptone soy broth (TSB, Merck), δημιουργήθηκαν δύο σωληνάκια για κάθε βακτήριο, για τις ανάγκες του πειράματος. Στην συνέχεια, έγινε ανάδευση με Vortex (Vortex 2 IKA) και επώαση στους 25-30°C. Ακολούθησε και δεύτερη ανανέωση, όπου έγινε εμβολιασμός 20 μl μικροοργανισμού σε TSB και MRSB, καθώς και 100 μl μικροοργανισμού στο ζωμό λαχανικών και επώαση στους 30°C για 18-24 ώρες. Την επόμενη μέρα, παρατηρήθηκε ότι δύο από τα τεχνολογικά βακτήρια ,ο B282 και ο T571<sup>2</sup> δεν θόλωσαν, δηλαδή δεν παρουσίασαν μικροβιακή ανάπτυξη με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια του πειράματος (Γιαβάσης Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2020). Τα υπόλοιπα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν, ώστε να κρατηθεί το υπερκείμενο από τον ζωμό και το MRS, καθώς και η βιομάζα (free cells) από το MRS.

- Φυγοκέντρηση: Κατά τη φυγοκέντρηση τοποθετήθηκαν 5 ml από το κάθε τεχνολογικό βακτήριο σε αποστειρωμένα σωληνάκια 15 ml τύπου Falcon, τα οποία ζυγίστηκαν με ζυγό ακριβείας ώστε να έχουν το ίδιο βάρος αντιδιαμετρικά κατά την είσοδο τους στην φυγόκεντρο. Τα υπερκείμενα, φυγοκεντρήθηκαν δύο φορές, με σκοπό τον περαιτέρω εξευγενισμό του εναιωρήματος. Στην περίπτωση της βιομάζας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με την πρώτη φυγοκέντρηση, προστέθηκε 5 ml ποσότητα αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K.), έγινε εκ νέου φυγοκέντρηση όπου απομακρύνθηκε ξανά το υπερκείμενο, προστέθηκε διάλυμα Ringer και έγινε ανάμειξη με την χρήση Vortex.
- Φιλτράρισμα: Τα υπερκείμενα, στην συνέχεια, φιλτραρίστηκαν με την χρήση σύριγγας και φίλτρου Whatman 0,2 μm (Polycap AS, Whatman™ Ltd., Buckinghamshire, UK), ώστε να απομακρυνθούν τα πιθανά υπολείμματα της βιομάζας των μικροοργανισμών.

- Αραιώσεις: Ύστερα ακολούθησαν δύο διαδοχικές αραιώσεις του εναιωρήματος σε αποστειρωμένα σωληνάκια με 9ml Ringer, με σκοπό την μείωση του αρχικού μικροβιακού φορτίου. Η δεύτερη αραιώση χρησιμοποιείται για το spot test.

Παρόμοια ήταν και η προετοιμασία που ακολούθησαν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Αρχικά, τα στελέχη των μικροοργανισμών αναπτύχθηκαν σε σωληνάκια TSB, για τις ανάγκες του πειράματος χρειάστηκαν 8 σωληνάκια, δύο για κάθε στέλεχος του εκάστοτε μικροοργανισμού. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανανέωση όπου ποσότητα 20ml από το κάθε σωληνάκι προστέθηκε σε TSB και ακολούθησε η επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες. Ύστερα, έγινε η δεύτερη ανανέωση ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την πρώτη και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με σκοπό τον διαχωρισμό και την απομόνωση της βιομάζας από το υπερκείμενο. Τέλος, ακολούθησαν οι δύο διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένα σωληνάκια Ringer, όπου η τελευταία χρησιμοποιήθηκε για επίστρωση.

- Spot test: Αρχικά 100 μl από τους παθογόνους μικροοργανισμούς εμβολιάστηκε σε τρυβλία TSA με την μέθοδο της επιφανειακής. Τρία τρυβλία χρειάστηκαν για κάθε παθογόνο μικροοργανισμό, ένα για κάθε περίπτωση. Στην πρώτη περίπτωση, πραγματοποιήθηκαν τα spot με τον μικροοργανισμό ανεπτυγμένο σε MRS, ύστερα με το υπερκείμενο του και τέλος με το υπερκείμενο ανεπτυγμένο σε ζυμό. Κατά αυτό τον τρόπο έγινε το Spot test, όπου δύο σταγόνες (5 μl - η σταγόνα) από την κάθε περίπτωση του τεχνολογικού βακτηρίου εμβολιάστηκαν στο τρυβλίο αντιδιαμετρικά. Ύστερα, τα τρυβλία στέγνωσαν και επώαστηκαν στους 30-37°C .

#### 2.1.4 Δράση B281, FMX3 και T571 κατά των παθογόνων μικροοργανισμών

Με την παραπάνω μέθοδο παρατηρήθηκε ότι ο B281 έχει την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *L. monocytogenes* και στην *Escherichia* O157:H7 για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στο κυρίως πείραμα. Πιο συγκεκριμένα, και οι

τρεις περιπτώσεις με τις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο B281: βιομάζα(M), υπερκείμενο (S), ζυμός (B), είχαν ισχυρή δράση κατά του στελέχους B133 της *L. monocytogenes*, ενώ στο στέλεχος B127 έδρασε μόνο η περίπτωση του ζυμού(B). Όσον αφορά την *E.coli* τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, μόνο η βιομάζα του τεχνολογικού βακτηρίου είχε δράση κατά του στελέχους B289, ενώ το υπερκείμενο και ο ζυμός του έδρασαν κατά του στελέχους B290.

Επίσης, σύμφωνα με τα spot test που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι τα τεχνολογικά βακτήρια T571 και FMX<sub>3</sub> αφενός είχαν πιο ισχυρή δράση από τα υπόλοιπα, αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο ο B281, με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Ο T571 έφερε αποτέλεσμα μόνο στην περίπτωση της βιομάζας ενάντια του στελέχους B127 της *L. monocytogenes*, ενώ στο στέλεχος B133 του ίδιου παθογόνου μικροοργανισμού έδρασε ελάχιστα στις περιπτώσεις του ζυμού και του υπερκειμένου. Αντίθετα, ο FMX<sub>3</sub> είχε μικρή δράση και στις τρεις περιπτώσεις μόνο κατά του B133 και δεν έδρασε καθόλου στο B127. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για την *E.coli* αφού η βιομάζα και το υπερκείμενο του T571 έδρασε ελάχιστα κατά του B290, ενώ κατά του B289 είχε δράση μόνο η βιομάζα. Στην περίπτωση του FMX<sub>3</sub> δεν υπήρξε δράση κατά του B289, ενώ η δράση κατά του B290 ήταν μικρή σε όλες τις περιπτώσεις.

### 2.1.5 Προετοιμασία παθογόνου και τεχνολογικού μικροοργανισμού

#### ➤ Παθογόνος μικροοργανισμός:

Δύο μέρες πριν την εκτέλεση του πειράματος, έγινε ανανέωση των παθογόνων μικροοργανισμών σε σωληνάκια TSB. Η λήψη των μικροοργανισμών αυτών πραγματοποιήθηκε από προηγούμενες ανανεώσεις δίνοντας τους την δυνατότητα να αποκτήσουν ξανά την ζωτικότητα τους με σκοπό αναπτυχθούν. Κατά την πρώτη ανανέωση εμβολιάστηκαν 20 μl παθογόνου μικροοργανισμού σε σωληνάκια TSB. Παρασκευάστηκαν δύο σωληνάκια για κάθε στέλεχος, στην συνέχεια αναδεύτηκαν με την χρήση vortex και επωάστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Έπειτα από 24 ώρες, ακολούθησε η δεύτερη ανανέωση των παθογόνων μικροοργανισμών σε TSB σωληνάκια κάνοντας την ίδια διαδικασία. Μετά από 24 ώρες χρησιμοποιήθηκαν δύο

από τα τέσσερα σωληνάκια, ένα για κάθε στέλεχος, που επιλέχθηκαν με βάση την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών (θολερότητα), τα οποία μεταφέρθηκαν σε falcon των 15 ml με σκοπό την φυγοκέντρησή τους. Η φυγοκέντρωση έγινε στους 4°C για 10 λεπτά με 5rpm (5000 στροφές), με σκοπό τον διαχωρισμό της βιομάζας από το υπερκείμενο. Στην συνέχεια, έγινε προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer στο σωληνάκι με την βιομάζα και πραγματοποιήθηκε ξανά η φυγοκέντρωση. Ύστερα έγινε απόρριψη του υγρού, εκ νέου προσθήκη Ringer ποσότητας 10ml και ακολούθησε η ανάμειξη με την χρήση vortex.

➤ *Τεχνολογικό Βακτήριο:*

Όπως και στον παθογόνο μικροοργανισμό έτσι και στο τεχνολογικό βακτήριο πραγματοποιήθηκαν δύο ανανεώσεις. Η πρώτη ανανέωση έγινε σε σωληνάκια MRS broth και η δεύτερη στον ζωμό λαχανικών. Πιο συγκεκριμένα, στον πρώτο κύκλο πειράματος, όπου μελετήσαμε την *L. monocytogenes*, έγινε εμβολιασμός 20 ml τεχνολογικού βακτηρίου σε σωληνάκια MRS, ενώ στον δεύτερο κύκλο με την *E. coli* εμβολιάστηκαν 100 ml B281 σε σωληνάκια MRS. Και στις δύο περιπτώσεις τα σωληνάκια επωάστηκαν στους 30°C για 18 με 24 ώρες. Κατά την δεύτερη ανανέωση εμβολιάστηκαν 100 ml τεχνολογικού βακτηρίου σε falcon των 50 ml, με ζωμό 40 ml. Επωάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν την επόμενη μέρα για φυγοκέντρωση. Συνολικά, παρασκευάστηκαν τέσσερα falcon με ζωμό εμβολιασμένα με το βακτήριο που δύο από αυτά φυγοκεντρήθηκαν για το υπερκείμενο. Από τα άλλα δύο πήραμε την βιομάζα χωρίς φυγοκέντρωση. Έγιναν δύο φυγοκεντρήσεις για το υπερκείμενο του τεχνολογικού βακτηρίου, όπου μετά την ανάμειξη με vortex ήταν έτοιμα για χρήση.

### 2.1.6 Προετοιμασία Δειγμάτων

Τα δείγματα ρόκας αγοράστηκαν από την ελληνική αγορά και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 24 ωρών, αφού πρώτα είχαν συντηρηθεί σε οικιακό ψυγείο στους 4°C. Στην συνέχεια, αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα της ρόκας και τα υπόλοιπα πλύθηκαν και κόπηκαν. Ύστερα από τις φυγοκεντρήσεις και την προετοιμασία των δειγμάτων, ακολούθησαν οι διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένα σωληνάκια Ringer, αφού πρώτα τα δύο στελέχη του κάθε παθογόνου μικροοργανισμού

αναμείχθηκαν και αναδεύτηκαν με την χρήση vortex. Αρχικά, πριν τις φυγοκεντρήσεις ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού ήταν 8 log CFU/gr και μετά την διαδικασία των δύο φυγοκεντρήσεων και τις τρεις διαδοχικές αραιώσεις, ο πληθυσμός έφτασε στους 3 log CFU/gr. Με τον συγκεκριμένο πληθυσμό έγινε ο εμβολιασμός του παθογόνου μικροοργανισμού στα δείγματα ρόκας. Πιο συγκεκριμένα, από τα 3kg ρόκας χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα 300g τα οποία μεταφέρθηκαν στο laminaar για εμβολιασμό. Η διαδικασία του εμβολιασμού πραγματοποιήθηκε με την χρήση μιας πιπέτας όπου μετέφερε το εμβόλιο ρίχνοντας το με οριζόντια κατεύθυνση στα απλωμένα φύλλα της ρόκας. Στην συνέχεια, με την βοήθεια ενός ψεκαστήρα έγινε ο ψεκασμός με τον ζωμό λαχανικών. Ποσότητα 3 ml ζωμού (4 ψεκασμοί) μεταφέρθηκε στην ρόκα ακολούθησε το ανακάτεμα ώστε να εξαπλωθεί ο ζωμός και ο παθογόνος μικροοργανισμός σε όλη την επιφάνεια. Ανά 30 gr δείγματος τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σακουλάκια τα οποία εισάγονταν στο μηχάνημα συσκευασίας Henkocac 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. Τέλος, τα συσκευασμένα δείγματα συντηρήθηκαν σε κλιβάνους των 4 και 10°C . Με τον ίδιο τρόπο έγινε και ο ψεκασμός των άλλων δύο περιπτώσεων, δηλαδή ψεκασμός με το υπερκείμενο του τεχνολογικού βακτηρίου καθώς και με τη βιομάζα του.

## 2.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Πριν από την έναρξη των μικροβιολογικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Για την κατασκευή των υλικών αυτών ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή:

- **Plate Count Agar (PCA)** (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): καταμέτρηση της OMX με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 30°C για 48 ώρες.
- **Pseudomonas Agar Base** (LAB108, LAB M., U.K.): με την προσθήκη αντιβιοτικού Cetrimide-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): καταμέτρηση των εντεροβακτηρίων με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Η επώαση γινόταν στους 37°C για 24 ώρες.
- **De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS)** (Ref.401728S2, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): καταμέτρηση των οξυγαλακτικών με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Η επώαση γινόταν στους 30°C για 72 ώρες.
- **Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC)** (Lab M Limited): με την προσθήκη αντιβιοτικού Chloramphenicol (X209) (LAB M, UK), για την καταμέτρηση των ζυμών και μυκήτων, με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 4-5 μέρες.
- **Palcam Listeria Agar:** με την προσθήκη αντιβιοτικού Listeria Palcam antimicrobial supplement, Biolife, για την καταμέτρηση του *L. monocytogenes*, με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 37 °C για 48 ώρες.
- **Tryptone-Bile-X-Glucuronate (TBX)** (Harlequin Tryptone bile Glucuronide agar, Neogen): απαρίθμηση *Escherichia coli* (*E. coli*) με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η επώαση γινόταν στους 44°C για 24 ώρες.

Κατά τη μικροβιολογική ανάλυση 25g δείγματος μεταφέρονταν σε αποστειρωμένη σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, France) στην οποία γινόταν προσθήκη 225ml (αραίωση 1/10) αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K.). Στην συνέχεια, πραγματοποιούταν η ομογενοποίηση στο Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 60s και ακολουθούσαν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένα σωληνάκια Ringer. Μετά το πέρας των αραιώσεων πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός των τρυβλίων. Κατά την επιφανειακή επίστρωση, γινόταν χρήση ενός αποστειρωμένου μεταλλικού διασκορπιστή για την εφαρμογή 0,1ml ποσότητας αραιωμένου δείγματος στα στερεοποιημένα τρυβλία (PCA, CFC, Palcam, TBX, RBC). Κατά την τεχνική της ενσωμάτωσης, γινόταν εμβολιασμός με 1ml εναιωρήματος σε κενά τρυβλία και στην συνέχεια η έγχυση θρεπτικών υλικών (VRBGA, MRS), ακολουθούσε ανάδευση, στερεοποίηση και

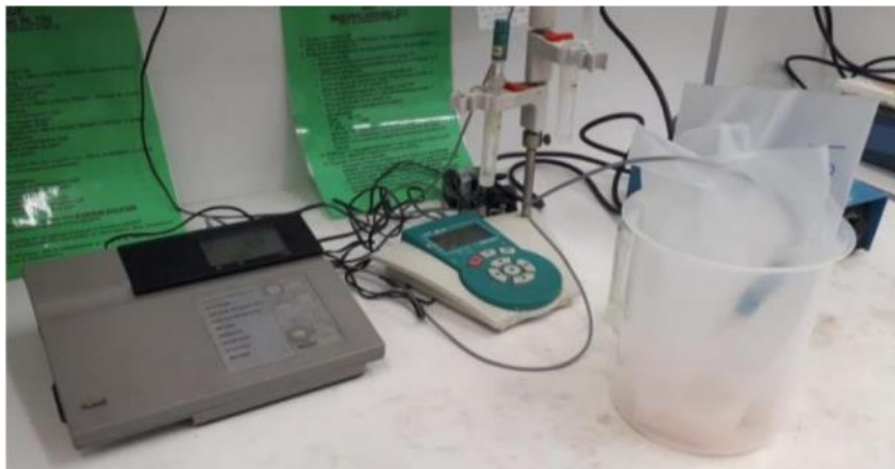
τέλος πάλι ρίψη θρεπτικού υλικού για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών. Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία επωάζονταν σε κλιβάνους στις ιδανικές συνθήκες και σε χρονικό διάστημα κατάλληλο για κάθε θρεπτικό υλικό. Τέλος, πραγματοποιούνταν η μέτρηση των αποικιών που εμφανίζονταν στα τρυβλία της κάθε αραιώσης.



Εικόνες 2.1 : Διαδικασία μικροβιολογικών αναλύσεων

### 2.3 Μέτρηση pH

Η μέτρηση του pH του ομογενοποιημένου δείγματος πραγματοποιούνταν μετά από τις μικροβιολογικές αναλύσεις μέσω του ψηφιακού οργάνου (RL150, Russell pH, Cork, Ireland), με ακρίβεια  $\pm 0.2$ . Πριν την χρήση του γίνονταν βαθμονόμηση και ύστερα ακολουθούσε η διαδικασία της μέτρησης με τη βοήθεια του γυάλινου ηλεκτροδίου (Metrohm AG, Herisau, Switzerland).



Εικόνα 2.2: Μέτρηση pH με όργανο Russell RL150 (Russell Inc, Boston, USA)

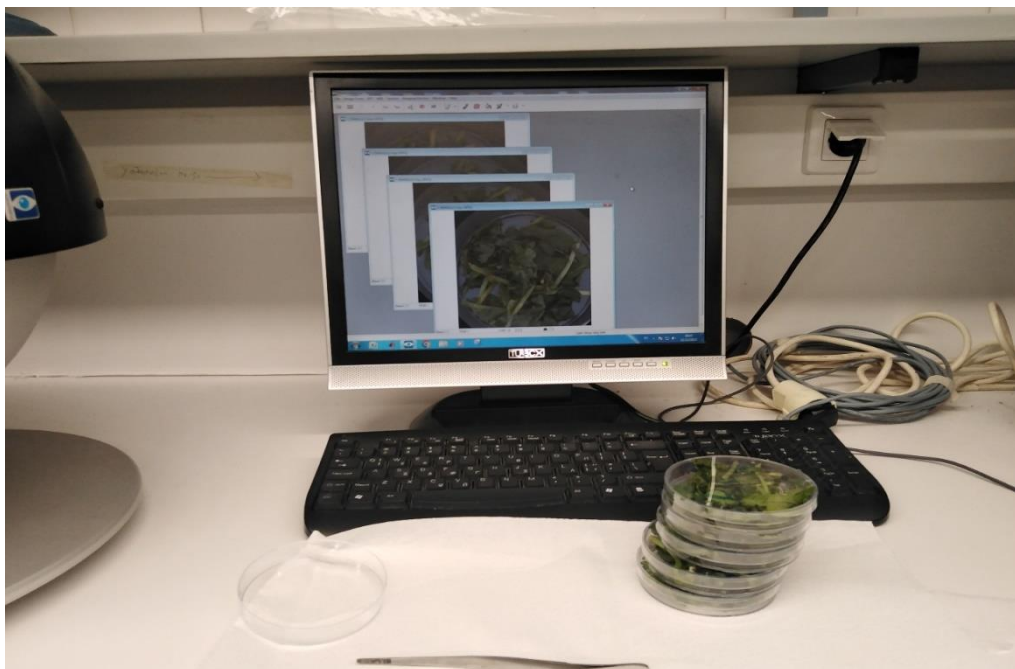
## 2.4 Εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης MSI

Κατά την δειγματοληψία μέρος των δειγμάτων ( $n=130$ ) μεταφερόταν σε τρυβλίο ώστε να γίνει λήψη των αντίστοιχων εικόνων. Ένα από τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των πολυφασματικών εικόνων είναι το VideometerLab (Videometer A/S, Herlev, Δανία), ένα σύστημα που λαμβάνει εικόνες σε 18 διαφορετικά και μη ομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος με εύρος 405-970 nm (Panagou et al., 2014).

Πριν την λήψη των φωτογραφιών, έγινε η διαδικασία του light setup, με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζεται το φως με βάση τον τύπο του αντικειμένου που θα εξεταστεί. Κατά την πρώτη χρήση του VideometerLab πραγματοποιείται η διαδικασία του autolight, όπου δημιουργείται ένα αρχείο το οποίο ανακαλείται κάθε φορά κατά το light setup. Ύστερα από αυτήν την διαδικασία, το όργανο πρέπει να βαθμονομηθεί γεωμετρικά και ραδιομετρικά. Με την παραπάνω προετοιμασία επιτυγχάνεται ένα μέσο δυναμικό εύρος φωτός και ελαττώνονται οι σκιές και η παραμόρφωση του ειδώλου (Panagou et al., 2014).

Κατά τη χρήση του οργάνου, το τρυβλίο με το δείγμα τοποθετείται στην βάση του και πραγματοποιείται η λήψη της εικόνας. Η εικόνα εκτός από τις περιοχές ενδιαφέροντος περιέχει και πληροφορίες οι οποίες είναι μη σχετικές με την ανάλυση, όπως το τρυβλίο και τον περιβάλλοντα χώρο. Για τον λόγο αυτόν είναι απαραίτητο να γίνει επεξεργασία των εικόνων ώστε να κοπούν τα τμήματα της φωτογραφίας που δεν χρειάζονται και να παραμείνουν εκείνα που είναι σημαντικά για την ανάλυση (Ropodi et al., 2015, Tsakanikas et al., 2015). Αυτό επιτυγχάνεται τονίζοντας την αντίθεση μεταξύ των σημαντικών και μη σημαντικών σημείων. Η επεξεργασία πραγματοποιείται από το πρόγραμμα (Videometer- Labversion 2.12.39, Videometer A/S, Denmark). Ύστερα, για κάθε φωτογραφία που δημιουργείται υπολογίζεται η μέση φασματοσκοπική ανάκλαση, μέσω του υπολογισμού του μέσου όρου έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής ενδιαφέροντος (Estelles-Lopez et al., 2017).





Εικόνα 2.3: Λήψη εικόνων από το VideometerLab

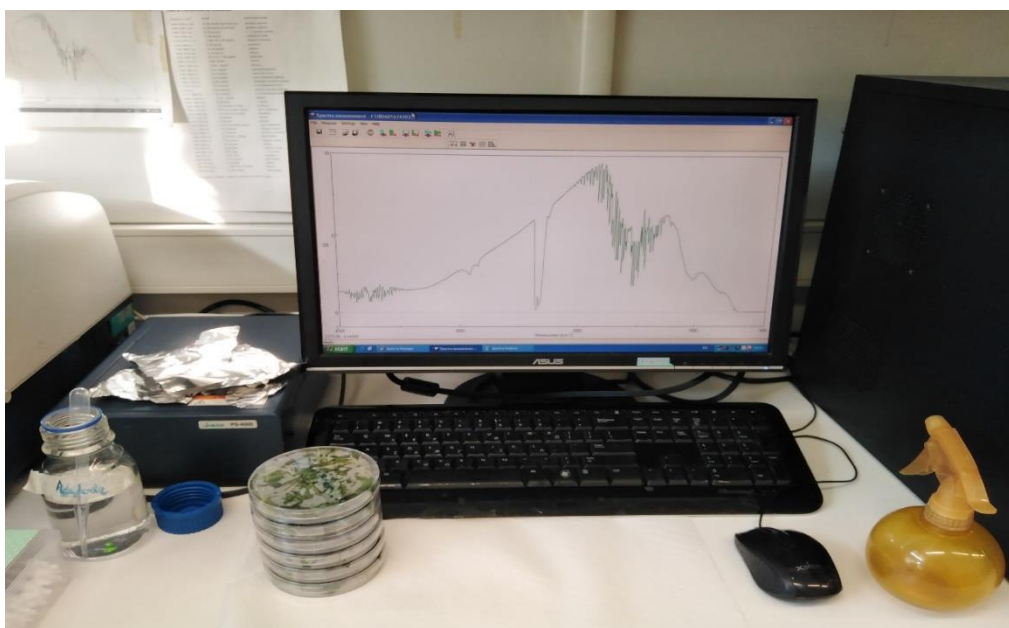
## 2.5 Χρήση VideometerLite

Με την ίδια διαδικασία έγινε και η λήψη φάσματος στο VideometerLite που καταγράφει εικόνες σε 10 διαφορετικά μήκη κύματος εντός του φάσματος 405-850 nm, αυτά είναι 405 nm, 430 nm, 450nm, 490nm, 515 nm, 590 nm, 630 nm, 660 nm, 690nm και 850 nm. Πιο συγκεκριμένα, αφού τοποθετούταν η φορτισμένη μπαταρία στο μηχάνημα πραγματοποιούταν η λήψη φωτογραφιών των δειγμάτων (n=119) σε χρονικό διάστημα 7-10 δευτερολέπτων, τα οποία ήταν τοποθετημένα σε τρυβλία στην βάση του οργάνου. Το VideometerLite ήταν συνδεδεμένο με το λογισμικό του VideometerLab, με αποτέλεσμα να παραλαμβάνονται οι εικόνες με τον τρόπο που αναφέρετε και στην παράγραφο 2.4.

## 2.6 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Εκτός από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης, πραγματοποιήθηκε και η εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Αρχικά, τα δείγματα (n=221) τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια κρυστάλλου ZnSe 45 ° HATR - Horizontal Attenuated Total Reflectance (PIKE Technologies, Madison,

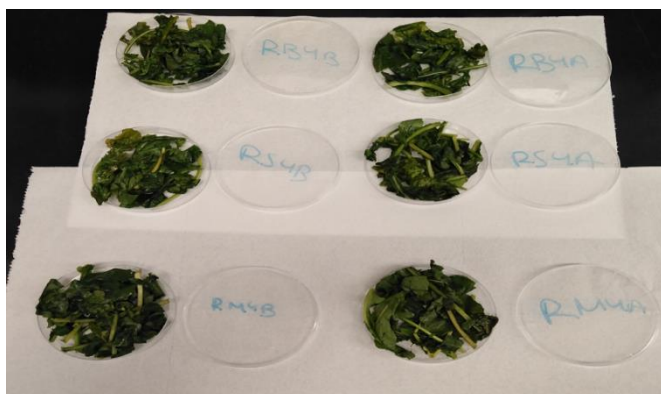
Wisconsin, Ηνωμένες Πολιτείες) και οι μετρήσεις FTIR έγιναν με τη χρήση του φασματόμετρου FT / IR 6200 JASCO. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα τοποθετήθηκε πάνω στην επιφάνεια του κρυστάλλου και ασκήθηκε πίεση με μικρό φύλλο αλουμινοχαρτού για να επιτευχθεί η βέλτιστη επαφή. Πριν την έναρξη των μετρήσεων και ανά 4 δείγματα, γινόταν βαθμονόμηση του οργάνου με ένα φάσμα αναφοράς που δινόταν από μέτρηση του κρυστάλλου δίχως δείγμα στην επιφάνεια του. Κατά τη λήψη του φάσματος αναφοράς ο κρύσταλλος είχε καθαριστεί με απορρυπαντικό και απιονισμένο νερό και στη συνέχεια με ακετόνη, όπως συνέβαινε επίσης και μετά από κάθε μέτρηση ανά δείγμα. Μέσω του λογισμικού Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) software version 2 (Jasco Corp.), λήφθηκαν τα φάσματα των μετρήσεων του FTIR, όπου εντός χρονικού διαστήματος 2 λεπτών – πραγματοποιούνταν 100 σαρώσεις ανά δείγμα, δίνοντας ένα φάσμα δεδομένων από τα  $4000\text{cm}^{-1}$  έως τα  $400\text{cm}^{-1}$ .



Εικόνα 2.4: Λήψη φάσματος από το FTIR

## 2.7 Οργανοληπτικός έλεγχος

Εκτός από τις μικροβιολογικές και τις φασματοσκοπικές αναλύσεις πραγματοποιούταν και οργανοληπτική αξιολόγηση πριν από κάθε δειγματοληψία, για κάθε θερμοκρασία συντήρησης. Ο έλεγχος αυτός γινόταν με βάση την αξιολόγηση της οσμής, του χρώματος των φύλλων, της υγρασίας και κατά επέκταση της συνολικής εμφάνισης των δειγμάτων. Για τον λόγο αυτόν δημιουργήθηκε μια κλίμακα βαθμολόγησης από το 1 έως το 3 με 0.5, με το φρέσκο να βαθμολογείται από 1 έως 1.5 και το μη αποδεκτό να αξιολογείται με βαθμό >2.



Εικόνα 2.5: Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων

## 2.8 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων

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

### 2.8.1 Γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square- Regression, PLS-R)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της OMX πραγματοποιήθηκε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Η ανάλυση παλινδρόμησης είναι εκείνη η τεχνική που ερευνά και μοντελοποιεί τη σχέση μεταξύ μεταβλητών. Πιο συγκεκριμένα, συσχετίζει γραμμικώς δύο σύνολα δεδομένων, X (ανεξάρτητη μεταβλητή) και Y (εξαρτημένη μεταβλητή), δημιουργώντας ένα νέο σύνολο μεταβλητών (ανεξάρτητων και εξαρτημένων) και

ορίζει έναν αριθμό κύριων συνιστωσών για το νέο σύνολο αυτό (Wold et al., 2001; Romia & Bernardez, 2009; Panagou et al., 2014). Για την μέθοδο αυτήν διακρίνονται δύο είδη μεταβλητών: οι ανεξάρτητες μεταβλητές ( $X$ ), όπου στην συγκεκριμένη μελέτη αντιστοιχούν στα φασματοσκοπικά δεδομένα του FTIR και του MSI και οι εξαρτημένες ( $Y$ ), που αντιστοιχούν στον πληθυσμό της OMX (Wold et al., 2001). Η συγκεκριμένη μέθοδος συστήνεται όταν το πλήθος των μεταβλητών είναι πολύ μεγάλο (Wold et al., 2001, Abdi, H., 2003).

Για την εφαρμογή της PLS-R, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα XLSTAT (Lumivero, USA 2023) και κατασκευάστηκαν μοντέλα για την ανάπτυξη της OMX. Πιο συγκεκριμένα, για την περίπτωση του FTIR, για περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα μεταξύ 1800 και 870  $\text{cm}^{-1}$ . Ορίστηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα φασματοσκοπικά δεδομένα και ως εξαρτημένες οι πληθυσμοί OMX.

Οι παράμετροι που υπολογίζονται αυτόματα για τα μοντέλα αυτά είναι η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος ανάπτυξης (Root Mean Square Error, RMSE), ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ), καθώς και οι γραμμικές παράμετροι: η κλίση της ευθείας  $a$  (slope) και η τομή της ευθείας με τον  $y$  άξονα, συντελεστής  $b$  (offset) για την ανάπτυξη, επικύρωση και πρόβλεψη τους. Οι παράγοντες συσχέτισης  $R^2$  και RMSE υπολογίζονται αυτόματα κατά την εφαρμογή (Romia & Bernardez, 2009; Dissing et al., 2013; Panagou et al., 2014; Bi et al., 2016; Ropodi et al., 2016).

### 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

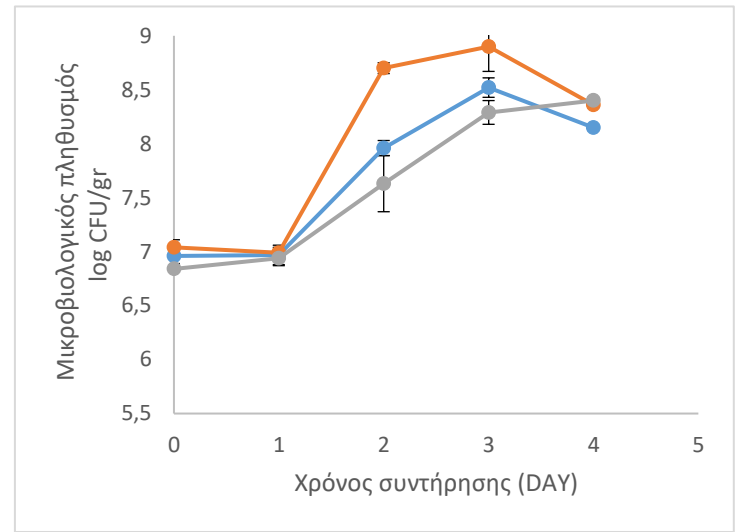
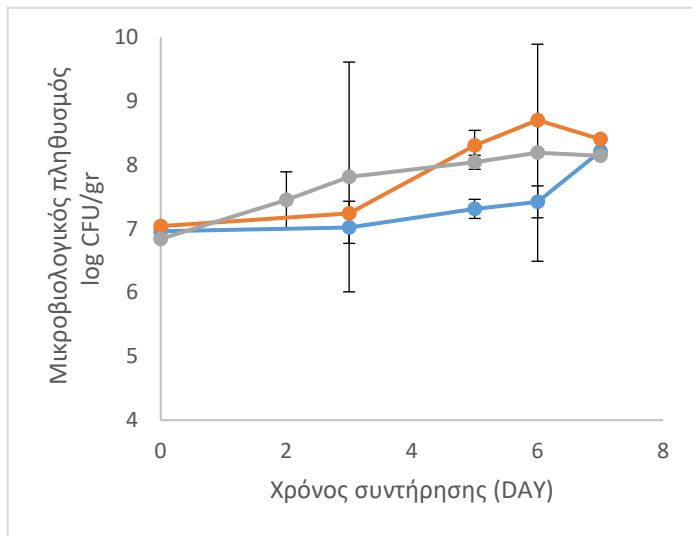
#### 3.1 Εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας

##### 3.1.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροοργανισμών που είχαν αναπτυχθεί στα δείγματα ρόκας συντηρημένα υπό συσκευασίες MAP και σε διαφορετικές θερμοκρασίες, έγινε η καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών στα τρυβλία της κάθε αραίωσης με εύρος 30- 300 αποικίες. Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στις θερμοκρασίες συντήρησης των 4 και 10 °C ήταν η Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα (ΟΜΧ), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), της οικογένειας Enterobacteriaceae, οι ζύμες/μύκητες, καθώς και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στα ακόλουθα γραφήματα. Πιο συγκεκριμένα, για την κατασκευή των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των log cfu/gr και οι τυπικές αποκλίσεις των δύο επαναλήψεων συντήρησης, καθώς λαμβάνονταν δύο δείγματα ανά κάθε δειγματοληψία. Ανά περίπτωση έχουμε τα ακόλουθα γραφήματα:

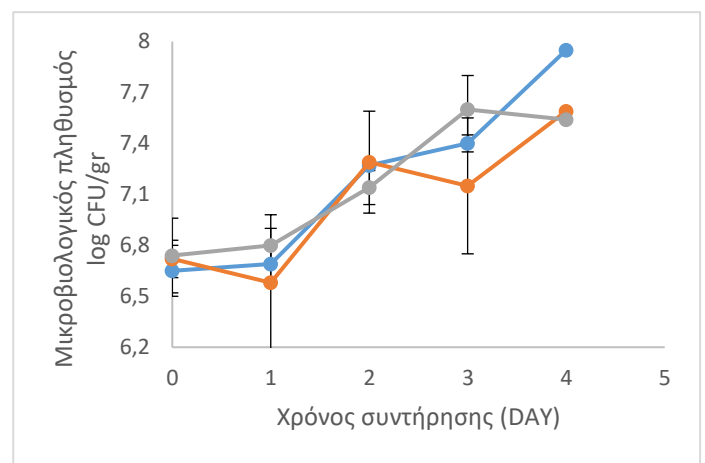
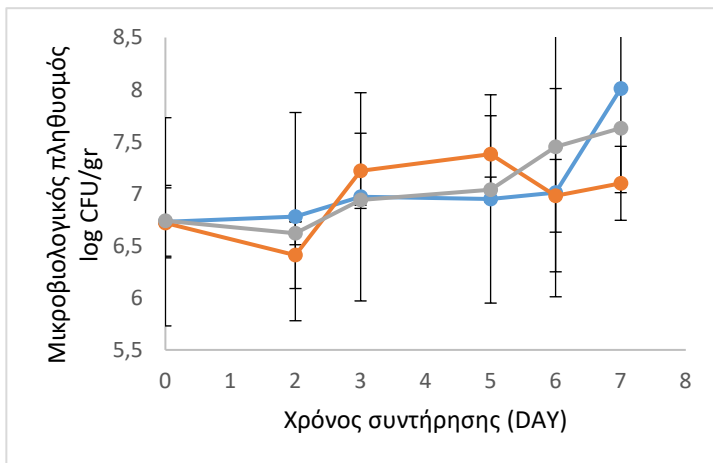
1<sup>η</sup> παρτίδα (*L. monocytogenes*):

➤ **OMX**



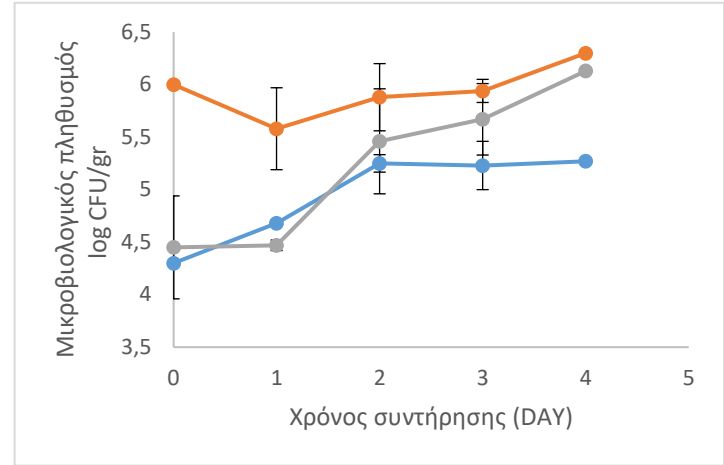
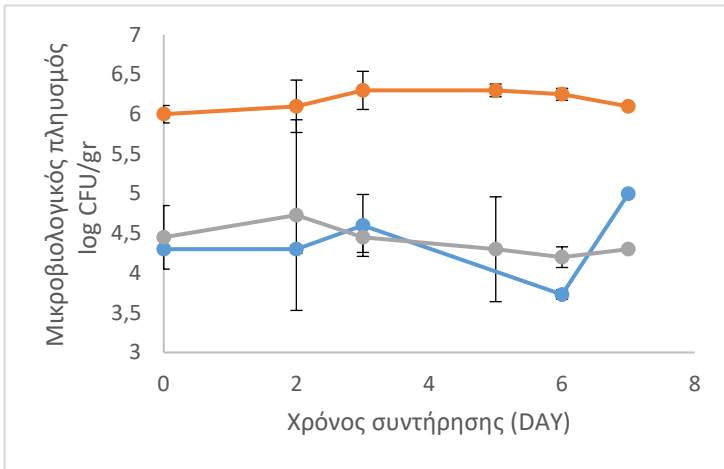
Διάγραμμα 3.1: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για την OMX και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα (●), Υπερκείμενο (●)

➤ ***Pseudomonas* spp.**



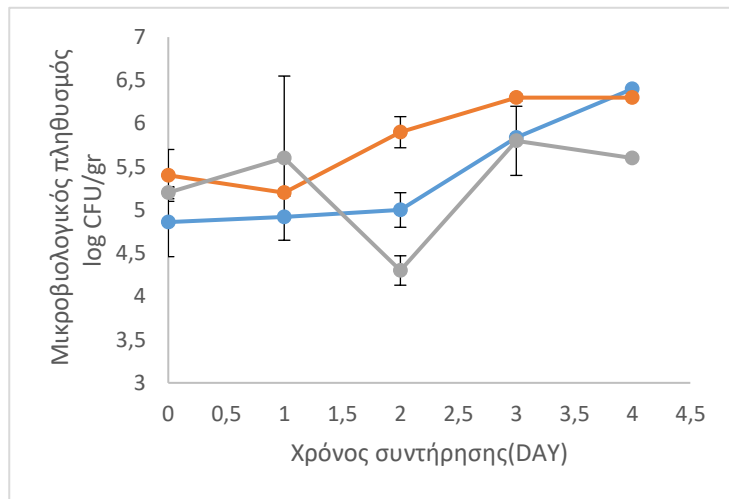
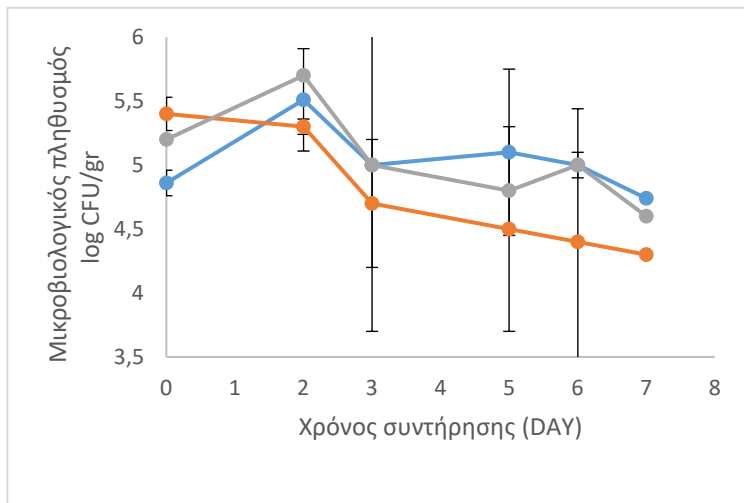
Διάγραμμα 3.2: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για το βακτήριο *Pseudomonas* spp. και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα (●), Υπερκείμενο (●)

➤ LAB



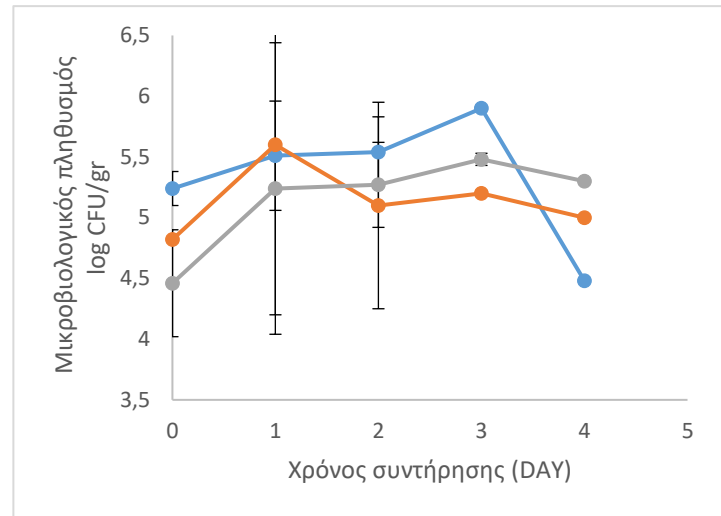
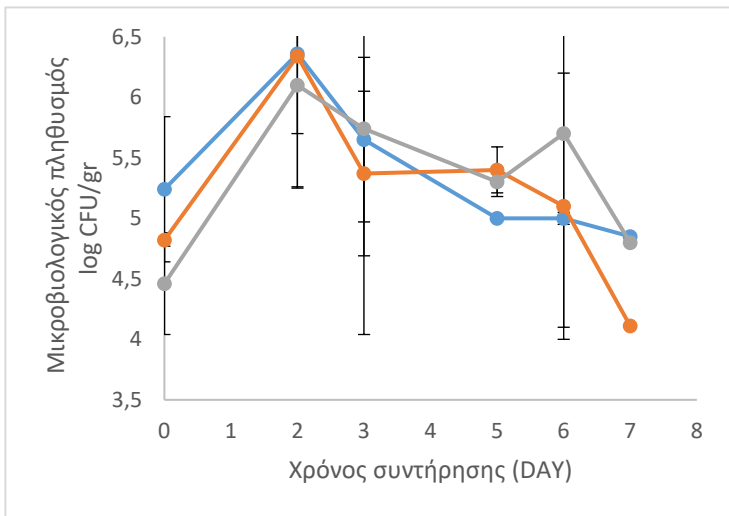
Διάγραμμα 3.3: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για LAB βακτήρια και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα(●), Υπερκείμενο (●)

➤ Enterobacteriaceae



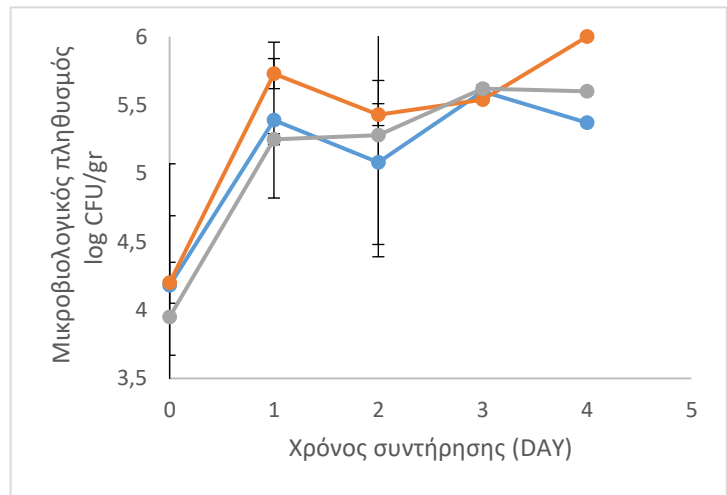
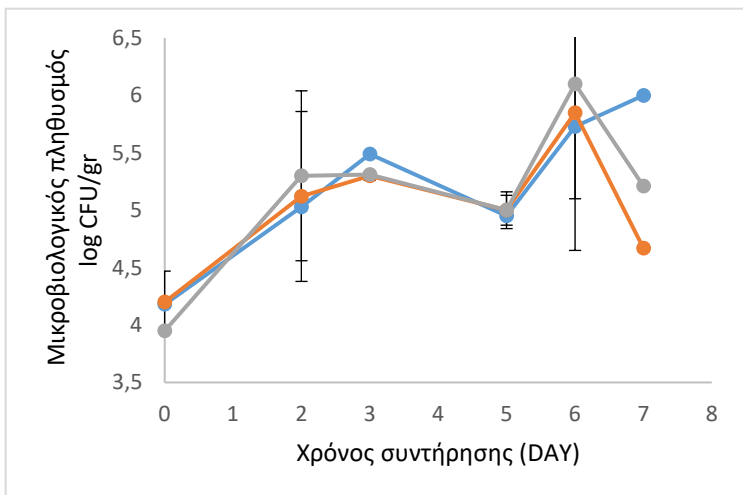
Διάγραμμα 3.4: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για Enterobacteriaceae και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα(●), Υπερκείμενο(●)

➤ Ζύμες/μύκητες



Διάγραμμα 3.5: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για ζύμες/μύκητες και στις τρεις περιπτώσεις Ζυμός (●), Βιομάζα(●), Υπερκείμενο(●)

➤ *Listeria monocytogenes*

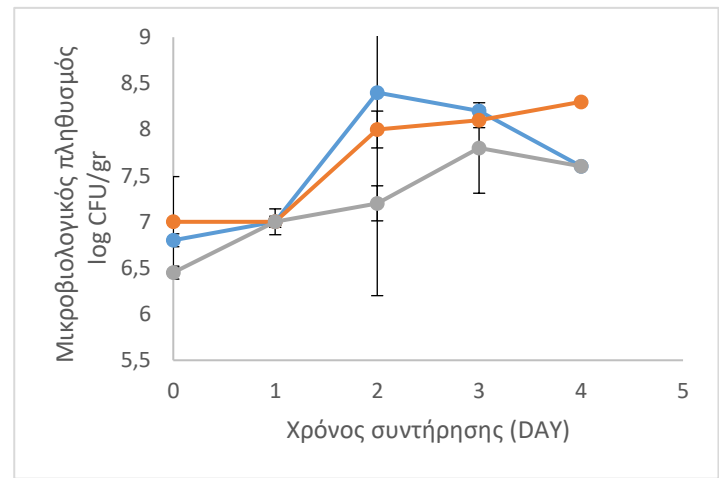
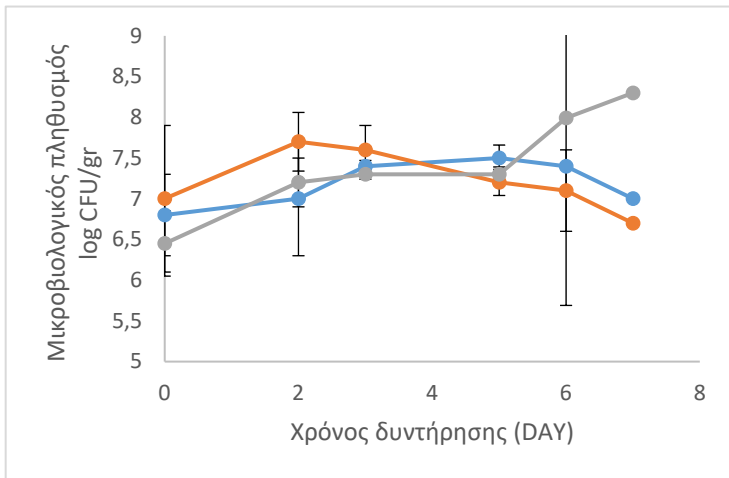


Διάγραμμα 3.6: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* και στις τρεις περιπτώσεις Ζυμός (●), Βιομάζα(●), Υπερκείμενο (●)



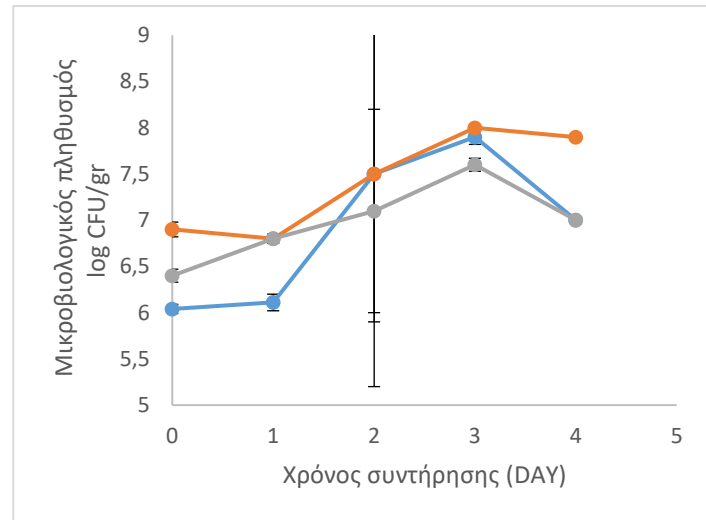
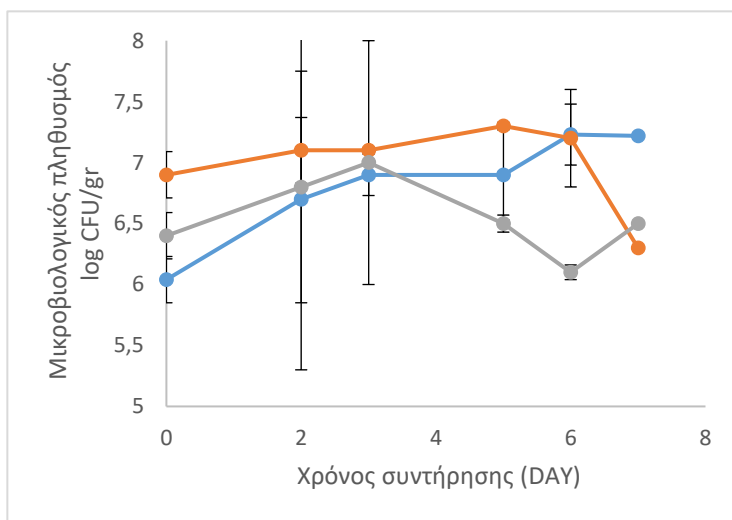
2<sup>η</sup> παρτίδα (*E.coli*):

➤ ΟΜΧ



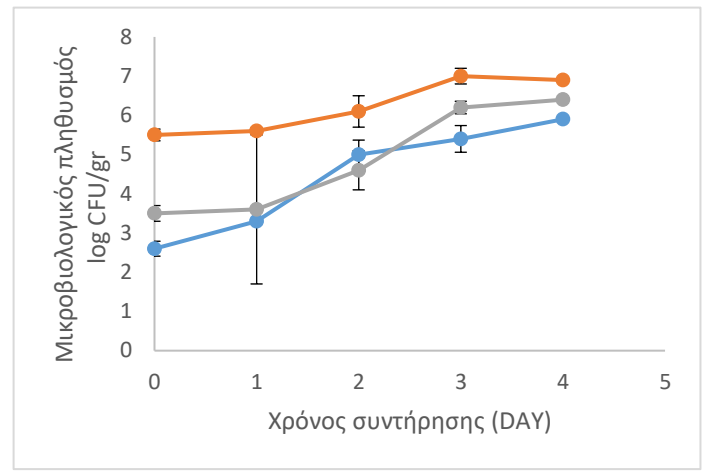
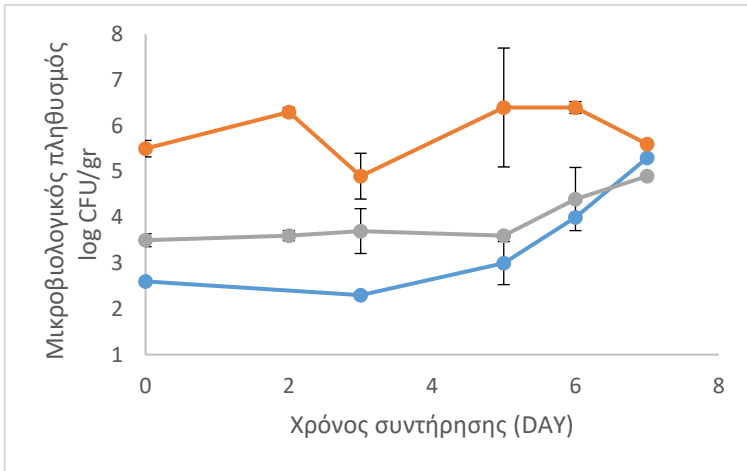
Διάγραμμα 3.7: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για ΟΜΧ και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα (●), Υπερκείμενο (●)

➤ *Pseudomonas spp.*



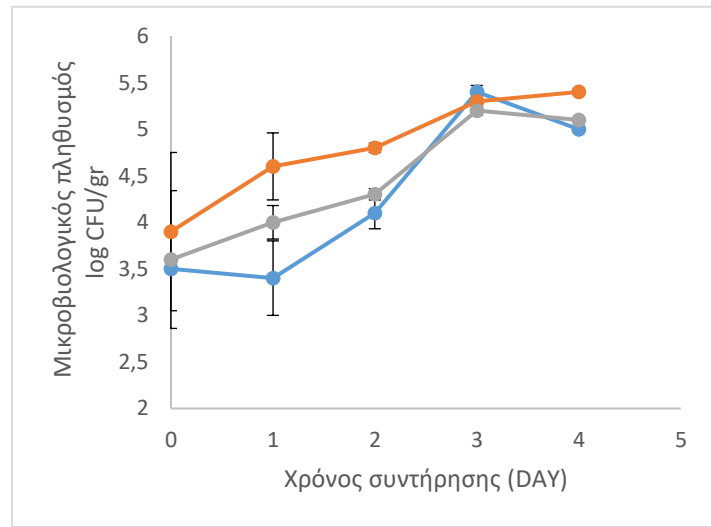
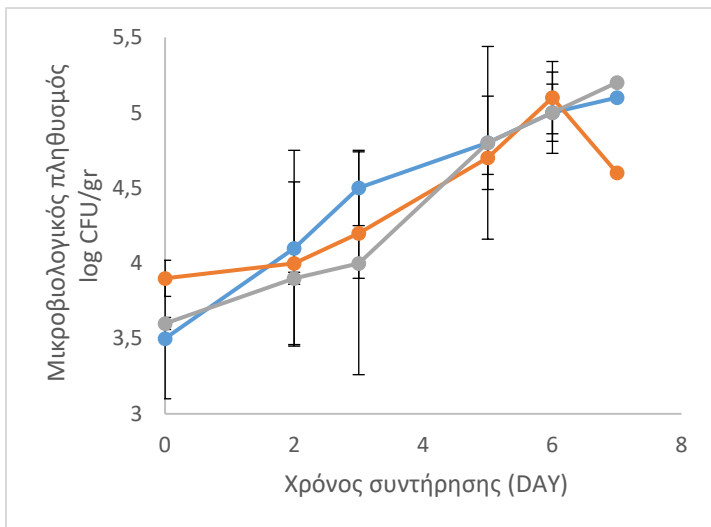
Διάγραμμα 3.8: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για το βακτήριο *Pseudomonas spp.* και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα (●), Υπερκείμενο (●)

➤ LAB



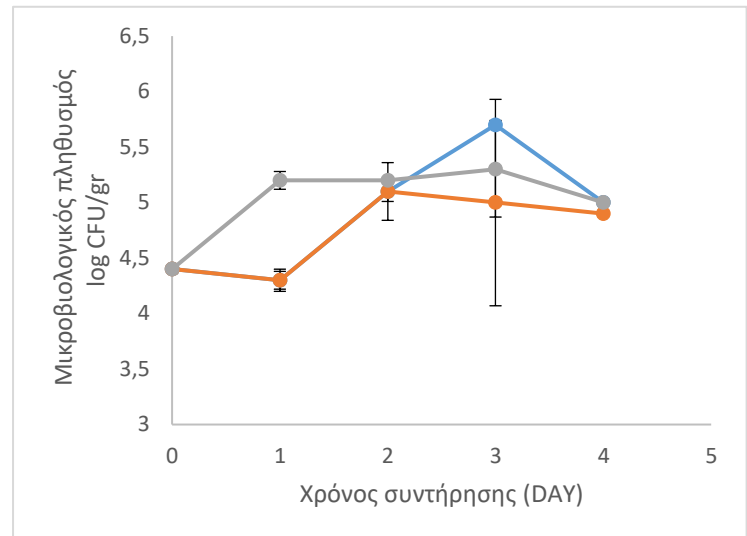
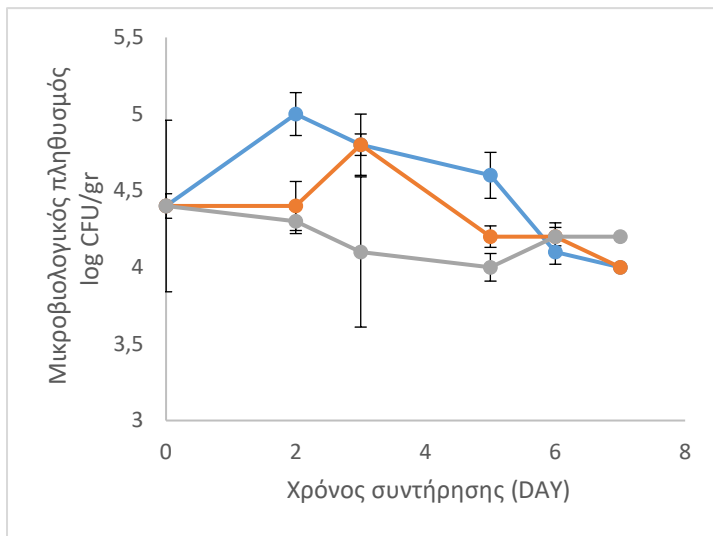
Διάγραμμα 3.9: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για LAB βακτήρια και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●),Βιομάζα(●),Υπερκείμενο(●)

➤ Enterobacteriaceae



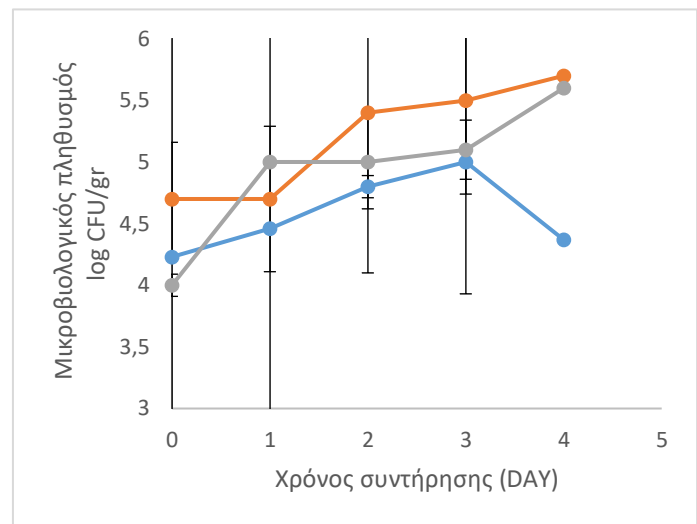
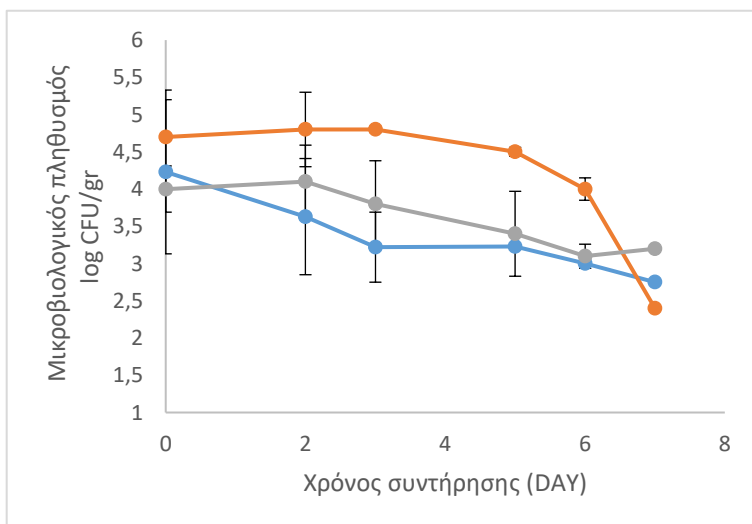
Διάγραμμα 3.10: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για Enterobacteriaceae και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●),Βιομάζα(●),Υπερκείμενο(●)

➤ Ζύμες/μύκητες



Διάγραμμα 3.11: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για ζύμες/ μύκητες και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα(●), Υπερκείμενο(●)

➤ *E. coli* O157:H7



Διάγραμμα 3.12: Μετρήσεις για την συντήρηση δειγμάτων ρόκας στους 4° C (α) και 10° C (β) για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 και στις τρεις περιπτώσεις Ζωμός (●), Βιομάζα(●), Υπερκείμενο(●)

Από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα φάνηκε ότι οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που κυριάρχησαν στην αλλοίωση των δειγμάτων ρόκας, υπό MAP συνθήκες ήταν αυτοί των ψευδομονάδων. Ύστερα ακολούθησαν οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς και των εντεροβακτηρίων και τέλος οι ζύμες-μύκητες. Η αρχική ολική μικροβιακή χλωρίδα της ρόκας ήταν  $10^6$  με  $10^7$  CFU/gr και για τους δύο κύκλους του πειράματος. Όσον αφορά τον 1<sup>ο</sup> κύκλο πειράματος παρατηρούνται τα εξής:

Οι ψευδομονάδες ως ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν και αυξάνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gill & Newton, 1978; Holzarpfel, 1998). Και στις τρεις περιπτώσεις του πειράματος κυριάρχησαν οι ψευδομονάδες στους 4<sup>ο</sup> C, σημειώνοντας μέγιστη αύξηση κατά την συντήρηση των δειγμάτων της ρόκας, όπου ο μικροβιακός τους πληθυσμός ξεκίνησε από 6,72 log CFU/gr και έφτασε μέχρι και 8,01 log CFU/gr για κάθε περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του ζωμού έφτασε στο 8,01, στην περίπτωση της βιομάζας στο 7,1 και στην περίπτωση του υπερκειμένου στο 7,63 log CFU/gr. Στους 10<sup>ο</sup> C παρατηρείται επίσης αύξηση των ψευδομονάδων αλλά σε πιο μικρό βαθμό. Εκτός από την θερμοκρασία βασικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση οξυγόνου. Οι ψευδομονάδες ως αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί αυξάνονται σε συνθήκες περίσσειας O<sub>2</sub> (Koutsoumanis et al. 2008). Σύμφωνα με μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί σε άγρια ρόκα συντηρημένη στους 4<sup>ο</sup> C σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης O<sub>2</sub> (5% O<sub>2</sub> και 10% CO<sub>2</sub>), παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των ψευδομονάδων δεν ξεπερνούσε τους 5 log CFU/gr. Αυτό μπορεί να οφείλεται πιθανότατα στην συγκέντρωση του O<sub>2</sub> αλλά και στην διαφορετική ποικιλία ρόκας (Martinez-Sanchez et. al., 2006).

Στην παρούσα μελέτη τα εντεροβακτήρια και τα οξυγαλακτικά βρεθήκαν σε χαμηλότερους πληθυσμούς από ότι οι ψευδομονάδες. Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά στους 4<sup>ο</sup> C δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη μεταβολή στον πληθυσμό ενώ στους 10<sup>ο</sup> C υπάρχει αύξηση του πληθυσμού, που είναι πιο αισθητή στις περιπτώσεις του ζωμού και του υπερκειμένου. Πιο συγκεκριμένα στο ζωμό ο πληθυσμός από 4,3 έφτασε στο 5,27 log CFU/gr και η αύξηση πραγματοποιήθηκε από την πρώτη κιόλας μέρα, στο υπερκείμενο από 4,45 έφτασε στο 6,13 log CFU/gr και η αύξηση άρχισε να

φαίνεται κατά την δεύτερη μέρα συντήρησης. Στην περίπτωση της βιομάζας η αύξηση και στις δύο θερμοκρασίες είναι πιο σταθερή. Τα εντεροβακτήρια παρουσίασαν αύξηση στους 10° C στην περίπτωση του ζυμού, όπου ξεκίνησε από 4,86 log CFU/gr και έφτασε στο 6,4 log CFU/gr και μειώθηκαν στους 4° C που από τον ίδιο αρχικό πληθυσμό έπεσαν σε 4,74 log CFU/gr. Στις άλλες δύο περιπτώσεις παρατηρείται επίσης, αύξηση στους 10° C και μείωση του φορτίου στους 4° C, με την διαφορά ότι η αυξομείωση έγινε σταδιακά.

Ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων μειώθηκε στην περίπτωση του ζυμού και στις δύο θερμοκρασίες. Στην περίπτωση του τεχνολογικού βακτηρίου (υπερκείμενο και βιομάζα) το μικροβιολογικό φορτίο αυξήθηκε στους 10° C, αντίθετα στους 4° C αυξήθηκε μόνο στην περίπτωση του υπερκειμένου ενώ μειώθηκε στην περίπτωση της βιομάζας.

Στον δεύτερο κύκλο του πειράματος, οι ψευδομονάδες έχουν πάλι τον κυρίαρχο ρόλο με μικρότερο όμως πληθυσμό από ότι στον πρώτο κύκλο. Ο μικροβιολογικός τους πληθυσμός ξεκινάει από 6,04 log CFU/gr στην περίπτωση του ζυμού και φτάνει στο 7,22 log CFU/gr στους 4° C, ενώ στην βιομάζα και στο υπερκείμενο ξεκινάει από 6,9 και 6,4 CFU/gr και φτάνει στο 6,3 και 6,5 log CFU/gr αντίστοιχα. Στο ζυμό είναι πιο μεγάλη η αύξηση, στο υπερκείμενο είναι πιο σταθερή η μεταβολή των ψευδομονάδων ενώ στην περίπτωση της βιομάζας παρατηρείται μια μικρή μείωση. Στην θερμοκρασία των 10° C παρατηρείται επίσης αύξηση και στις 3 περιπτώσεις με πιο σταθερό ρυθμό.

Τα εντεροβακτήρια αυξήθηκαν και στις τρεις περιπτώσεις και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης. Στην προκειμένη περίπτωση η θερμοκρασία δεν φαίνεται να επηρέασε τα αποτελέσματα, καθώς ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων βρίσκεται στα ίδια επίπεδα και στις δύο θερμοκρασίες.

Τα οξυγαλακτικά επίσης αυξήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις και τις θερμοκρασίες. Στην περίπτωση του ζυμού ο μικροβιακός πληθυσμός ξεκίνησε με 2,6 log CFU/gr και έφτασε στο 5,3 για τους 4° C και στο 5,9 log CFU/gr για τους 10° C. Στις περιπτώσεις του υπερκειμένου και της βιομάζας η αύξηση είναι πιο μεγάλη στους 10° C από ότι

στους 4° C, ειδικά στην περίπτωση του S ο πληθυσμός από 3,5 έφτασε στο 6,4 log CFU/gr.

Οι ζύμες- μύκητες αυξάνονται στους 10° C σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό και στις τρεις περιπτώσεις του πειράματος , ενώ στους 4° C μειώνονται με πιο σταθερό ρυθμό.

### 3.2 Μελέτη παθογόνων μικροοργανισμών

Στον πρώτο κύκλο του πειράματος παρατηρείται ότι ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* δεν έχει ελαττωθεί σε καμιά από τις τρεις περιπτώσεις, αλλά αυξάνεται πιο πολύ στους 10° C από ότι στους 4° C. Όπως φαίνεται και από τα γραφήματα η περίπτωση της βιομάζας του τεχνολογικού βακτηρίου σε θερμοκρασία συντήρησης 4° C είναι πιο δραστική σε σχέση με τις άλλες περιπτώσεις καθώς η ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού γίνεται με πιο αργό ρυθμό. Από τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι η ρόκα ενδέχεται να αποτελεί ένα φιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη αυτού του παθογόνου μικροοργανισμού (Skalina et al., 2010).

Τα αποτελέσματα για τον μικροοργανισμό *E.coli* O157:H7 διαφέρουν καθώς παρατηρείται μείωση στους 4° C. Πιο συγκεκριμένα, η περίπτωση της βιομάζας είχε πιο ισχυρή δράση κατά αυτού του μικροοργανισμού διότι ο αρχικός πληθυσμός έπεσε από 4,7 log CFU/gr στο 2,4 log CFU/gr. Παρατηρείται μείωση και κατά την περίπτωση του ζωμού λαχανικών όπου ο μικροβιακός πληθυσμός από το 4,23 log CFU/gr καταλήγει στο 2,75 log CFU/gr, καθώς και στην περίπτωση του υπερκειμένου αλλά σε μικρότερο βαθμό, αφού ο πληθυσμός των μικροβίων ελαττώνεται κατά 0,8 log CFU/gr διότι πέφτει από το 4 log CFU/gr στο 3,2 log CFU/gr. Στους 10° C πραγματοποιήθηκε αύξηση του φορτίου μικρότερη σε σύγκριση με τον 1° κύκλο του πειράματος. Εδώ η επίδραση του ζωμού έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού είναι πιο δραστική αφού ακόμα και στους 10° C η αύξηση είναι σχεδόν μηδαμινή, καθώς ο πληθυσμός από 4,23 έφτασε στο 4,37 log CFU/gr.

### 3.3 Αποτελέσματα μέτρησης pH

Οι μεταβολές στην τιμή του pH στην διάρκεια του χρόνου συντήρησης για τα δείγματα ρόκας, απεικονίζονται στους πίνακες 3.1 και 3.2 για το πείραμα 1 και στους πίνακες 3.3 και 3.4 για το πείραμα 2.

Πίνακας 3.1 : Μέσοι όροι τιμών pH και τυπική απόκλιση για *L. monocytogenes* στους 4°C

pH 4°C			
DAY	Ζωμός	Βιομάζα	Υπερκείμενο
0	6,15 ± 0,03	6,34 ± 0,49	6,02 ± 0,06
2	6,21 ± 0,05	6,15 ± 0,01	6,11 ± 0,01
3	6,57 ± 0,08	6,57 ± 0,01	6,58 ± 0,12
5	6,83 ± 0,01	6,84 ± 0,01	6,81 ± 0,15
6	7,1 ± 0,01	7,01 ± 0,03	7,07 ± 0,20

Πίνακας 3.2: Μέσοι όροι τιμών pH και τυπική απόκλιση για *L. monocytogenes* στους 10°C

pH 10°C			
DAY	Ζωμός	Βιομάζα	Υπερκείμενο
0	6,15 ± 0,03	6,34 ± 0,49	6,02 ± 0,06
1	6,34 ± 0,03	6,28 ± 0,02	6,47 ± 0,11
2	6,14 ± 0,03	6,08 ± 0,11	6,22 ± 0,18
3	6,71 ± 0,04	6,79 ± 0,05	6,84 ± 0,13
4	6,75 ± 0,06	6,68 ± 0,09	6,74 ± 0,10

Πίνακας 3.3: Μέσοι όροι τιμών pH και τυπική απόκλιση για *E.coli* στους 4°C

pH 4°C			
DAY	Ζωμός	Βιομάζα	Υπερκείμενο
0	6,15 ± 0,16	6,11 ± 0,07	6,18 ± 0,18
2	6,11 ± 0,16	6,16 ± 0,03	6,03 ± 0,08
3	6,09 ± 0,04	6,05 ± 0,04	6,14 ± 0,01
5	6,27 ± 0,04	6,39 ± 0,15	6,28 ± 0,04
6	6,28 ± 0,13	6,52 ± 0,01	6,35 ± 0,03
7	6,26 ± 0,18	6,34 ± 0,04	6,43 ± 0,08

Πίνακας 3.4: Μέσοι όροι τιμών pH και τυπική απόκλιση για *E.coli* στους 10°C

pH 10°C			
DAY	Ζωμός	Βιομάζα	Υπερκείμενο
0	6,15 ± 0,16	6,11 ± 0,07	6,18 ± 0,18
1	6,26 ± 0,13	6,18 ± 0,01	6,26 ± 0,03
2	6,32 ± 0,11	6,37 ± 0,01	6,52 ± 0,11
3	6,15 ± 0,04	6,27 ± 0,04	6,13 ± 0,03
4	6,17 ± 0,03	6,26 ± 0,06	6,19 ± 0,03

Η μέτρηση του pH (της οξύτητας) αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την μικροβιολογική και οργανοληπτική μελέτη ενός τροφίμου, διότι μπορεί να επηρεάσει την γεύση, καθώς και την ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Πιο

συγκεκριμένα, όσο μικρότερο είναι το pH ενός τροφίμου (όξινο pH), τόσο λιγότερες πιθανότητες έχει να αλλοιωθεί από μικροοργανισμούς (Tournas, 2005, 2006). Οι μικροοργανισμοί που επηρεάζονται από την οξύτητα είναι τα βακτήρια και οι μύκητες, με τα βακτήρια να θεωρούνται πιο ευαίσθητα στις μεταβολές του pH (Jay, 2005).

Σύμφωνα με τους Πίνακες 3.1, 3.2, 3.3 και 3.4 παρατηρούμε ότι το pH αυξήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις του πειράματος κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων ρόκας στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση του pH στο 1<sup>ο</sup> κύκλο του πειράματος είναι πιο μεγάλη στους 4<sup>ο</sup> C από ότι στους 10<sup>ο</sup> C, αφού στην πρώτη θερμοκρασία έφτασε μέχρι και 7,1 ενώ στους 10<sup>ο</sup> C έφτασε μέχρι την τιμή 6,75. Στο 2<sup>ο</sup> κύκλο του πειράματος το pH επίσης αυξήθηκε αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό, παρουσιάζοντας σχετικά πολύ μικρές μεταβολές.

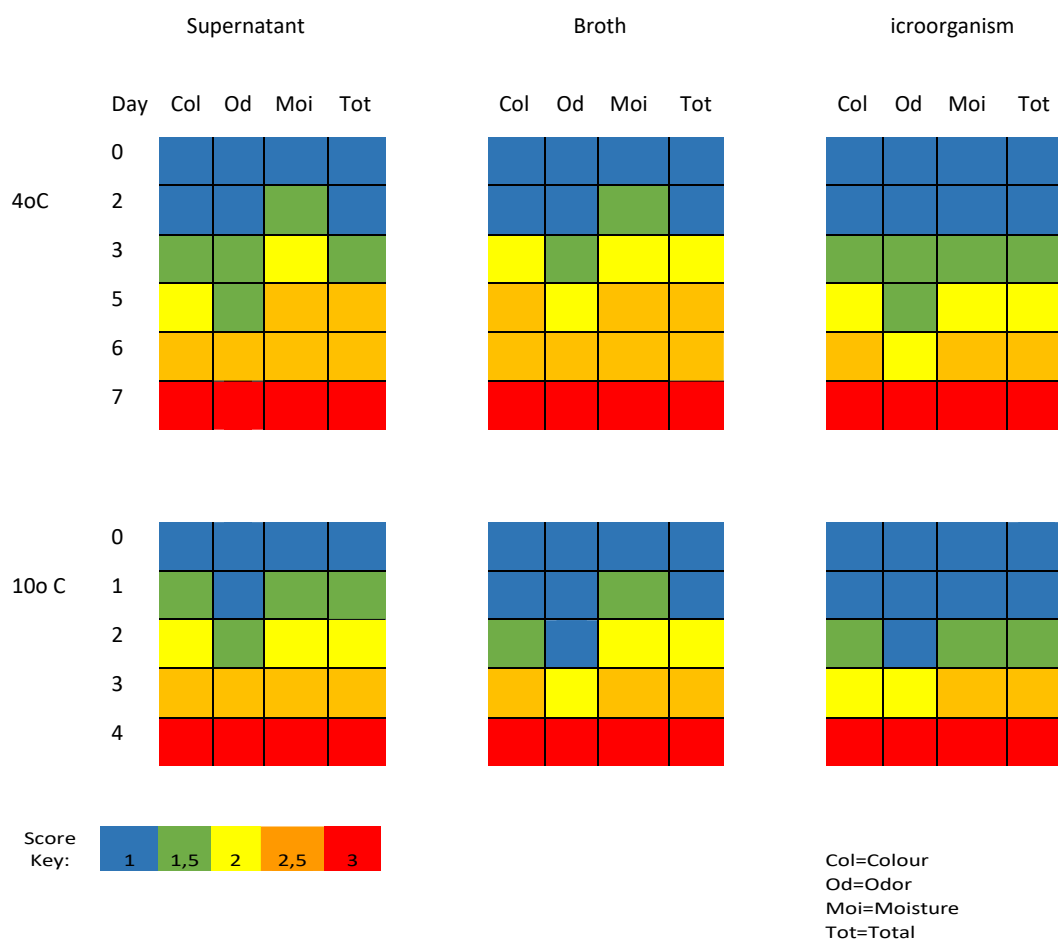
Γενικά, η αύξηση στην τιμή του pH θα μπορούσε να οφείλεται στην δραστηριότητα του κυρίαρχου αλλοιογόνου μικροοργανισμού που επικρατεί στα δείγματα ρόκας. Ο μικροοργανισμός αυτός σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα είναι η *pseudomonas* spp., όπου παράγει μεταβολίτες, όπως αμμωνία, σουλφίδια και αμίνες που ευθύνονται για την άνοδο του pH (Ellis & Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007).

### 3.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου

Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιούνταν έλεγχος της εμφάνισης (χρώμα, υγρασία), καθώς και του αρώματος των δειγμάτων ρόκας. Στα παρακάτω γραφήματα 3.13 -3.14 παρουσιάζεται η οργανοληπτική αξιολόγηση για το 1<sup>ο</sup> και 2<sup>ο</sup> κύκλο του πειράματος, αντίστοιχα. Όπως έχει προαναφερθεί, τα δείγματα με βαθμολογία 1 με 1,5 ορίστηκαν ως φρέσκα και αποδεκτά διότι δεν εμφάνιζαν αλλοιωμένα χαρακτηριστικά (βαθμολογία 1) ή αν εμφάνιζαν ήταν σε πολύ αρχικό στάδιο το οποίο θεωρούνταν αποδεκτό (βαθμολογία 1,5). Τα δείγματα με βαθμολογία 2 ως οριακά αποδεκτά καθώς είχαν αλλοιωθεί περισσότερο από τα φρέσκα αλλά ήταν σε θέση να καταναλωθούν και τέλος με βαθμολογία >2 ορίστηκαν ως μη αποδεκτά τα δείγματα που παρουσίαζαν δυσάρεστη μυρωδιά και μη ελκυστική εμφάνιση. Στο πείραμα παρατηρήθηκε ότι η αλλοίωση στους 10<sup>ο</sup>C ήταν πιο έντονη



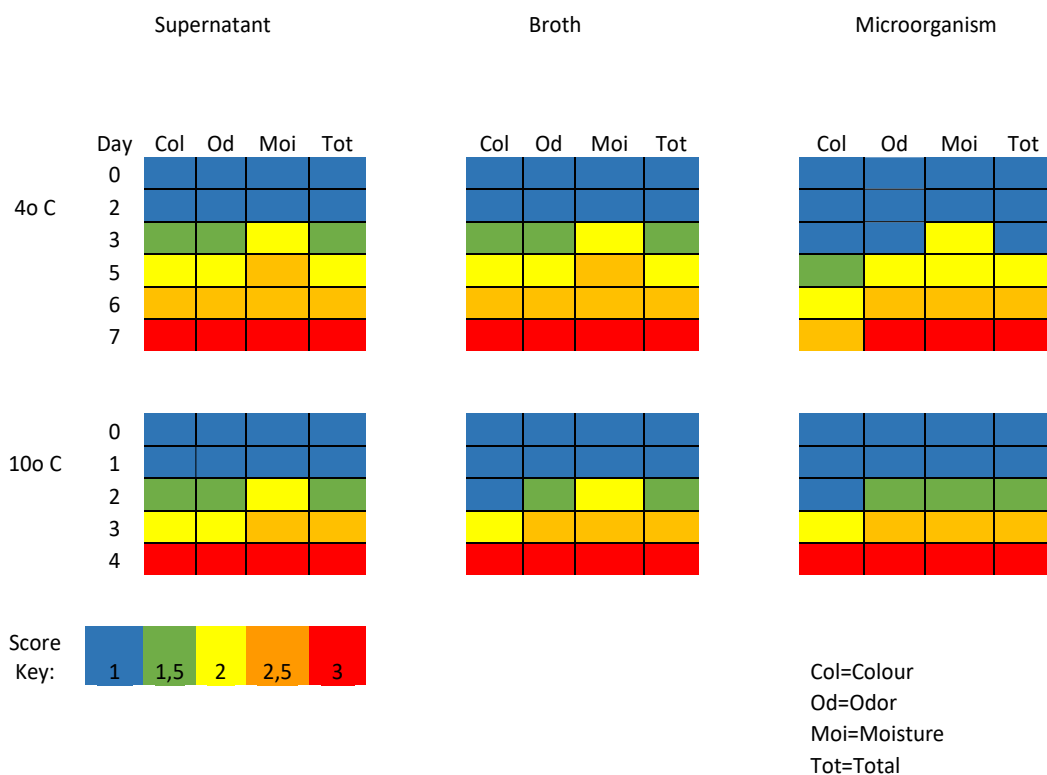
και ταχεία σε σύγκριση με τους 4°C , με αποτέλεσμα να αποδεικνύεται ότι η θερμοκρασία επηρεάζει ως ένα βαθμό την αλλοίωση των τροφίμων. Στα αλλοιωμένα δείγματα, παρατηρούνταν έντονη μυρωδιά, απελευθέρωση υγρών (υγρασία) καθώς και μαύρισμα των φύλλων.



Διάγραμμα 3.13: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων ρόκας (1<sup>ο</sup> πείραμα) σε θερμοκρασίες συντήρησης 4 και 10° C.

Κατά τον 1<sup>ο</sup> κύκλο, τα δείγματα των 10°C που είχαν ψεκαστεί με το υπερκείμενο του τεχνολογικού βακτηρίου αλλοιώθηκαν πρώτα καθώς εμφάνισαν πιο γρήγορα μαύρα φύλλα και υγρασία. Την πρώτη μέρα παρατηρήθηκε μια μικρή αλλαγή χρώματος σε κάποια φύλλα των δειγμάτων ρόκας καθώς και υγρασία, η οποία δεν ήταν έντονη για αυτό και τα δείγματα αυτά βαθμολογήθηκαν με 1,5. Την δεύτερη μέρα η αλλοίωση της εμφάνισης ήταν πιο έντονη αλλά αποδεκτή και ξεκίνησε να αλλάζει και η μυρωδιά των δειγμάτων. Τις δύο τελευταίες μέρες η αλλοίωση των παραπάνω χαρακτηριστικών ήταν ακόμα πιο έντονη και μη αποδεκτή, με την υγρασία να

αποτελεί το πιο σημαντικό παράγοντα της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου. Ύστερα ακολούθησε η περίπτωση με τον ζωμό, όπου ξεκίνησε η αλλοίωση από την πρώτη κιόλας μέρα, με την εμφάνιση της υγρασίας σε αποδεκτό βαθμό. Την δεύτερη μέρα άλλαξε το χρώμα των φύλλων και την επόμενη τα δείγματα απέκτησαν πιο έντονη μυρωδιά. Τέλος, τα δείγματα με την βιομάζα του τεχνολογικού βακτηρίου άργησαν να αλλοιωθούν έχοντας την λιγότερη υγρασία. Πιο συγκεκριμένα, η εμφάνιση των αλλοιωμένων χαρακτηριστικών ξεκίνησε την δεύτερη μέρα όπου χαρακτηρίστηκε ως αποδεκτή, ενώ στις προηγούμενες δύο περιπτώσεις η αλλοίωση έκανε την εμφάνιση της από την πρώτη κιόλας μέρα. Όσον αφορά τους 4°C, η αλλοίωση στις περιπτώσεις με το υπερκείμενο και το ζωμό πραγματοποιήθηκε πολύ πιο γρήγορα (πέμπτη μέρα) σε σύγκριση με την περίπτωση της βιομάζας, καθώς η τελευταία χαρακτηρίστηκε ως μη αποδεκτή την έκτη μέρα. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις η αλλοίωση ξεκίνησε από την δεύτερη μέρα με την εμφάνιση της υγρασίας σε αποδεκτό επίπεδο, ενώ στην περίπτωση της βιομάζας τα αλλοιωμένα χαρακτηριστικά έκαναν την εμφάνιση τους την τρίτη μέρα.



Διάγραμμα 3.14: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων ρόκας (2<sup>ο</sup> πείραμα) σε θερμοκρασίες συντήρησης 4 και 10° C.

Τα δείγματα του δεύτερου πειράματος ήταν πολύ καλύτερα οργανοληπτικά σε σύγκριση με το 1<sup>ο</sup> πείραμα, με την βιομάζα να δίνει το καλύτερο αποτέλεσμα. Στους 4°C, στις περιπτώσεις του ζυμού και του υπερκειμένου, τα δείγματα χαρακτηρίζονται ως μη αποδεκτά κατά την έκτη μέρα με την υγρασία να εμφανίζεται πιο έντονα από την προηγούμενη μέρα. Όσον αφορά την περίπτωση της βιομάζας, τα δείγματα χαρακτηρίζονται ως φρέσκα μέχρι και την τρίτη μέρα και ως μη αποδεκτά την έκτη μέρα, χωρίς να έχει επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό το χρώμα των φύλλων. Στους 10°C, και στις τρεις περιπτώσεις τα δείγματα θεωρούνται ως μη αποδεκτά κατά τρίτη μέρα με την υγρασία να αξιολογείται ως οριακά αποδεκτή από την δεύτερη μέρα στις περιπτώσεις του ζυμού και του υπερκειμένου, σε αντίθεση με την περίπτωση της βιομάζας όπου την ίδια μέρα η υγρασία χαρακτηρίστηκε ως αποδεκτή.

### *3.5 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων*

#### *3.5.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR)*

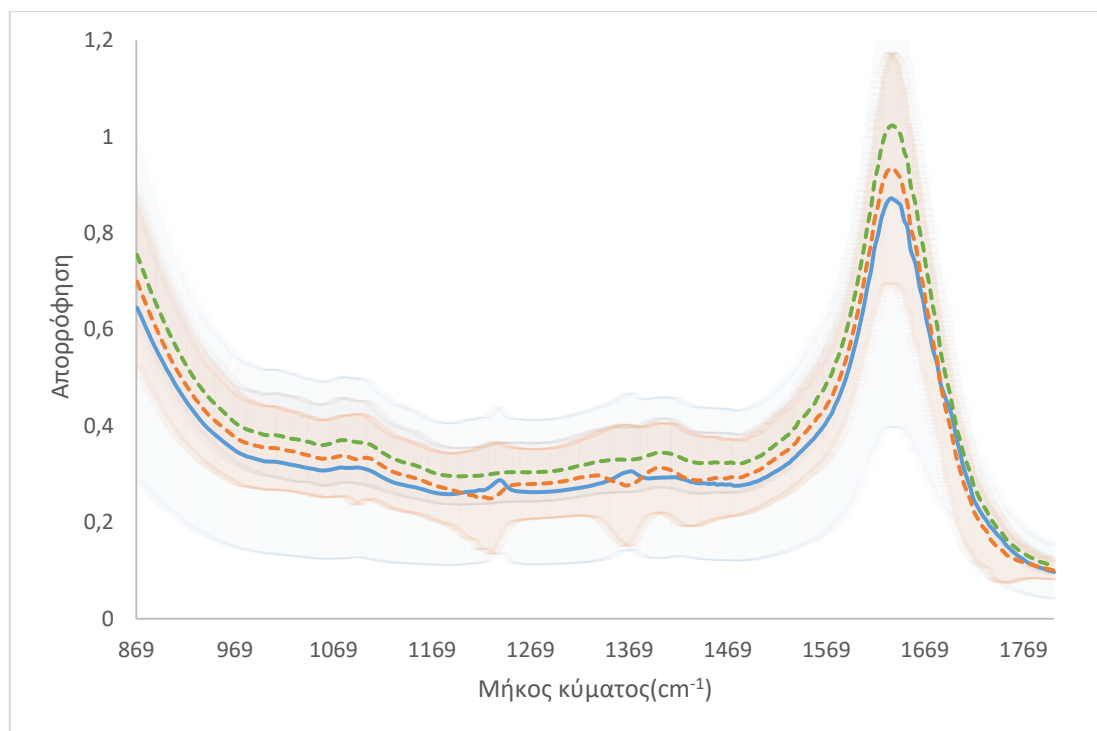
Η ανάλυση FTIR γίνεται στην περιοχή  $4000\text{ cm}^{-1}$  έως  $400\text{ cm}^{-1}$  (μέσο υπέρυθρο), διότι σε αυτό το φάσμα γίνεται η απορρόφηση της ακτινοβολίας με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται τα δονούμενα μόρια, δίνοντας βασικές πληροφορίες (Βαλαβανίδης 2006). Με την φασματοσκοπία FTIR εμφανίζονται κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές, μέσα από τις οποίες μελετάται η αλλοίωση του τροφίμου προσδιορίζοντας τις βιοχημικές του αλλαγές (Ellis et al., 2004). Στην συγκεκριμένη εργασία, από τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν, μελετήθηκε η περιοχή μεταξύ  $1800\text{ cm}^{-1}$  έως  $870\text{ cm}^{-1}$  (Al-Jowder et al., 1999; Ellis et al., 2002; Di Egidio et al., 2009). Κάποιες από τις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης της περιοχής αυτής είναι γύρω στο  $1740\text{ cm}^{-1}$  που αφορά τα λιπαρά οξέα καθώς και οι κορυφές γύρω στα  $1650\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε δονήσεις αμιδίου I και II, καθώς και σε πρωτεΐνες ή πεπτίδια. Επιπλέον, οι κορυφές μεταξύ  $1200\text{--}870\text{ cm}^{-1}$  προέρχονται από τις δονήσεις σακχάρων (Lin et al., 2009). Τέλος, το εύρος των κορυφών μεταξύ  $1200\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  αντιπροσωπεύει τις δονήσεις των μορίων που αποτελούνται από άτομα υδρογόνου, όπως CCH, HCH, COH και HCO. Πιο συγκεκριμένα, από διάφορες έρευνες φαίνεται ότι οι περισσότερες κορυφές σε αυτό το εύρος εντοπίζονται κυρίως στις εξής περιοχές:  $1315\text{ cm}^{-1}$   $1369\text{ cm}^{-1}$  και  $1415\text{ cm}^{-1}$  (Hamidabadi Sherani et al., 2017).

Μια λεπτομερής περιγραφή των πιο αντιπροσωπευτικών περιοχών του φάσματος FTIR παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3.5: Περιγραφή αντιπροσωπευτικών περιοχών του φάσματος FTIR

FTIR περιοχή φάσματος (cm <sup>-1</sup> )	Ομάδες	Περιγραφή	Αναφορά
1200- 870 cm <sup>-1</sup>	(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Δονήσεις σακχάρων (γλυκόζη)	(Lin et al., 2009)
1200-1500 cm <sup>-1</sup>	CCH HCH COH HCO	Δονήσεις των μορίων που αποτελούνται από άτομα υδρογόνου	(Hamidabadi Sherani et al., 2017)
1650-1550 cm <sup>-1</sup>	Αμίδιο I και II, Πρωτεΐνες-Πεπτίδια	Δονήσεις αμιδίου I και II πρωτεΐνες ή πεπτίδια	(Lin et al., 2009)
1740 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COOH	Λιπαρά οξέα	(Lin et al., 2009)

Στο παρακάτω Διάγραμμα 3.15 φαίνονται οι κορυφές που δόθηκαν από τα φάσματα. Η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί στο φρέσκο και για τις δύο θερμοκρασίες, ενώ η πράσινη και η πορτοκαλί στο αλλοιωμένο για τους 4 και 10° C, αντίστοιχα. Σύμφωνα και με τον πίνακα 3.5 παρατηρήθηκε ότι η κοινή κορυφή στο 1069 cm<sup>-1</sup> και για τις τρεις καμπύλες, σχετίζεται με σάκχαρα και συγκεκριμένα με τους υδατάνθρακες οι οποίοι παράγονται κατά την διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Κατά την φωτοσύνθεση τα φυτά μετατρέπουν το νερό και το CO<sub>2</sub> που χρησιμοποιούν σε οξυγόνο και υδατάνθρακες με την βοήθεια του ήλιου. Η πιο απλή μορφή των υδατανθράκων που υπάρχει στα φυτικά προϊόντα είναι η γλυκόζη, η οποία είναι βασική πηγή ενέργειας για τον άνθρωπο (Lambers et al., 2019). Οι κορυφές γύρω στο 1230 cm<sup>-1</sup> και στο 1369 cm<sup>-1</sup> σχετίζονται με μόρια που αποτελούνται από άτομα υδρογόνου, όπως CCH, HCH, COH, HCO. Τέλος, οι υψηλές κορυφές στην περιοχή 1648 cm<sup>-1</sup> σχετίζονται με δονήσεις αμιδίου I και II, καθώς και με πρωτεΐνες.



Διάγραμμα 3.15: Διάγραμμα των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων φασμάτων FTIR φρέσκων (—) και αλλοιωμένων δειγμάτων ρόκας σε θερμοκρασίες συντήρησης 4° C (—) και 10° C (—).

### 3.5.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα MSI

Μέσω της πολυφασματικής απεικόνισης πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της ποιότητας των δειγμάτων της ρόκας και πιο συγκεκριμένα του χρώματος και της υφής, τα οποία είναι σημαντικά χαρακτηριστικά για την αντίληψη της φρεσκάδας (Løkke et al., 2012). Κατά την συντήρηση των λαχανικών σε υψηλές θερμοκρασίες και σε μεγάλες συγκεντρώσεις οξυγόνου, οι πράσινες χρωστικές της χλωροφύλλης οξειδώνονται σε άχρωμες ουσίες αποκαλύπτοντας τα κίτρινα καροτενοειδή (Toivonen and Brummell, 2008). Σύμφωνα με τους Lokke et al., (2013) το MSI καταγράφει εικόνες εντός του φάσματος 405-850nm, πιο συγκεκριμένα στα 400-500nm περιλαμβάνεται η ανίχνευση των καροτενοειδών, στα 470-700nm το κιτρίνισμα των φύλλων και στα 780-850nm εμφανίζονται σταγόνες υγρασίας πάνω στα φύλλα και αλλαγές στην υφή.

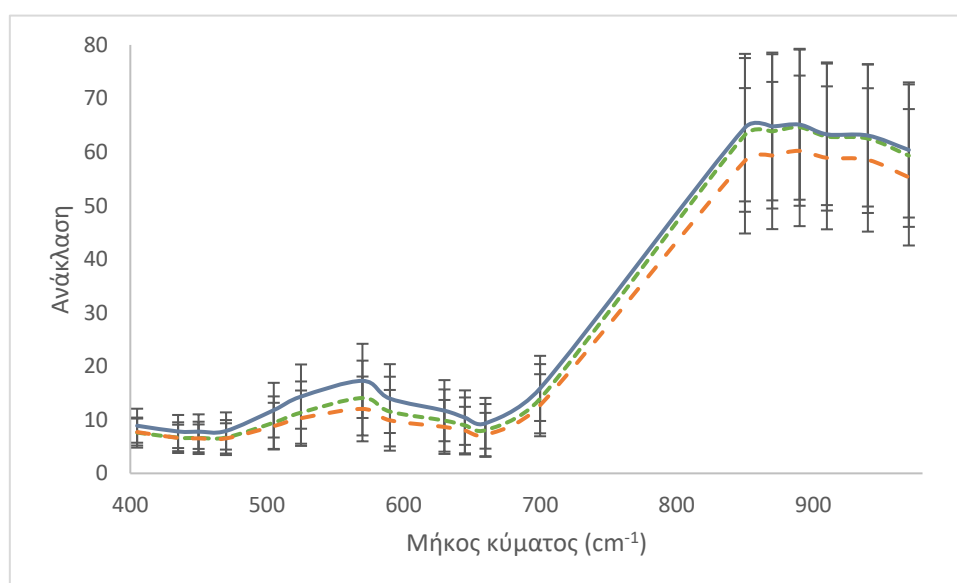
Μια λεπτομερής περιγραφή των πιο αντιπροσωπευτικών περιοχών του φάσματος MSI παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (Lokke et al., 2013).

Πίνακας 3.6: Περιγραφή αντιπροσωπευτικών περιοχών του φάσματος MSI

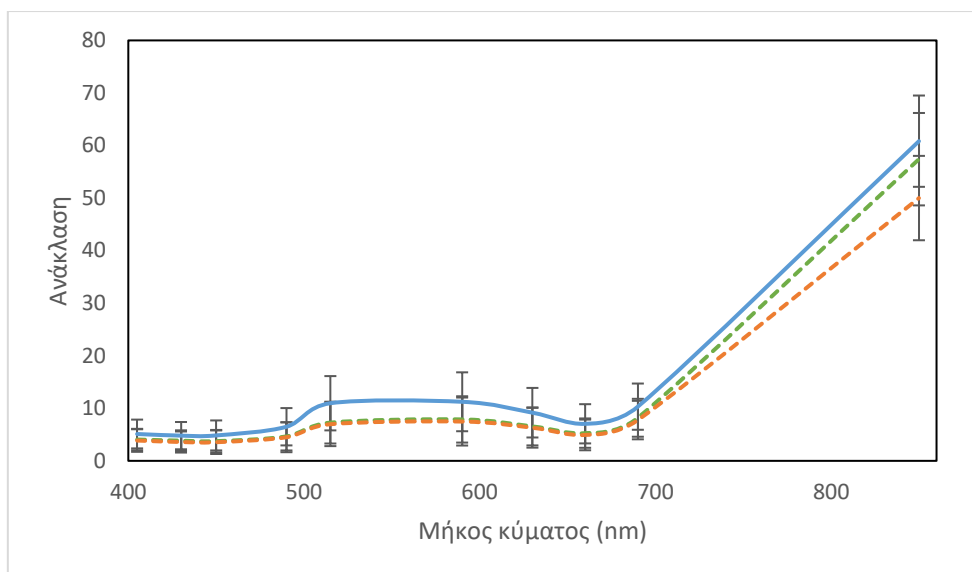
MSI περιοχή φάσματος (nm)	Περιγραφή	Αναφορά
400-500nm	περιοχή ανίχνευσης καρροτενοειδών	Lokke et al., (2013)
470-700nm	περιοχή κιτρίνισματος των φύλλων	Lokke et al., (2013)
780-940nm	εμφανίζονται σταγόνες υγρασίας πάνω στα φύλλα και αλλαγές στην υφή	Lokke et al., (2013)

Στα ακόλουθα Διαγράμματα 3.16 και 3.17 δίνονται τα φάσματα των φρέσκων και αλλοιωμένων δειγμάτων του VideometerLab και του VideometerLite, αντίστοιχα. Η μπλε καμπύλη είναι το φρέσκο και αντιστοιχεί και στις δύο θερμοκρασίες, ενώ η πράσινη και η πορτοκαλί είναι το αλλοιωμένο των 4 και 10° C, αντίστοιχα.

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον πίνακα 3.6 και με το διάγραμμα 3.16 του VideometerLab οι κορυφές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και σχετίζονται με την αλλοίωση είναι γύρω στο 570  $\text{cm}^{-1}$  (κιτρίνισμα των φύλλων) και στο 850  $\text{cm}^{-1}$  που εμφανίζεται υγρασία και αλλαγές στην υφή. Ενώ στο VideometerLite (διάγραμμα 3.17), ξεκινάει να εμφανίζεται η καμπύλη γύρω στο 510  $\text{cm}^{-1}$  (κιτρίνισμα των φύλλων) φτάνοντας γύρω στο 700 όπου από εκεί και ύστερα αυξάνεται εκθετικά (εμφάνιση υγρασίας).



Διάγραμμα 3.16: Διάγραμμα των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων φασμάτων του VideometerLab φρέσκων (—) και αλλοιωμένων δειγμάτων ρόκας σε θερμοκρασίες συντήρησης 4° C (—) και 10° C (—).



Διάγραμμα 3.17: Διάγραμμα των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων φασμάτων του VideometerLite φρέσκων (—) και αλλοιωμένων δειγμάτων ρόκας σε θερμοκρασίες συντήρησης 4° C (—) και 10° C (—).

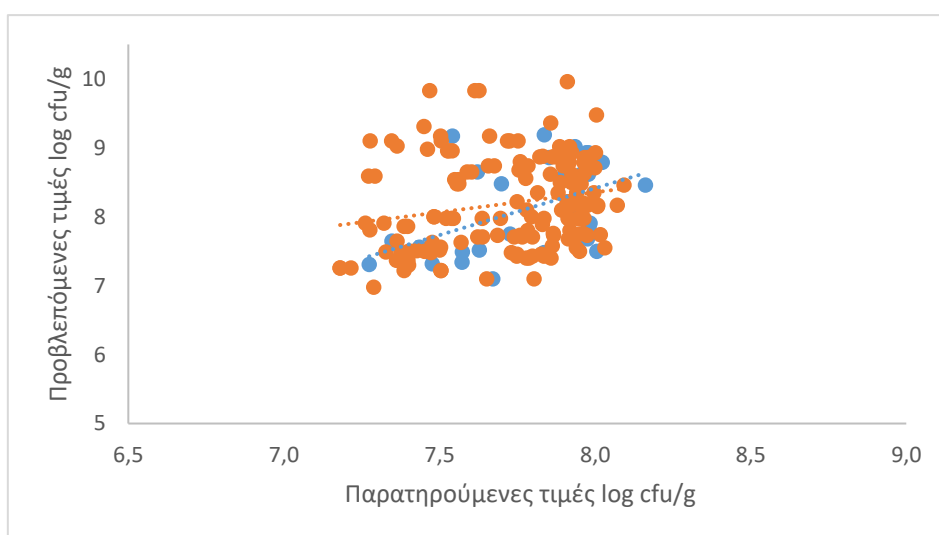
### 3.5.3 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο PLS-R

#### 3.5.3.1 FTIR

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.7) δίνονται οι δείκτες για την απόδοση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού της OMX με τα δεδομένα του FTIR για την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι δεν υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση με τα μικροβιολογικά, καθώς το  $R^2$  και RMSE για την πρόβλεψη είναι 0,04 και 0,61 αντίστοιχα. Αυτός ο συνδυασμός τιμών έχει χαμηλή επίδοση διότι σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Otto et al., 2018) το RMSE πρέπει να είναι μικρό, καθώς μια τιμή πιο κοντά στο μηδέν δηλώνει την τέλεια προσαρμογή στα δεδομένα. Αντίθετα, το  $R^2$  θα πρέπει να έχει μεγαλύτερες τιμές πιο κοντά στο 1 (Shmueli et al., 2011), κάτι που δεν επιτεύχθηκε όπως φαίνεται στα παρακάτω αποτελέσματα. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και με το διάγραμμα 3.18, στο οποίο συσχετίζονται τα αποτελέσματα αυτά με την ευθεία  $y = ax + \beta$  όπου  $\alpha$  = κλίση και  $\beta$  = σταθερός όρος.

Πίνακας 3.7: Αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του FTIR

Όργανο	Δεδομένα	Slope	Offset	R <sup>2</sup>	RMSE
FTIR 6200 JASCO	Ανάπτυξη (n=96)	1,27	- 2,11	0,13	0,67
	Επικύρωση CV	1,36	- 2,98	0,16	0,6
	Πρόβλεψη (n=39)	0,58	3,22	0,04	0,61



Διάγραμμα 3.18: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το FTIR 6200 JASCO

Όσον αφορά λοιπόν τις επιδόσεις του μοντέλου για τα φασματικά δεδομένα του FTIR δεν ήταν τόσο ικανοποιητικές, καθώς η τιμή του συντελεστή R<sup>2</sup> ήταν αρκετά χαμηλή. Συνολικά, φαίνεται και από το Διάγραμμα 3.18 πως η μέθοδος PLS-R δεν έδωσε καλά αποτελέσματα. Σε αντίστοιχες μελέτες που πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή του PLS-R σε δεδομένα FTIR, όπως στην μελέτη των Manthou et al. (2021) σε δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών (RTE) με ρόκα και σπανάκι, τα αποτελέσματα για τα δείγματα ρόκας δεν ήταν εξίσου ικανοποιητικά, διότι το R<sup>2</sup> είχε τιμή 0,41 ενώ το RMSE είχε τιμή 0,82. Στην συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε ότι η μέθοδος PLS-R δεν είναι τόσο αποτελεσματική για τα δεδομένα του FTIR. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο



μικρό εύρος τιμών της OMX καθώς και στην φύση του τροφίμου, όπου λόγω των φύλλων του δεν ήταν εύκολο να παραμείνει σε επαφή με τον κρύσταλλο.

Παρόλο που η μέθοδος δεν είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα στο παρών πείραμα, έχει αποδειχτεί ότι είναι αποτελεσματική σε άλλα τρόφιμα όπως το κρέας και το ψάρι. Πιο συγκεκριμένα, στην μελέτη των Fengou et al., (2019) που έγινε σε δείγματα τσιπούρας το  $R^2$  είχε τιμή 0,73. Ενώ και στην έρευνα του Μυρίση (2022), όπου χρησιμοποίησε την μέθοδο PLS-R σε δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος, το μοντέλο είχε καλή επίδοση με το  $R^2$  να έχει τιμή 0,77.

### 3.5.3.2 MSI

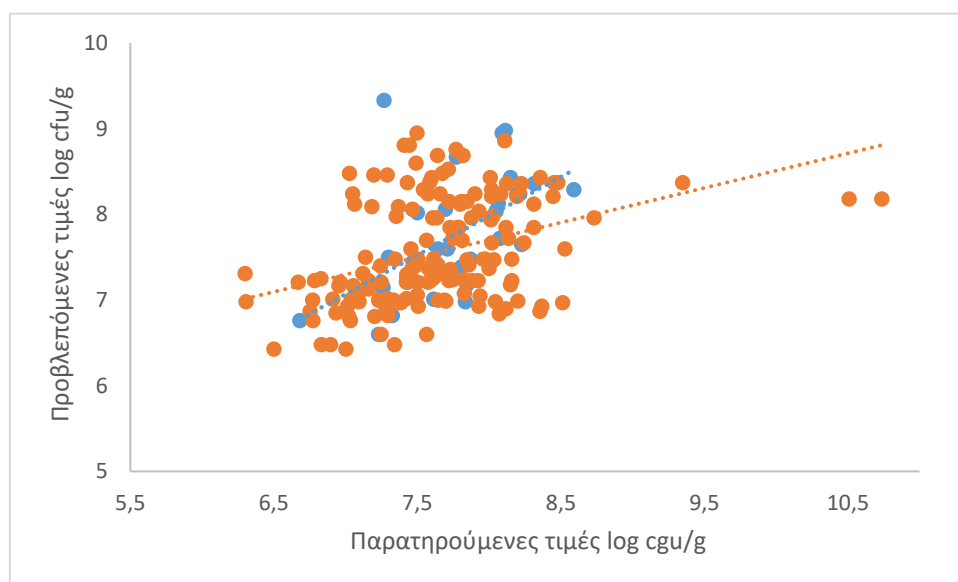
Για την αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού της OMX, παρατίθενται στους παρακάτω Πίνακες 3.8 και 3.9 οι δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη. Στο VideometerLab ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  για την πρόβλεψη είναι 0,049 και συνδυαστικά με το RMSE που είναι 0,57 δείχνει ότι τα δεδομένα από την πολυφασματική απεικόνιση δεν συσχετίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX. Το ίδιο ισχύει και για το VideometerLite, καθώς το  $R^2$  για την πρόβλεψη είναι 0,4 και το RMSE 0,55, συνδυασμός που δεν δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται και στα διαγράμματα συσχέτισης επικύρωσης και πρόβλεψης 3.19 και 3.20 για το VideometerLab και VideometerLite, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.8: Αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του VideometerLab

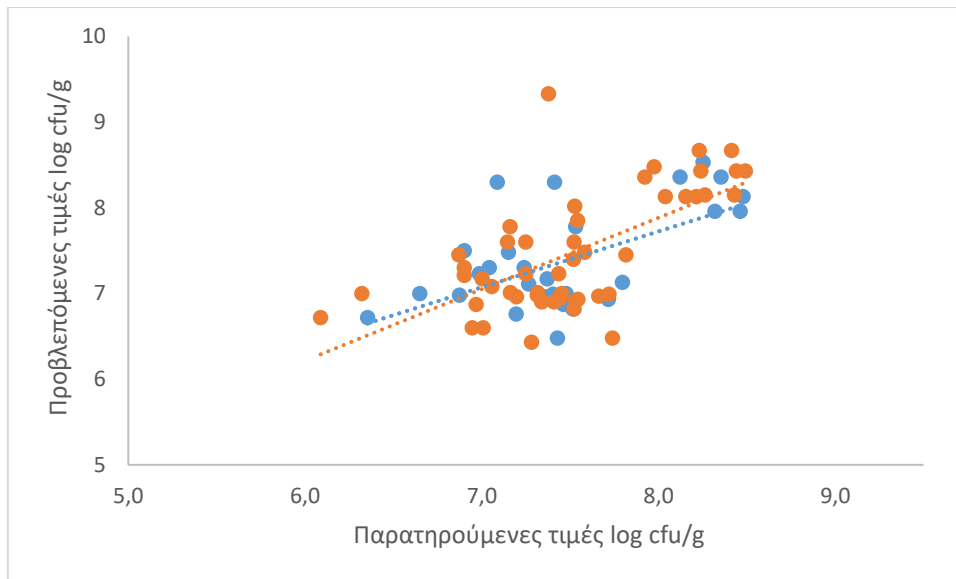
Όργανο	Δεδομένα	Slope	Offset	$R^2$	RMSE
Vmlab	Ανάπτυξη (n=86)	0,97	0,22	0,4	0,55
	Επικύρωση CV	0,91	0,68	0,29	0,59
	Πρόβλεψη (n=35)	0,4	4,47	0,049	0,57

Πίνακας 3.9: Αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του VideometerLite

Όργανο	Δεδομένα	Slope	Offset	R <sup>2</sup>	RMSE
vmlite	Ανάπτυξη (n=86)	1,04	- 0,38	0,45	0,51
	Επικύρωση CV	0,65	2,52	0,22	0,51
	Πρόβλεψη (n=35)	0,83	1,21	0,4	0,55



Διάγραμμα 3.19: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το VideometerLab



Διάγραμμα 3.20: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το VideometerLite

Τα μοντέλα της OMX με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) ήταν λίγο καλύτερα για το VideometerLite παρά για το VideometerLab, καθώς το πρώτο είχε μεγαλύτερο  $R^2$  με τιμή 0,4. Παρόλα αυτά και εδώ δεν είχαμε ικανοποιητικά αποτελέσματα διότι το  $R^2$  ήταν σχετικά μικρό και στα δύο όργανα. Επίσης, η τιμή του RMSE ήταν μικρότερη (0,55) από ότι ήταν στο FTIR (0,61). Σύμφωνα με την μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Manthou et al. (2021) σε δείγματα ρόκας, οι τιμές των συντελεστών  $R^2$  και RMSE ήταν 0,61 και 0,81, αντίστοιχα. Η βιβλιογραφία για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής σε προϊόντα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών και συγκεκριμένα σε δείγματα ρόκας είναι περιορισμένη, όμως έχει αποδειχτεί ότι είναι αποτελεσματική σε άλλα τρόφιμα όπως το κρέας. Πιο συγκεκριμένα, στην μελέτη του Τσέκο (2022) που έγινε σε δείγματα φιλέτο κοτόπουλου το  $R^2$  είχε τιμή 0,87. Ενώ και στην έρευνα του Μυρίση (2022), όπου χρησιμοποίησε την μέθοδο PLS-R σε δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος συντηρημένα σε MAP συνθήκες, το μοντέλο είχε καλή επίδοση με το  $R^2$  να έχει τιμή 0,84. Συμπερασματικά, η μη ικανοποιητική επίδοση του μοντέλου για τα δεδομένα της MSI μπορεί να οφείλεται στο μικρό εύρος τιμών της OMX. Παρόλα αυτά θα είχε ενδιαφέρον να υπάρχει πρόβλεψη σε επιμέρους παράγοντες όπως για παράδειγμα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.

#### 4. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις το βιοπροστατευτικό στέλεχος που χρησιμοποιήσαμε δεν έφερε θετικά αποτελέσματα, καθώς δεν μειώθηκε ο μικροβιακός πληθυσμός. Πιο συγκεκριμένα στον 1<sup>ο</sup> κύκλο του πειράματος, οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί αυξήθηκαν με τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp να αποτελούν τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς αλλοίωσης. Ύστερα ακολούθησαν τα οξυγαλακτικά και τα εντεροβακτήρια με μικρότερους πληθυσμούς, αλλά χωρίς να έχουν μειωθεί σε καμία από τις θερμοκρασίες συντήρησης. Το ίδιο συμβαίνει και με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, η οποία αυξήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις του πειράματος (ζωμός, υπερκείμενο, βιομάζα) με την βιομάζα να δίνει καλύτερα αποτελέσματα στους 4<sup>ο</sup> C, καθώς η αύξηση έγινε σε μικρότερο βαθμό.

Όσον αφορά τον 2<sup>ο</sup> κύκλο του πειράματος, υπήρξε και εδώ αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού σε όλα τα βακτήρια αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι στον 1<sup>ο</sup> κύκλο. Στην περίπτωση της *E. coli*, παρατηρήθηκε μείωση στους 4<sup>ο</sup> C κοντά στα 2 log CFU/gr αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι ο πληθυσμός του συγκεκριμένου μικροοργανισμού μειώνεται απότομα σε θερμοκρασία ψυγείου (Mengyi Dong et al., 2024). Στους 10<sup>ο</sup>C, ο πληθυσμός αυξήθηκε με τον ζωμό να δίνει την μικρότερη αύξηση σε σχέση με τις άλλες δύο περιπτώσεις.

Οργανοληπτικά, ο *Lactiplantibacillus pentosus* επιμήκυνε την διάρκεια ζωής των δειγμάτων της ρόκας στην περίπτωση της βιομάζας. Και στους δύο κύκλους του πειράματος, η βιομάζα του τεχνολογικού βακτηρίου καθυστέρησε κατά μια μέρα την αλλοίωση σε σχέση με τις άλλες δύο περιπτώσεις. Η θερμοκρασία έπαιξε επίσης σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των δειγμάτων όπου στους 10<sup>ο</sup>C τα δείγματα αλλοιώθηκαν πιο γρήγορα από ότι στους 4<sup>ο</sup> C. Ο κύριος παράγοντας αλλοίωσης ήταν η υγρασία, η οποία επηρέαζε την φρεσκάδα των φύλλων και ύστερα η αλλαγή στο χρώμα και η δυσάρεστη μυρωδιά.

Το pH αυξήθηκε κατά την συντήρηση των δειγμάτων και στις δύο θερμοκρασίες, κάτι που οφείλεται στην δραστηριότητα των κυρίαρχων αλλοιογόνων μικροοργανισμών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το pH δεν είχε μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες αποδεικνύοντας ότι δεν επηρεάζεται τόσο από αυτόν τον παράγοντα.

Τα αποτελέσματα από την φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), δεν ήταν ικανοποιητικά για το μοντέλο πρόβλεψης της OMX. Συγκεκριμένα, οι δείκτες απόδοσης δεν ήταν καλοί με τις τιμές για  $R^2$  και RMSE να είναι 0,04 και 0,61 αντίστοιχα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον τρόπο που πραγματοποιούνταν η τοποθέτηση των δειγμάτων στο φασματόμετρο ή στην διαφορετική σύσταση και στην εμφάνιση υγρασίας των δειγμάτων (Paradourou et al., 2011). Οι κορυφές αλλοίωσης που εμφανίστηκαν από τα φασματοσκοπικά δεδομένα του FTIR είναι οι 1069, 1230, 1369 και 1648  $\text{cm}^{-1}$ . Η υψηλότερη κορυφή αλλοίωσης είναι η 1648  $\text{cm}^{-1}$  που σχετίζεται με το αμίδιο I και II.

Όσον αφορά την πολυφασματική απεικόνιση MSI επίσης δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα σε κανένα από τα δύο όργανα. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές του  $R^2$  και RMSE είναι 0,049 και 0,57 αντίστοιχα για το VideometerLab ενώ στο VideometerLite το  $R^2$  έχει τιμή 0,4 και το RMSE 0,55. Οι κορυφές από τα δεδομένα του MSI είναι οι 570 και 850  $\text{cm}^{-1}$  για το VideometerLab, με την υψηλότερη κορυφή να σχετίζεται με την υγρασία. Στο VideometerLite οι κορυφές απαντώνται στο 510  $\text{cm}^{-1}$  και στο 700  $\text{cm}^{-1}$  όπου από εκεί και έπειτα εμφανίζεται εκθετική φάση που σχετίζεται και σε αυτήν την περίπτωση με την υγρασία.

Οι ταχείες μέθοδοι ανάλυσης εξαιτίας των προνομιών που φέρουν έχουν γίνει δημοφιλείς και χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο. Πιο συγκεκριμένα, λόγω της ελάχιστης προετοιμασίας δειγμάτων, της μη καταστροφικής δειγματοληψίας και της ταχείας απόκτησης δεδομένων προτιμώνται σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μικροβιολογικές μεθόδους (Vlachos et al., 2016; Hassoun et al., 2020; Li et al., 2020). Αυτές οι μέθοδοι σε συνδυασμό με τα μοντέλα παλινδρόμησης, μπορούν να θεωρηθούν σημαντικά εργαλεία στην βιομηχανία των λαχανικών αφού έχουν την ικανότητα να εκτιμούν γρήγορα την υπολειπομένη διάρκεια ζωής των φρεσκοκομμένων σαλατών. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η συγκριτική αξιολόγηση διαφορετικών μη επεμβατικών αισθητήρων για την αξιολόγηση της μικροβιακής αλλοίωσης των δειγμάτων ρόκας, η οποία δεν έφερε ικανοποιητικά

αποτελέσματα. Ωστόσο, η εφαρμογή αυτών των τεχνικών για την μελέτη της μικροβιακής αλλοίωσης των προϊόντων της ρόκας είναι περιορισμένη στην επιστημονική βιβλιογραφία. Επιπλέον, ο τεράστιος όγκος δεδομένων που προέρχονται από αυτές τις αναλυτικές προσεγγίσεις απαιτεί μια πιο διεπιστημονική προσέγγιση.

Στο μέλλον, μια διαφορετική προσέγγιση ανάλυσης χωρίς να ληφθεί υπόψη ο μικροβιακός πληθυσμός ίσως οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα.

## 5. Βιβλιογραφία

- Abdi, H. (2003) Partial least squares (PLS) regression. In Bryman, A. Futing, T. and Lewis-Beck, M. Eds., *Encyclopedia of Social Sciences Research Methods*, London. - References - Scientific Research Publishing. (n.d.). [Www.scirp.org](http://www.scirp.org). <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=38440>
- Adams, M.R. and Moss, M.O. (2008) *Food Microbiology*. 3rd Edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 463 p. - References - Scientific Research Publishing. (n.d.). [Www.scirp.org](http://www.scirp.org). <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=1891162>
- Ahvenainen, R. (2000). *Ready to use Fruit and Vegetables. FLAIR FLOW EUROPE*.
- Al-Jowder, O., Defernez, M., Kemsley, E.K., Wilson, R.H., (1999). *Mid-infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of meat products*. *J. Agric.. Food Chem.* 47, 3210– 3218.
- Arvanitoyannis, I. S., & Stratakos, A. C. (2010). Chapter 12—Irradiation of fruits and vegetables. *Irradiation of food commodities* (pp. 467–535). Boston Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374718-1.10012-4>.
- 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*, 33, 103-120.
- Burnett, S. L., & Beuchat, L. R. (2000). Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25(6), 281–287.
- 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., Hansen J. F., (2013). “Videometer A/S - Multispectral Imaging Specialists.” [Www.videometer.com](http://www.videometer.com), [www.videometer.com](http://www.videometer.com).
- Carstensen J. M., Panagou E. Z., Nychas G. J. E., (2013). *Quantitative Analysis of Meat Spoilage using VIS/NIR Spectral Imaging*.
- Chevallier, S., Bertrand, D., Kohler, A., & Courcoux, P. (2006). “Application of PLS-DA in multivariate image analysis.” *Journal of Chemometrics*, 20, 221-229.

- Daugaard, S. B., Adler-Nissen, J., & Carstensen, J. M. (2010). "New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat." *Food Control*, 21, 626–632.
- DENEV, S. A., SUZUKI, I., & KIMOTO, H. (2000). Role of lactobacilli in human and animal health. *Animal Science Journal*, 71(6), σσ. 549-562.
- Di Egidio, V., Sinelli, N., Limbo, S., Torri, L., Franzetti, L., Casiraghi, E.,. (2009). Evaluation of shelf-life of fresh-cut pineapple using FT-NIR and FT-IR spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 54, 87–92.
- 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.
- Dufour E. (2009). Principles of Infrared Spectroscopy. In: Sun, D. W. (Ed.). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press. NY.
- Dufour, E. (2011). Recent advances in the analysis of dairy product quality using methods based on the interactions of light with matter. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 153-165.
- *Ebbing D. D., Gammon S. D. Γενική Χημεία. Έκτη έκδοση. Τραυλός. Αθήνα: Ελλάδα.*
- Elizaquível Patricia, Gloria Sancez and Rosa Aznar (2012) "Application of Propidium Monoazide Quantitative PCR for Selective Detection of Live Escherichia Coli O157:H7 in Vegetables after Inactivation by Essential Oils."
- Ellis, D.I., Broadhurst, D., Kell, D.B., Jem, J., Goodacre, R., Rowland, J.J., 2002. Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2822–2828.
- *International Journal of Food Microbiology*, vol. 159, no. 2, Oct. 2012, pp. 115–121.
- Ellis, D.I., Broadhurst, D. and Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, 514(2), pp.193–201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.060>.
- Ellis, D. I., Goodacre, R. 2001. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 414-424.
- 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.
- 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.
- 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., Gkana, E. N., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2019). Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy and multispectral imaging as means of estimating the microbiological spoilage of farmed sea bream. *Food Microbiology*, 79(February 2018), 27–34.
  - 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.
  - Grundling, A., et al, 2004. “*Listeria Monocytogenes* Regulates Flagellar Motility Gene Expression through MogR, a Transcriptional Repressor Required for Virulence.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 33, pp. 12318–12323.
  - Hamidabadi Sherahi, M., Fathi, M., Zhandari, F., Hashemi, S. M. B., & Rashidi, A. (2017). Structural characterization and physicochemical properties of *Descurainia sophia* seed gum. *Food Hydrocolloids*, 66, 82-89.
  - 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.
  - 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.
  - Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A (2007) Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 1724–1729.
  - Hill C., Guarner F., Reid G., et al. (2014). Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 11:506–14.
  - 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.

- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Van der Steen, C. and Debevere, J. (2001). Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology*, 71 (2-3), 197-210.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and David Allen Golden (2005). *Modern food microbiology*. New York: Springer, pp.89–92.
- Kader, A. A., & Saltveit, M. E. (2003). Respiration and gas exchange. *Postharvest physiology and pathology of vegetables*, 7-29.
- Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N. & Fakiri E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 1–7.
- Khoobchandani M., Ganesh N., Gabbanini S., Valgimigli L., Srivastava M.M. (2011) Phytochemical potential of *Eruca sativa* for inhibition of melanoma tumor growth. *Fitoterapia*, 82(4):647-53.
- Koukounaras, A., Siomos, S. A. and Sfakiotakis, E. (2006). 1- Methylcyclopropene prevents ethylene induced yellowing of rocket leaves. *Postharvest Biology and Technology*, 41 (1), 109-111.
- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food microbiology*, 25(7), 915-921.
- Lambers, Hans, and James Alan Bassham. "Photosynthesis." *Encyclopedia Britannica*, 6 Feb. 2019, [www.britannica.com/science/photosynthesis](http://www.britannica.com/science/photosynthesis).
- Lin, M., Rasco, B.A., Cavinato, A.G., Al-Holy, M., 2009. Infrared (IR) Spectroscopy—Near Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy, in: Sun, D.W. (Ed.), *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Academic Press, pp.119-143.
- Lipińska L., Klewicki R., Sójka M., Bonikowski R., Żyżelewicz D., Kołodziejczyk K., et al. (2018). Αντιμυκητιακή δράση του *Lactobacillus pentosus* LOCK 0979 παρουσία πολυολών και γαλακτοζυλο-πολυολών. *Probiot. Αντιμικροβιακό*. *Proteins* 10 186–200.
- Løkke, M.M Helene F. Seefeldt, Thomas Skovb, Edelenbosa M. Color and textural quality of packaged wild rocket measured by multispectral imaging *Postharvest Biology and Technology* 75 (2013) 86–95.
- Manthou Evanthia. (2021) AGRICULTURAL UNIVERSITY of ATHENS DEPARTMENT of FOOD SCIENCE and HUMAN NUTRITION LABORATORY of MICROBIOLOGY and BIOTECHNOLOGY of FOODS Characterization of Spoilage Microbiota through Next-Generation Sequencing and Application of Spectroscopy-Based Technologies for Assessing the Microbiological Quality of Fresh-Cut Produce.

- Martínez-Sánchez A, Gil-Izquierdo A, Gil MI and Ferreres F (2008). A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. *J Agric Food Chem* 56: 2330–2340.
- Martinez-Sanchez A., Marin A., Llorach R., Ferreres F., Gil M.I., (2006). Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Postharvest Biology and Technology* 40, 26–33.
- McMillin, K. W. (2008). Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat science*, 80(1), 43-65.
- Melchini A. and Traka M. (2010) Biological profile of erucin: a new promising anticancer agent from cruciferous vegetables. *Toxins*, 2: 593-612.
- Mengyi Dong, Maxwell J. Holle, Michael J. Miller, Pratik Banerjee, Hao Feng. 2024. "Fates of attached *E. coli* o157:h7 on intact leaf surfaces revealed leafy green susceptibility." *Food Microbiology*, vol. 119, p. 104432.
- Michael Helana Naguib, Shafik Reham Ezzat, Rasmy George Emad (2011) Studies on the chemical constituents of fresh leaf of *Eruca sativa* extract and its biological activity as anticancer agent in vitro. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(7), pp. 1184-1191.
- Money P, Kelly AF, Gould SW, Denholm-Price J, Threlfall EJ, Fielder MD 2010. "Cattle, Weather and Water: Mapping *Escherichia Coli* O157:H7 Infections in Humans in England and Scotland". *Environmental Microbiology*. 12(10):2633-44.
- Nguyenthe, C., & Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4), 371–401.
- Nicolet, T. (2001). Introduction to fourier transform infrared spectrometry. Information booklet.
- 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., Panagou E. Z., Mohareb F. 2016. Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, Vol. 12: 13-20.
- Otto, SA, Kadin, M., Casini, M., Torres, MA & Blenckner, T. (2018). Ένα ποσοτικό πλαίσιο για την επιλογή και την επικύρωση δεικτών τροφικού ιστού. *Ecological Indicators*, 84, 619-631.
- 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 transforms infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative

- determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International* 44:3264-3271.
- Perry LM, Metzger J (1978) *Medicinal Plants of SE Asia: Attributed Properties and Uses*, The MIT Press: Cambridge, London, UK; Massachusetts, USA, pp. 23– 24.
  - Pizarro-Cerdá, Javier, and Pascale Cossart (2019). “Microbe Profile: *Listeria Monocytogenes*: A Paradigm among Intracellular Bacterial Pathogens.” *Microbiology*, vol. 165, no. 7, pp. 719–721.
  - Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 20, pp. 1–15).
  - Romia M. B, Bernardez M. A., 2009. Multivariate Calibration of Quantitative Analysis. In: Sun D. W.(ed.). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Oxford: Elsevier Inc.
  - Ropodi A. I., Panagou E. Z., Nychas G. J. 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.
  - Ropodi, A. I., Pavlidis, D. E., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2015). Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. *Food Research International*, 67, 12–18.
  - Rutherford, T. J., Marshall, D. L., Andrews, L. S., Coggins, P. C., Wes Schilling, M., & Gerard, P. (2007). Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. *Food Microbiology*, 24(7–8), 703–710.
  - Samelis J., 2006. Managing microbial spoilage in the meat industry. *Food spoilage microorganisms*, Vol. 9: 213-286.
  - Sandhya, (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. *LWT - Food Science and Technology*. 43, 381–392.
  - Shah N. P. (2007). “Functional cultures and health benefits,” *International Dairy Journal*, vol. 17, no. 11, pp. 1262–1277.
  - Shmueli, G., & Koppius, O. R. (2011). Predictive analytics in information systems research. *MIS Quarterly*, 35(3), 553–572.
  - Singh, T. K. and Cadwallade, K. R. (2003). *The Self Life of Foods: An Overview*. ACS Symposium Series, 836.
  - Skalina, L.; Nikolajeva, V. Growth potential of *Listeria monocytogenes* strains in mixed ready-to-eat salads. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 144, 317–321.

- Stavros G. Manios, Nikolaos Konstantinidis, Antonia S. Gounadaki, Panagiotis N. Skandamis. (2012). Dynamics of low (1-4 cells) vs high populations of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified extracts. *Food control* 29, 318-327.
- Sun D. W., 2009. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press. NY.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8: 207–217.
- Thomas, Pious, et al. "Optimization of Single Plate-Serial Dilution Spotting (SP-SDS) with Sample Anchoring as an Assured Method for Bacterial and Yeast Cfu Enumeration and Single Colony Isolation from Diverse Samples." *Biotechnology Reports*, vol. 8, Dec. 2015, pp. 45–55.
- Toivonen, A. M. P. (1997). The effects of storage temperature, storage duration, hydro-cooling, and micro-perforated wrap on shelf life of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*., 10 (1), 59-65.
- Toivonen, Peter M.A., and David A. Brummell. "Biochemical Bases of Appearance and Texture Changes in Fresh-Cut Fruit and Vegetables." *Postharvest Biology and Technology*, vol. 48, no. 1, Apr. 2008, pp. 1–14.
- Tournas, V. H. (2006). Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 99(1), 71–77.
- Tournas, V.H., 2005. Spoilage of Vegetable Crops by Bacteria and Fungi and Related Health Hazards. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 33–44.
- 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.
- Uphof JCT (1968) *Dictionary of Economic Plants*. Verlag Von J. Cramer Publ.: New York, NY, USA.
- USDA, Food Data Central. (2022). [Fdc.nal.usda.gov. https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169387/nutrients](https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169387/nutrients).
- Varga, J.; Apahidean, A. S.; Lujerdean, A. and Bunea, A. (2009) Study of some agrotechnological characteristics of rocket (*Eruca sativa* Mill). *Bulletin USAVM Horticulture*, 66(1): 472-474.
- 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.
- Watada, E. A. and Qi, L. (1999). Quality to fresh-cut produce. *Postharvest Biology and Technology*., 15(3), 201-205.

- Wold S., Sjöström M., Eriksson L., 2001. PLS-regression: a basic tool of Chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Vol. 58: 109-130.
- Yaniv Z, Schafferman D, Amar Z (1998) Tradition, uses and biodiversity of rocket (*Eruca sativa*, Brassicaceae) in Israel. *Econ. Bot.*, 52: 394–400.
- Young, L. L., Reviere, R. D., & Cole, A. B. (1988). Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres. *Food technology (USA)*.
- Zagory, D. (1999). Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), 313–321.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat—A review. *Meat science*, 86(1), 119-128.
- Βαλαβανίδης, Αθ. (2006). Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Γιαβάσης Ι. (2020). Γενική Μικροβιολογία Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Καρδίτσα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, pp.13.
- Μαλισιόβα, Δ.Ζ (2015). Εργαστήριο Γενικής Φυτοπαθολογίας Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Άρτα: Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου, pp.19-20.
- Μυρίσης Γεώργιος. (2022). Χρήση Φασματοσκοπίας για τον προσδιορισμό της μικροβιολογικής ποιότητας και της νοθείας ωμών και ψημένων δειγμάτων μοσχαρίσιου κρέατος. ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ.
- Τσέκος. Γεώργιος Τ. (2022). Αξιολόγηση σύγχρονων μεθόδων για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης και τον διαχωρισμό φρέσκων-αποψυγμένων φιλέτων από μούτι κοτόπουλου. ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ.