



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Έλεγχος της ποιότητας και της ασφάλειας Φέτας συντηρημένης σε άλμη
ή συσκευασμένης υπό κενό με τη χρήση ωφέλιμων μικροοργανισμών

Ιωάννης Ν. Νταλάκας

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

Έλεγχος της ποιότητας και της ασφάλειας Φέτας συντηρημένης σε άλμη
ή συσκευασμένης υπό κενό με τη χρήση ωφέλιμων μικροοργανισμών

“Monitoring the quality and safety of brine-preserved or vacuum-packed Feta
using beneficial microorganisms”

Ιωάννης Ν. Νταλάκας

Εξεταστική Επιτροπή:

Νικόλαος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Παναγιώτης Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

Έλεγχος της ποιότητας και της ασφάλειας Φέτας συντηρημένης σε άλμη ή συσκευασμένης υπό κενό με τη χρήση ωφέλιμων μικροοργανισμών

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ελλάδα έχει μακρά παράδοση στην παραγωγή ενός μεγάλου εύρους γαλακτοκομικών προϊόντων, με τη φέτα να κατέχει κυρίαρχη θέση. Το μικροβιακό οικοσύστημα που επικρατεί κατά την παραγωγή αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες, επιδρώντας στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της φέτας, ενώ είναι αποδεδειγμένο πως οι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί επιδέχονται μια δυναμική εξέλιξη κατά την παραγωγή της. Τα *Lactiplantibacillus pentosus* L33 και *Lactiplantibacillus plantarum* L125 είναι στελέχη που ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) τα οποία δύνανται να διαδραματίσουν κρίσιμο ρόλο στη συντήρηση του τυριού οδηγώντας στην παράταση της διάρκειας ζωής και αύξηση της ασφάλειας των προϊόντων έναντι διάφορων αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, όπως το τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* που κρίνεται ως μια σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Βασικός στόχος της συγκεκριμένης διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 στην αναστολή ανάπτυξης του *L. monocytogenes* στη φέτα. Ακόμη, αξιολογήθηκαν τα μικροβιολογικά αποτελέσματα που εξήχθησαν από το πείραμα αλλοίωσης της φέτας σε σχέση με τα δεδομένα που ελήφθησαν με τις μεθόδους της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR). Επιπροσθέτως, οι παραπάνω ταχείες μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και την ταξινόμηση των δειγμάτων φέτας σε σχέση με την παρουσία του *L. monocytogenes*.

Τα δείγματα φέτας συντηρήθηκαν σε 4 διαφορετικές συνθήκες. Η αποθήκευση τους έλαβε χώρα εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 8 δειγματοληψίες για κάθε μια από τις 4 συνθήκες. Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν στα δείγματα που δεν είχαν εμβολιαστεί με *L. monocytogenes* ήταν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι και οι ζύμες/μύκητες. Για τα εμβολιασμένα με *L. monocytogenes* δείγματα προσδιορίστηκε το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο και η OMX. Ταυτόχρονα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις γίνονταν μετρήσεις των δειγμάτων με τις μεθόδους MSI (VideometerLab και VideometerLite) και FTIR (FTIR-6200 JASCO). Παράλληλα, λάμβαναν χώρα μετρήσεις pH και ενεργότητας νερού (a_w) σε κάθε δειγματοληψία, ενώ αξιολογούνταν τα δείγματα ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν μοντέλα συσχέτισης των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων συνδυαστικά με τα φάσματα, ενώ ως δείγματα ανάπτυξης (training) και επικύρωσης (validation) του κάθε μοντέλου αξιοποιήθηκε το 70% του συνόλου των δεδομένων και για την πρόβλεψη (prediction) το 30%. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα φασματικά δεδομένα και ως εξαρτημένη μεταβλητή ο πληθυσμός της OMX. Σε κάθε μοντέλο δοκιμάστηκαν μετασχηματισμοί, όπως οι SNV (Standard Normal Variate) και Savitzky-Golay (1^η και 2^η παράγωγος). Η δημιουργία των μοντέλων για την εκτίμηση της OMX έλαβε χώρα μέσω της εφαρμογής γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων φέτας με και χωρίς *L. monocytogenes* ορίστηκαν 2 κλάσεις, η «Κλάση 1» (απουσία *L. monocytogenes*) και η «Κλάση 2» (παρουσία *L. monocytogenes*) και εφαρμόστηκε η διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Σαν ανεξάρτητες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν τα φασματικά δεδομένα και ως εξαρτημένες οι 2 κλάσεις για τα δείγματα με και χωρίς *L. monocytogenes*.

Αναφορικά με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, το πληθυσμιακό επίπεδο των μεσόφιλων LAB ήταν σταθερό, ενώ εκείνο των γαλακτικών στρεπτόκοκκων ελαφρώς μειωμένο σε κάθε περίπτωση. Επιπλέον, τα LAB και οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα στα δείγματα φέτας. Η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού των ζυμών/μυκήτων, ενώ η προσθήκη των στελεχών LAB λειτούργησε περιοριστικά στην ανάπτυξη τους. Στα δείγματα που περιείχαν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 και εμβολιάστηκαν με τα δύο στελέχη *L. monocytogenes* ήταν εμφανής μια ελαφριά αναστολή του παθογόνου σε σχέση με τα control, δείχνοντας έτσι μια ενδεχόμενη περιοριστική δράση των στελεχών LAB έναντι του *L. monocytogenes*.

Τα μοντέλα PLS-R που αναπτύχθηκαν για την εκτίμηση της OMX δεν έδωσαν καλούς συντελεστές απόδοσης τόσο λόγω των δεδομένων της MSI όσο και της FTIR. Συγκεκριμένα, για το VideometerLab, οι δείκτες απόδοσης για την πρόβλεψη ήταν $RMSE = 0,11$, $R^2 = 0,32$ για τα εντός άλμης και $RMSE = 0,17$, $R^2 = 0,33$ για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Επιπλέον, για το VideometerLite, οι δείκτες για την πρόβλεψη υπολογίστηκαν $RMSE = 0,15$, $R^2 = -0,20$ για τα εντός άλμης και $RMSE = 0,13$, $R^2 = 0,33$ για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Όσον αφορά το FTIR-6200 JASCO, οι δείκτες απόδοσης για την πρόβλεψη ήταν $RMSE = 0,14$, $R^2 = 0,07$ για τα εντός άλμης και $RMSE = 0,19$, $R^2 = 0,21$ για τα υπό κενό αέρος δείγματα.

Τα μοντέλα PLS-DA δεν κατάφεραν να διαχωρίσουν και να ταξινομήσουν σε ικανοποιητικό βαθμό τα δείγματα στις 2 κλάσεις με βάση τα δεδομένα από τα MSI και FTIR. Αναφορικά με το VideometerLab, το μοντέλο ταξινόμησης είχε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 45,71% για τα εντός άλμης και 56,52% για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Για το VideometerLite, το μοντέλο ταξινόμησης επέδειξε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 65,96% για τα εντός άλμης και 64,41% για τα υπό κενό αέρος

δείγματα. Τέλος, για το FTIR-6200 JASCO, το μοντέλο ταξινόμησης εμφάνισε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 57,14% για τα εντός άλμης και 79,71% για τα υπό κενό αέρος δείγματα.

Εν κατακλείδι, παρατηρήθηκε πως οι μέθοδοι των MSI και FTIR συνδυαστικά με τη PLS-R δεν έχουν τη δυνατότητα εύρεσης των βιοχημικών μεταβολών που συμβαίνουν κατά την αποθήκευση της φέτας, και συνεπώς δεν χαρακτηρίζονται αποτελεσματικές ώστε να μπορέσουν δυνητικά να εκτιμήσουν την αλλοίωση της φέτας. Ακόμη, σε συνδυασμό με τη PLS-DA δεν δύνανται να αξιοποιηθούν ως ασφαλείς μέθοδοι για την ανίχνευση πιθανής εμφάνισης του *L. monocytogenes* στη φέτα.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: φέτα, βιοσυντήρηση, *Listeria monocytogenes*, MSI, FTIR

Monitoring the quality and safety of brine-preserved and vacuum-packed Feta using beneficial microorganisms

MSc Food Science & Technology

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of Microbiology & Food Biotechnology

ABSTRACT

Greece has a long-lasting tradition in the production of a wide range of dairy products, with Feta cheese holding a dominant position. The microbial ecosystem constitutes one of the most significant factors that dominates during the production, in such way, it affects the sensory and physicochemical characteristics of Feta cheese, while it is proven that the involved microorganisms accommodate a dynamic change over its production. *Lactiplantibacillus pentosus* L33 and *Lactiplantibacillus plantarum* L125 are strains that belong to the lactic acid bacteria (LAB), which can play a crucial role in the preservation of cheese, leading to the extension of shelf life and increase of product safety against several spoilage and pathogenic microorganisms, such as the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, which is considered a severe threat for human health. Principal purpose of this thesis was the investigation of the effect of *L. pentosus* L33 and *L. plantarum* L125 on inhibiting the growth of *L. monocytogenes* in Feta cheese. Furthermore, the microbiological results from the experiment were associated with the data from Multispectral Image Analysis (MSI) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). In addition, the above rapid non-invasive methods were used for the separation and the classification of Feta cheese samples with or without the presence of *L. monocytogenes*.

Feta cheese samples were preserved in 4 different conditions. They were stored in brine or under vacuum in 4°C and 10°C. Eight sampling points for each one of the 4 conditions were taken place. The microorganisms determined in the samples that weren't inoculated with *L. monocytogenes* were total viable counts (TVC), lactic acid bacteria (LAB), lactic streptococci and yeasts/molds. As for the inoculated samples with *L. monocytogenes*, the specific food pathogen's population as well as TVC were determined. In parallel with the microbiological analysis, spectroscopic measurements of the samples were taken with MSI (VideometerLab and VideometerLite) and FTIR (FTIR-6200 JASCO). The pH and water activity (α_w) values were measured. Sensory characteristics of the samples were also assessed.

Regression models were developed taking into account the microbiological results and the spectroscopic data, while 70% of the total data in each case was used for training the models and the rest 30% for testing them. Spectral data were used as independent variables and as dependent variable the population of TVC. In all models spectral preprocesses were tested, such as SNV (Standard Normal

Variate) and Savitzky-Golay (1st and 2nd derivative). Partial Least Squares Regression (PLS-R) was applied to predict the population of TVC. For the classification of Feta cheese samples with and without *L. monocytogenes* 2 classes were defined, “Class 1” (without *L. monocytogenes*) and “Class 2” (with *L. monocytogenes*) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) was applied. The spectral data were used as independent variables and as dependent variables the 2 classes of the samples, with or without *L. monocytogenes*.

Regarding the microbiological results, the population level of mesophilic LAB was stable, while that of lactic streptococci slightly decreased in each case. Furthermore, LAB and lactic streptococci constituted the dominant microflora of Feta cheese samples. The increase of storage temperature caused the increase of yeasts’/molds’ population, while the addition of LAB strains limited their development. In samples that included the *L. pentosus* L33 and the *L. plantarum* L125, inoculated with the two *L. monocytogenes* strains, a slight suspension of the pathogen in comparison with control was evident, showing a contingent limiting effect of LAB strains against *L. monocytogenes*.

The PLS-R models that were developed about the estimation of TVC didn’t provide efficient performance not only in the case of MSI data, but also for FTIR. For VideometerLab, the performance indices for the prediction were RMSE = 0,11, R² = 0,32 for the brine samples and RMSE = 0,17, R² = 0,33 for those in vacuum storage. Moreover, for VideometerLite, the indices for the prediction were RMSE = 0,15, R² = -0,20 for the brine samples and RMSE = 0,13, R² = 0,33 for those in vacuum. Regarding FTIR-6200 JASCO, the efficiency indices for the prediction were RMSE = 0,14, R² = 0,07 for the brine samples and RMSE = 0,19, R² = 0,21 for vacuum.

The PLS-DA models didn’t accomplish to separate and classify satisfactorily the samples in 2 classes for both MSI and FTIR data. In reference to VideometerLab, the classification model had a total accuracy of prediction 45,71% for the brine samples and 56,52% for vacuum. For VideometerLite, the classification model showed a total accuracy for prediction 65,96% for the brine samples and 64,41% for vacuum. Lastly, for FTIR-6200 JASCO, the classification model revealed a total accuracy of prediction 57,14% for the brine samples and 79,71% for vacuum.

In conclusion, both MSI and FTIR concurrently with PLS-R didn’t have the capability of finding the biochemical changes occurring during Feta cheese storage, and as a result couldn’t be considered as effective methods, capable of detecting spoilage of Feta cheese. In addition, together with PLS-DA are not able to be used as efficient methods for the detection of possible presence of *L. monocytogenes* in Feta cheese.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: Feta cheese, biopreservation, *Listeria monocytogenes*, MSI, FTIR

Ευχαριστίες

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νίκο Χωριανόπουλο για τη συνεχή βοήθεια, υποστήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχε τόσο κατά την πειραματική διαδικασία όσο και κατά τη συγγραφή της μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών που δέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής και διέθεσαν χρόνο για τη μελέτη της εργασίας μου.

Ακόμη, θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Αγγελική Δουκάκη για την υπομονή και καθοδήγηση όχι μόνο κατά τη διάρκεια του πειραματικού σκέλους, αλλά και στην ανάλυση δεδομένων και συγγραφή της διατριβής, καθώς μου προσέφερε πολύτιμες συμβουλές και μεγάλη βοήθεια.

Δεν γίνεται να παραλείψω να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε κατά τη διάρκεια τέλεσης του πειράματος, όπως και για την πολύτιμη βοήθεια όλων, για τις συμβουλές και οδηγίες τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση, υπομονή και κατανόηση καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Με την άδεια 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.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1 Τυρί Φέτα	1
1.1.1 Γενικά	1
1.1.2 Τεχνολογικά χαρακτηριστικά φέτας.....	2
1.1.3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά φέτας	3
1.2 Μικροβιακή χλωρίδα φέτας	4
1.3 Αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί στη φέτα.....	6
1.3.1 Ζύμες - μύκητες.....	7
1.4 Παθογόνους μικροοργανισμοί στη φέτα	10
1.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.5 Συσκευασία τυριών	13
1.5.1 Συσκευασία λευκών τυριών άλμης.....	14
1.6 Βιοσυντήρηση.....	16
1.6.1 <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> L33 και <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> L125	17
1.7 Εδώδιμες μεμβράνες	19
1.7.1 Εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου	21
1.8 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης και την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών	22
1.8.1 Μέθοδος Πολυφασματικής Απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis, MSI).....	23
1.8.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR).....	25
1.9 Σκοπός μελέτης	27
2. Υλικά και Μέθοδοι	28
2.1 Προκαταρκτικό Πείραμα	28
2.2 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	28
2.3 Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου	29
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων	30
2.5 Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	32

2.6 Μέτρηση pH.....	34
2.7 Μέτρηση ενεργότητας νερού (a_w).....	34
2.8 Οργανοληπτική αξιολόγηση	35
2.9 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).....	35
2.9.1 Όργανο VideometerLab.....	35
2.9.2 Όργανο VideometerLite	37
2.10 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)	38
2.11 Ανάλυση δεδομένων	39
2.11.1 Μοντέλο εκτίμησης της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLS-R).....	39
2.11.2 Μοντέλο διαχωρισμού δειγμάτων με και χωρίς το παθογόνο <i>L. monocytogenes</i> με διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA).....	42
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	45
3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων	45
3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH.....	53
3.3 Αποτελέσματα μέτρησης ενεργότητας νερού (a_w)	55
3.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης	57
3.5 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων	60
3.5.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)	60
3.5.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	63
3.5.3 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την πολυφασματική απεικόνιση (MSI)	67
3.5.4 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR).....	70
3.5.5 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για την πολυφασματική απεικόνιση (MSI).....	72
3.5.6 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR).....	78
4. Συμπεράσματα	82
5. Βιβλιογραφία	85

1. Εισαγωγή

1.1 Τυρί Φέτα

1.1.1 Γενικά

Τυρί είναι η γενική ονομασία για ένα σύνολο ζυμωμένων προϊόντων με βάση το γάλα, που παράγονται σε ένα μεγάλο εύρος γεύσεων, υφών και μορφών παγκοσμίως. Ως “Τυριά άλμης” χαρακτηρίζονται οι ποικιλίες τυριών που ωριμάζουν και διατηρούνται σε άλμη για σημαντικό χρονικό διάστημα, ουσιαστικά μέχρι την κατανάλωση. Παραδοσιακά παράγονται με ποικίλες ονομασίες στις χώρες των Βαλκανίων και της Ανατολικής Μεσογείου (Abd El-Salam & Alichanidis, 2004, Alichanidis & Polychroniadou, 2008). Τα λευκά τυριά άλμης αποτελούν μια κατηγορία τους, με τυριά που παρασκευάζονται από τυρόπηγμα τα οποία δεν υφίστανται θερμική επεξεργασία, όπως η φέτα και παρόμοια είδη τυριών παραγόμενων στην Ελλάδα (Alichanidis & Polychroniadou, 2008). Η φέτα είναι ένα ημι-μαλακό λευκό τυρί άλμης που παραδοσιακά παράγεται στην Ελλάδα. Γίνεται είτε από πρόβειο γάλα είτε από μίξη πρόβειου και έως 30% γίδινου γάλακτος. Χαρακτηρίζεται από αλμυρή, ελαφρώς όξινη γεύση και ευχάριστες οργανοληπτικές ιδιότητες. Το σώμα και η υφή της είναι συμπαγή, λεία και κρεμώδη, γεγονός που συμβάλει στον τεμαχισμό του τυριού σε φέτες. Δεν επιτρέπεται η παρουσία οπών, αλλά είναι επιθυμητές ακανόνιστες μικρές μηχανικές σχισμές (Anifantakis, 1991, Abd El-Salam et al., 1993). Είναι το πιο γνωστό ελληνικό τυρί με εξέχουσα θέση στην ελληνική και παγκόσμια αγορά, ενώ κατατάσσεται πρώτο σε εξαγωγές (ICAP, 2019). Από το 2002 η φέτα χαρακτηρίζεται ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με την παραγωγή της να επιτρέπεται σε συγκεκριμένες περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας και μόνο στο νησί της Λέσβου (EC, 2002). Λόγω αυτού, η σύσταση και οι οργανοληπτικές ιδιότητες της φέτας ενδέχεται να ποικίλουν σημαντικά ανάλογα την τοποθεσία, αλλά πάντα εμπίπτουν εντός των νόμιμων ορίων, ιδίως όσον αφορά την υγρασία και το λίπος (υγρασία $\leq 56\%$, λίπος επί ξηρού $\geq 43\%$) (Άρθρο 83, ΚΤΠ, 2014). Επιπροσθέτως, παράγοντες όπως η φυλή των ζώων, η εποχή, οι αγρο-κλιματικές συνθήκες, η ώρα άμελξης, το καθεστώς (τύπος) σίτισης, η χλωρίδα των τοπικών βοσκοτόπων, κ.λπ. επιδρούν στη σύνθεση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του γάλακτος και κατ’ επέκταση σε αυτές του προκύπτοντος τυριού (Morand-Fehr et al., 2007).

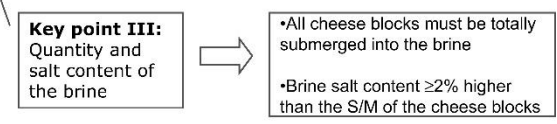
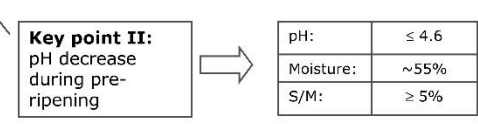
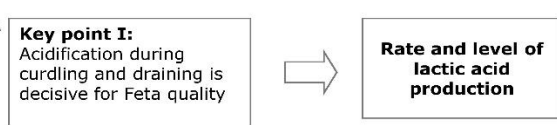
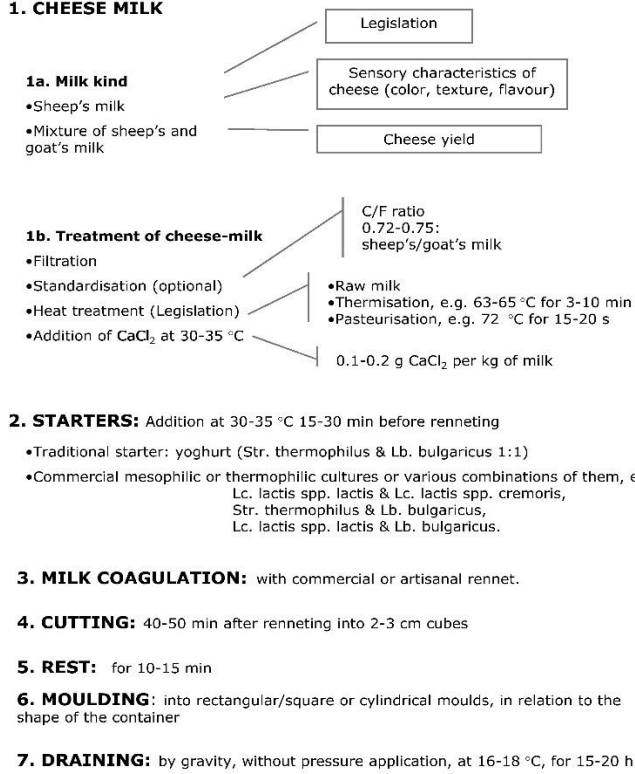
Τα βασικά συστατικά για την παρασκευή φέτας είναι το γάλα, η πυτιά, η οξυγαλακτική καλλιέργεια και το αλάτι. Τα ανωτέρω συστατικά ακολουθούν την ειδική διεργασία σχηματισμού πήγματος, αποβολής ορού γάλακτος, παραγωγής οξέος και προσθήκης αλατιού. Έπειτα, λαμβάνει χώρα η ωρίμανση του τυριού (Mantis, 1993). Σύμφωνα με τα Ελληνικά Πρότυπα (Codex

Alimentarius, 1998), η φέτα ωριμάζει για τουλάχιστον 60 ημέρες και εν συνεχεία διατίθεται στο εμπόριο (Mauropoulos & Arvanitoyannis, 1999). Αν και υπάρχει υψηλή μεταβλητότητα στην κατά κεφαλήν ημερήσια κατανάλωση φέτας, η εκτιμώμενη μέση κατανάλωση στην Ελλάδα είναι 39 g (Katsouri et al., 2020). Η μέση περιεκτικότητα σε υγρασία στα τυριά ηλικίας μεταξύ 60 και 120 ημερών είναι περίπου 55%, το μέσο λίπος επί ξηρού περίπου 51%, η μέση πρωτεΐνη γύρω στο 17,5%, το αλάτι στην υγρή φάση περίπου 5,2% και το μέσο pH γύρω στο 4,6 (Anifantakis & Moatsou, 2006, Nega & Moatsou, 2011). Αναφορικά με την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά εμπορικών προϊόντων φέτας ανά 100 g κυμαίνεται ως εξής: ενέργεια: 221-343 kcal, ολικό λίπος: 20-29 g, κορεσμένο λίπος: 12,8-20,3 g, υδατάνθρακες: 0-3,1 g, σάκχαρα: 0-3 g, πρωτεΐνες: 13,1-21 g και αλάτι 1,2-5,1 g (Katsouri et al., 2020). Η φέτα είναι μια εξαιρετική πηγή ασβεστίου και πρωτεϊνών, αλλά ως γαλακτοκομικό προϊόν έχει πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο (Jalili, 2016).

1.1.2 Τεχνολογικά χαρακτηριστικά φέτας

Η τεχνολογία της τυροκομίας βασίζεται στις παραδοσιακές μεθόδους που έχουν περιγραφεί αναλυτικά κατά το παρελθόν, μεταξύ άλλων από τους Anifantakis & Moatsou (2006) και Alichanidis & Polychroniadou (2008). Τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά της φέτας παρατίθενται στην Εικόνα 1.1, με τα βασικά σημεία που υποδεικνύονται να κρίνονται μείζονος σημασίας για την ποιότητα της φέτας και κατ' επέκταση των λευκών τυριών άλμης, όπως συνοψίζεται από τον Alichanidis (2007). Η οξίνιση που λαμβάνει χώρα κατά τις πρώτες ώρες μετά την παρασκευή επηρεάζεται από τον συνδυασμό και την ποσότητα των καλλιεργείων εκκίνησης που χρησιμοποιούνται και τις θερμοκρασιακές συνθήκες κατά την πήξη του γάλακτος και στράγγιση του πηγματος. Η μη επαρκής οξίνιση ή η αργή πτώση του pH σχετίζονται άμεσα με τον κίνδυνο ανάπτυξης κολοβακτηριδίων και ζυμών. Το αντίθετο έχει ως αποτέλεσμα έντονη στράγγιση και κατά συνέπεια χαμηλό βαθμό απόδοσης και αρκετά κοκκώδη και σκληρή υφή. Όταν παρέλθουν 24 ώρες από την πήξη, οι τιμές του pH πρέπει να είναι μικρότερες από 5,0. Η μεταφορά της φέτας στον ψυκτικό θάλαμο πριν την ολοκλήρωση του πρώτου σταδίου ωρίμανσης οδηγεί σε μαλάκωμα του τυριού, καθώς το νερό απορροφάται από την άλμη. Στο συγκεκριμένο στάδιο το τυρί επιβάλλεται να έχει $\text{pH} \leq 4,6$, υγρασία $\sim 55\%$ και αλάτι στην υγρή φάση $\geq 5\%$. Τέλος, υπάρχει πιθανότητα να παρατηρηθεί μαλάκωμα της φέτας λόγω της χρήσης άλμης χαμηλής συγκέντρωσης σε αλάτι. Για να αποφευχθεί, η άλμη της τελικής συσκευασίας περιέχει NaCl της τάξεως του 8%. Για αυτόν τον λόγο, η οξίνιση και η πρόσληψη αλατιού κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών ωρίμανσης είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την επιτυχή παραγωγή της φέτας (Moatsou & Govaris, 2011).

1. CHEESE MILK



Εικόνα 1.1: Σχηματική παρουσίαση των σταδίων παραγωγής φέτας (Alichanidis, 2007).

1.1.3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά φέτας

Η στράγγιση είναι το κρίσιμο σημείο στην παρασκευή φέτας. Ρυθμίζεται από την παραγωγή οξέος στο τυρόπηγμα και από τη ξηρή αλάτιση, καθώς δεν ασκείται πίεση. Κατά τη διάρκεια της στράγγισης λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της λιπόλυσης και της πρωτεόλυσης στη φέτα (Alichanidis et al., 1984, Vaforoulou et al., 1989).

Το χαμηλό pH και η περιεκτικότητα σε αλάτι στην υγρή φάση της φέτας ενδεχομένως να προκαλέσουν σχετικά μικρές μεταβολές κατά την ωρίμανση. Οι περισσότερες βιοχημικές αλλαγές συμβαίνουν κατά το πρώτο στάδιο της ωρίμανσης (περίοδος προ-ωρίμανσης, Εικ. 1.1) (Moatsou & Govaris, 2011). Ειδικότερα, περίπου τα 2/3 του διαλυτού αζώτου είναι ελεύθερα αμινοξέα, και μικρά και μεσαία πεπτιδια. Στο τέλος του πρώτου σταδίου ωρίμανσης, η υδρόλυση της α_{s1}-καζεΐνης είναι 30-50%, ενώ η β-καζεΐνη έχει υδρολυθεί σε περιορισμένο επίπεδο. Μετά από περίοδο ωρίμανσης 90 ημερών, η υπολειμματική α_{s1}-καζεΐνη αποτελεί το 1/3 της αρχικής (Katsiari et al., 2000, Valsamaki et al., 2000, Moatsou et al., 2002, Michaelidou et al., 2003, Moatsou et al., 2004). Βέβαια, αναμένεται

μια υποεκτίμηση της αξιολόγησης της πρωτεόλυσης στο τυρί. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην επιλεκτική μετανάστευση διαλυτών ενώσεων αζώτου από τη φέτα στην άλμη (Michaelidou et al., 2005). Οι πρωτεολυτικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στα λευκά τυριά άλμης και τη φέτα οφείλονται στα βακτηριακά πρωτεολυτικά ένζυμα και την υπολειμματική χυμοσίνη, καθώς οι φυσικοχημικές συνθήκες του τυριού κρίνονται δυσχερείς για τη δράση της πλασμίνης (Moatsou & Govaris, 2011). Επιπροσθέτως, η υπολειμματική δράση της χυμοσίνης στη φέτα χαρακτηρίζεται υψηλή σε σχέση με άλλους τύπους τυριών (Nega & Moatsou, 2011) λόγω του χαμηλού pH κατά την ωρίμανση και την στράγγιση, αλλά και εξαιτίας της απουσίας curd cooking (Moatsou & Govaris, 2011).

Η λιπόλυση εκφράζεται ως η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), ενώ είναι μετρίου βαθμού. Η φέτα περιέχει κατά βάση έως 4-6 g FFA ανά κιλό, συμπεριλαμβανομένου του οξικού οξέος. Ωστόσο, πολύ υψηλές τιμές έως 10 g/kg έχουν παρατηρηθεί σε φέτα που παρασκευάζεται με παραδοσιακή πυτιά (Georgala et al., 2005, 2006). Καθ' όλη τη διάρκεια ωρίμανσης της φέτας τα κύρια οργανικά οξέα που συναντώνται είναι το οξικό, το γαλακτικό και το κιτρικό οξύ, ανάλογα με την καλλιέργεια εκκίνησης που αξιοποιείται. Από τα ανωτέρω, το οξικό οξύ αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο της γεύσης που τη χαρακτηρίζει, ενώ αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό κατά την ωρίμανση. Στην ώριμη φέτα κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 1,5 g/kg (Alichanidis et al., 1984, Vafoπούλου et al., 1989, Georgala et al., 2006, Manolaki et al., 2006).

1.2 Μικροβιακή χλωρίδα φέτας

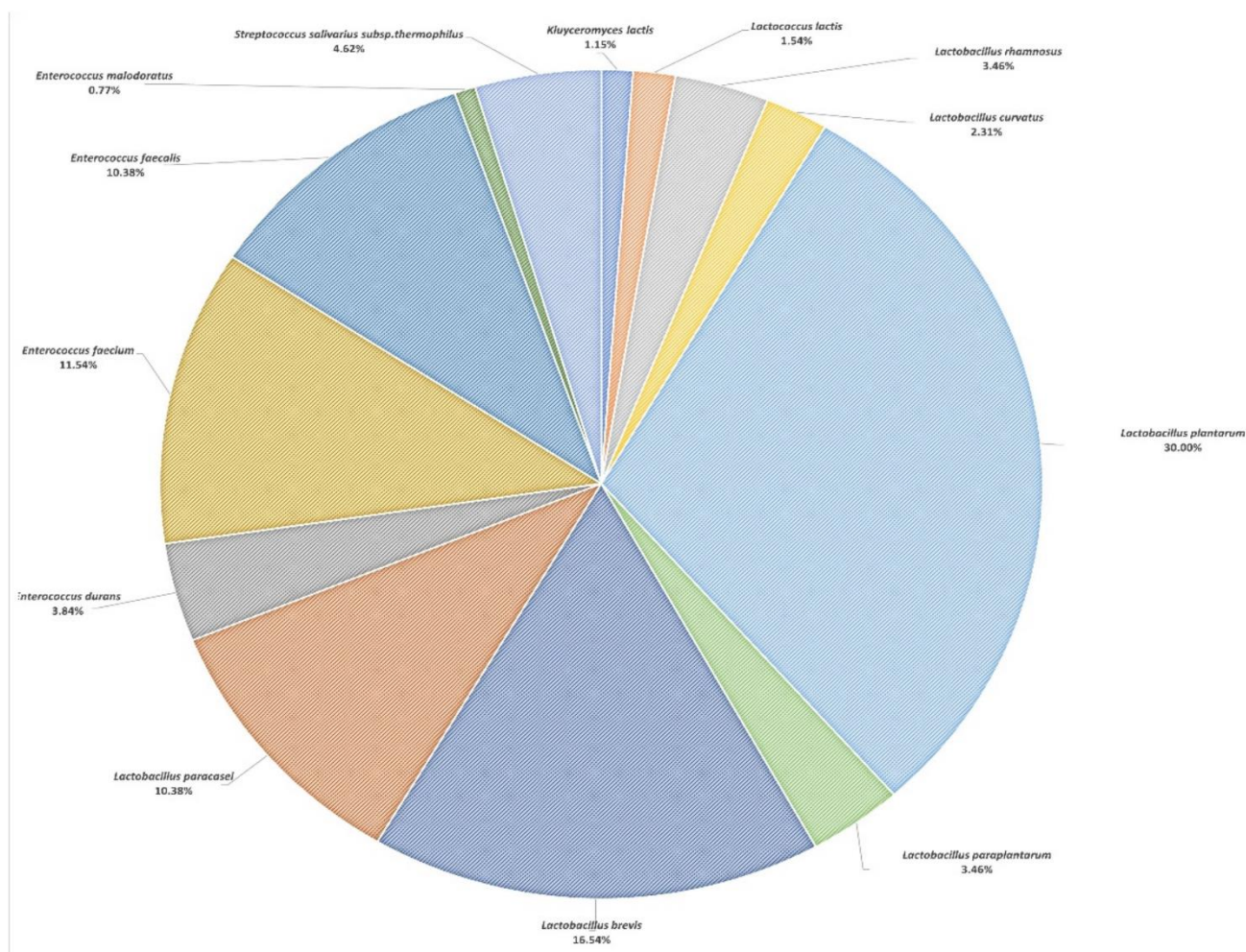
Ο χαρακτηρισμός της φέτας γίνεται από τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά. Διάφορα είδη μικροοργανισμών συνυπάρχουν, λειτουργούν και αλληλεπιδρούν, ενώ μέσω του μεταβολισμού τους υποστηρίζουν την ανάπτυξη του αρώματος, της υφής, της γεύσης, της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Papadopoulou et al., 2018). Η μικροβιακή χλωρίδα των τυριών μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου και εξαρτάται από το είδος του τυριού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την επεξεργασία που επιδέχεται και την πορεία ωρίμανσης. Η μικροβιακή χλωρίδα της φέτας προκύπτει από τη μικροβιακή χλωρίδα του γάλακτος των αιγοπροβάτων, τα εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (starter lactic acid bacteria, SLAB) και τη δευτερεύουσα μικροχλωρίδα (Gantzias et al., 2020). Τα SLAB αποτελούν εμβολιασμένες καλλιέργειες εκκίνησης που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή οξέος κατά την παρασκευή του τυριού και έχουν σημαντική συνεισφορά στην ωρίμανση (Hayaloglu, 2017). Από την άλλη, η δευτερεύουσα μικροβιακή χλωρίδα αποτελείται από τα μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB) των οποίων

η ανάπτυξη λαμβάνει χώρα εσωτερικά στην πλειονότητα των τυριών, και από άλλες ομάδες βακτηρίων, ζύμες ή/και μύκητες που αναπτύσσονται είτε εσωτερικά είτε εξωτερικά και τις περισσότερες φορές είναι ιδιαίτερες για συγκεκριμένα είδη τυριών (Beresford et al., 2001). Οι δευτερεύοντες μικροοργανισμοί δεν ευθύνονται για την παραγωγή οξέος κατά την παρασκευή, ωστόσο γενικά διαδραματίζουν εξέχουσας σημασίας ρόλο κατά την ωρίμανση, καθώς τα βακτήρια που ανήκουν σε αυτούς έχουν συμβολή στην πρωτεόλυση και λιπόλυση του τυριού (Hayaloglu, 2017).

Η μικροβιακή οικολογία του τυριού είναι βασισμένη στη σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ SLAB και NSLAB (Choi et al., 2020). Τα είδη *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* αξιοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης από τη βιομηχανία για την παρασκευή της φέτας επιβιώνοντας για ένα χρονικό διάστημα λίγων ημερών μετά το πέρας της ζύμωσης, ενώ τα NSLAB δύνανται να ανιχνευθούν κατά την ωρίμανση επικρατώντας μέχρι την ολοκλήρωση της λόγω του χαμηλού pH και της αυξημένης περιεκτικότητας σε αλάτι (Bintsis & Papademas, 2002, Manolopoulou et al., 2003, Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2014). Έτσι, είδη του γένους *Lactobacillus*, το *Lactococcus lactis*, όπως και είδη των γενών *Enterococcus* και *Pediococcus* είναι τα συνήθη NSLAB που συναντώνται (Tzanetakis & Litoroulou-Tzanetaki, 1992, Manolopoulou et al., 2003, Bozoudi et al., 2016, Tzora et al., 2021) (Εικόνα 1.2). Τα *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus paracasei* απομονώνονται από ώριμη φέτα, ενώ τα *Lactobacillus brevis* και *Lactobacillus fuchuensis* ανιχνεύονται περιοδικά σε φρέσκια (Bozoudi et al., 2016). Ειδικότερα, το *L. plantarum* αποτελεί ένα από τα κύρια NSLAB που συναντάται κατά την ωρίμανση της φέτας (Vassiliadis et al., 2009). Τα *Enterococcus spp.* απομονώνονται με μεγάλη συχνότητα από διάφορα είδη τυριών που παράγονται από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα, μεταξύ των οποίων και η φέτα (Psoni et al., 2006). Τα είδη που ανιχνεύονται πιο συχνά στη φέτα και χαρακτηρίζονται ως κυρίαρχα είναι τα *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* (Tzora et al., 2021). Τα *Pediococcus spp.* δεν απομονώνονται από το τυρί τόσο συχνά όσο άλλα LAB. Ενδεικτικά, στη φέτα έχουν απομονωθεί επιτυχώς τα είδη *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus parvulus* (Tzora et al., 2021). Η σπουδαιότητα τους έγκειται στη συμβολή τους στις οργανοληπτικές ιδιότητες (γεύση) του τυριού λόγω της παραγωγής διακετυλίου και ακεταλδεϋδης, ενώ ασκούν πρωτεολυτική δράση έναντι πεπτιδίων που περιέχουν μια ομάδα προλίνης (Irmiler et al., 2013).

Στα λευκά τυριά άλμης οι ζύμες δεν αποτελούν μέρος των καλλιιεργειών εκκίνησης και συχνά χαρακτηρίζονται ως επιμολύνσεις, αν και ενίοτε περιλαμβάνονται στη δευτερεύουσα μικροχλωρίδα (Kesenkas & Akbulut, 2008). Οι ζύμες στη φέτα ή οι άλμες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή της είναι συγκεκριμένες σε κάθε βιομηχανική εγκατάσταση (Westall & Filtenborg, 1998, Fadda et al.,

2001, Psomas et al., 2001). Μερικά από τα κύρια είδη των οποίων έχει γίνει ταυτοποίηση στη φέτα, συμπεριλαμβανομένης της άλμης, είναι τα *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, *Candida versatilis*, *Candida zeylanoides*, *Candida sake*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia farinosa*, *Pichia fermentans*, *Trichosporon ovoides*, *Torulasporea delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* και *Kluyveromyces lactis* (Kaminarides & Laskos, 1992, Westall & Filtenborg, 1998, Bintsis et al., 2000, Fadda et al., 2001, Psomas et al., 2001, Bintsis & Papademas, 2002, Rantsiou et al., 2008).



Εικόνα 1.2: Η κύρια μικροχλωρίδα της φέτας (Tzora et al., 2021).

1.3 Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στη φέτα

Το μικροβιακό οικοσύστημα κρίνεται ως ένα εκ των σημαντικότερων παραγόντων που επικρατεί κατά την παραγωγή, συμπεριλαμβανομένου του σταδίου ωρίμανσης, επηρεάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τόσο τα οργανοληπτικά όσο και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της φέτας. Η μικροβιολογία της φέτας έχει μελετηθεί σε αρκετές περιπτώσεις, ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι ομάδες μικροοργανισμών που εμπλέκονται υπόκεινται σε μια δυναμική εξέλιξη κατά την παραγωγή της

(Tzanetakis & Litoroulou-Tzanetaki, 1992, Manolopoulou et al., 2003). Κρίνεται μείζονος σημασίας ο χαρακτηρισμός της βιοποικιλότητας της φέτας σε επίπεδο είδους, δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί μπορούν να διαδραματίσουν ζωτικό ρόλο στην πορεία των οργανοληπτικών ιδιοτήτων, της θρεπτικής σύστασης, της ωρίμανσης, της γεύσης, του αρώματος, της διάρκειας ζωής και της ασφάλειας του τυριού (Rantsiou et al., 2008, Bozoudi et al., 2015).

Μέσω της ταχείας μείωσης του pH κατά την παραγωγή φέτας μπορεί να ελεγχθεί η ανάπτυξη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως κολοβακτηριδίων και ζυμών, ενώ συγχρόνως για να αποφευχθεί το μαλάκωμα του τυριού είναι επιθυμητή μια τιμή pH χαμηλότερη από 4,6 (Moatsou & Govaris, 2011). Οικογένειες αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως τα *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* και *Moraxellaceae* ανιχνεύονται σε υψηλότερο ποσοστό την ημέρα παραγωγής της φέτας και ο αριθμός τους τείνει μειούμενος κατά την ωρίμανση (Spyrelli et al., 2020), ενώ τα γένη *Pseudomonas* και *Acinetobacter* απομονώνονται επίσης από φρέσκια και ώριμη φέτα (Bozoudi et al., 2016).

Πιο αναλυτικά, η μεταγονιδιωματική ανάλυση σε φέτα έχει ανιχνεύσει την παρουσία γενών των οικογενειών *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* και *Pseudomonadaceae*, με τη συγκεκριμένη σειρά αφθονίας. Όσον αφορά την *Enterobacteriaceae*, απομονώνονται κυρίως τα γένη *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Raoultella* και *Leclercia* (Papadakis et al., 2021). Αρκετά μέλη αυτών των γενών διαθέτουν την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, καθιστώντας τα βακτήρια ανθεκτικότερα στους στρεσογόνους παράγοντες, ενώ γίνονται πιο “επίμονες” πηγές μόλυνσης και αλλοίωσης των τροφίμων (Cai et al., 2018). Αναφορικά με τις *Moraxellaceae* και *Pseudomonadaceae*, τα γένη που κυριαρχούν στη φέτα είναι τα *Acinetobacter* και *Pseudomonas* αντίστοιχα (Papadakis et al., 2021).

1.3.1 Ζύμες - μύκητες

Οι ζύμες και οι μύκητες αποτελούν δείκτη καλής υγιεινής κατάστασης στο τυρί. Παρατηρούμενα ελαττώματα, όπως τάγγιση, μαλάκωμα και χρωματικές αλλοιώσεις είναι αποτέλεσμα κυρίως εξαιτίας μόλυνσης από ζύμες και μύκητες (Sharaf et al., 2014). Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την παραγωγή τυριού, κρίνονται ανεπιθύμητες, καθώς μεταβολίζουν τα οργανικά οξέα προκαλώντας αύξηση του pH, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευνοϊκού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων (Moubasher et al., 2018).

1.3.1.1 Ζύμες

Οι ζύμες αποτελούν τους κύριους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στα λευκά τυριά άλμης επιδρώντας με αρνητικό τρόπο στα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τη διάρκεια ζωής των τελικών προϊόντων (Gonçalves Dos Santos et al., 2017, Khalil et al., 2018, Quintana et al., 2020). Οι ζύμες δύνανται να αναπτυχθούν στα λευκά τυριά άλμης, ακόμη και αν κατά την αποθήκευση επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπροσθέτως, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, λιπίδια, λακτόζη και οργανικά οξέα διαθέτουν ένα πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα που ευνοεί την ανάπτυξη των ζυμών και εμποδίζει ομάδες μικροοργανισμών μη ικανές να αναπτυχθούν σε χαμηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (Corbaci et al., 2012, Moubasher et al., 2018, Cenci-Goga et al., 2021). Ωστόσο, έχουν την ικανότητα να αυξάνουν το pH της επιφάνειας του τυριού, ευνοώντας έτσι την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* (Nussinovitch et al., 1987) και ενδεχομένως άλλων παθογόνων ή/και αλλοιωγόνων βακτηρίων (Bintsis & Papademas, 2002).

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας επηρεάζονται από το μολυσματικό επίπεδο λόγω ζυμών, το οποίο σε γενικές γραμμές δεν επιδρά αρνητικά, αλλά η ραγδαία ανάπτυξη των ζυμών ενδέχεται να προκαλέσει σημαντικές επιπτώσεις (Fadda et al., 2001, Bintsis & Papademas, 2002). Με την ανάπτυξη των ζυμών σε υψηλούς αριθμούς (συνήθως 5-6 log CFU (colony forming units)/g), οι ενζυμικές δραστηριότητες τους οδηγούν σε ποιοτική υποβάθμιση του τυριού, όπως μαλάκωμα της υφής, δυσάρεστες γεύσεις, αποχρωματισμό και διόγκωση των δοχείων (Cardoso et al., 2015, Atanassova et al., 2016, Garnier et al., 2017b, Tokak et al., 2019, Geronikou et al., 2020). Το πιο συχνά απομονωμένο είδος από το περιβάλλον των λευκών τυριών άλμης είναι το *D. hansenii*, πιθανώς λόγω του αλόφιλου χαρακτήρα και της σύνδεσης του με την άλμη (Hastrup et al., 2018). Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, τα είδη *Lachancea thermotolerans* (πρότερη ονομασία *Kluyveromyces thermotolerans*), *Tetrapisispora blattae* (προηγούμενη ονομασία *Kluyveromyces blattae*) και *Candida sphaerica* (ανάμορφο του *K. lactis*) απομονώθηκαν επιτυχώς από την άλμη της φέτας (Vivier et al., 1994) (Πίνακας 1.1). Όσον αφορά το τυρί, ο συνολικός αριθμός ζυμών στο τυρόπηγμα ποικίλει μεταξύ $10^2 - 10^3$ CFU/g και γενικά έχει αυξητική τάση κατά την περίοδο ωρίμανσης ($2,6 \times 10^3 - 4,6 \times 10^4$ CFU/g) (Manolopoulou et al., 2003). Ο χαρακτηρισμός της μικροχλωρίδας της φέτας γίνεται με τη χρήση τεχνικών τόσο εξαρτώμενων όσο και ανεξάρτητων από τις καλλιέργειες. Στην πλειονότητα των παραγωγικών μονάδων οι ζύμες βρίσκονται σε επίπεδα της τάξεως των 10^3 CFU/g. Το κυρίαρχο απομονωμένο είδος ζύμης είναι το *K. lactis* (79-83% του συνολικού πληθυσμού), ενώ οι ζύμες που απαντώνται περιστασιακά, και σε μικρότερο αριθμό, είναι οι *P. fermentans*, *P. membranifaciens* και *C. zeylanoides* (16-20% του συνολικού πληθυσμού). Η μειωμένη ποικιλότητα ζυμών που

παρατηρείται στη φέτα οφείλεται στη δύσκολη προσαρμογή στο ιδιαίτερο περιβάλλον της άλμης (Rantsiou et al., 2008).

Πίνακας 1.1: Τα είδη ζυμών που απαντώνται συχνότερα σε λευκά τυριά άλμης και στις άλμες τους (Kaminarides & Laskos, 1992, Vivier et al., 1994, Tzanetakis et al., 1996, Westall & Filtenborg, 1998, Papademas & Robinson, 2000, Bintsis et al., 2000) (Τροποποιήθηκε από: Bintsis & Papademas, 2002).

Είδη	Τύποι τυριών
<i>T. delbrueckii</i>	Τυρί τύπου φέτα Δανίας (αγελαδινό γάλα)
<i>D. hansenii</i>	
<i>C. sake</i>	
<i>Y. lipolytica</i>	
<i>K. marxianus</i>	
<i>Candida butyri</i>	Φέτα (πρόβειο γάλα)
<i>S. cerevisiae</i>	
<i>D. hansenii</i>	
<i>P. farinosa</i>	
<i>C. versatilis</i>	
<i>K. marxianus</i>	Τυρί τύπου φέτα Γαλλίας (πρόβειο γάλα)
<i>K. blattae</i>	
<i>C. sphaerica</i>	
<i>K. thermotolerans</i>	
<i>D. hansenii</i>	
<i>Candida parapsilosis</i>	Χαλούμι (πρόβειο γάλα)
<i>Candida boidinii</i>	
<i>C. versatilis</i>	
<i>P. membranifaciens</i>	
<i>Cryptococcus albidus</i>	
<i>P. membranifaciens</i>	Χαλούμι (αγελαδινό γάλα)
<i>S. cerevisiae</i>	
<i>C. famata</i>	
<i>P. membranifaciens</i>	
<i>D. hansenii</i>	
<i>S. cerevisiae</i>	Άλμη φέτας (πρόβειο γάλα)
<i>C. versatilis</i>	
<i>K. marxianus</i>	
<i>T. delbrueckii</i>	
<i>T. delbrueckii</i>	

1.3.1.2 Μύκητες

Η παραγωγή τυριού αντιμετωπίζει προβλήματα για τα οποία ευθύνονται πλήθος μυκήτων που ανήκουν σε έναν μεγάλο αριθμό γενών, όπως *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Eurotium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Lecanicillium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* και *Wallemia* (Garnier et al., 2017b). Εντούτοις, το *Penicillium* είναι το

συχνότερα απομονωμένο γένος από αλλοιωμένο τυρί ακολουθούμενο από το *Aspergillus* (Ropars et al., 2012, Marín et al., 2015, Garnier et al., 2017a, Garnier et al., 2017b, Anelli et al., 2019). Ενδεικτικά, το *Penicillium* χαρακτηρίζεται ως το κυρίαρχο γένος (91%) στα αλλοιωμένα σκληρά, ημί-σκληρα και ημι-μαλακά τυριά που προέρχονται από διαφορετικές χώρες (Lund et al., 1995). Όταν υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο η ανάπτυξη των μυκήτων στις επιφάνειες των τυριών λαμβάνει χώρα σε ικανοποιητικό βαθμό, με το χαμηλό pH να είναι εκλεκτικό για αυτούς (Sharaf et al., 2014). Στα συσκευασμένα τυριά, η ανάπτυξη των μυκήτων περιορίζεται λόγω της διαθεσιμότητας οξυγόνου, όμως ορισμένοι μύκητες έχουν την ευχέρεια να αναπτύσσονται υπό χαμηλή τάση οξυγόνου. Τα *Penicillium* και *Cladosporium* χαρακτηρίζονται ως τα γένη μυκήτων που συνήθως αναπτύσσονται στα υπό κενό αέρος συσκευασμένα τυριά (Hocking & Faedo, 1992). Ωστόσο, τα λευκά τυριά άλμης διατηρούνται σε δοχεία με άλμη, οπότε η ανάπτυξη μυκήτων είναι σπάνιο φαινόμενο, υπό την προϋπόθεση ότι το τυρί βρίσκεται πλήρως καλυμμένο με άλμη (Bintsis & Papademas, 2002).

Ένας αριθμός ειδών παράγει μυκοτοξίνες συνιστώντας κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Rippon, 1988). Ως εκ τούτου, οι αφλατοξίνες αποτελούν ένα σύνολο άκρως τοξικών δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων συγκεκριμένων ειδών του γένους *Aspergillus*. Η φέτα σε σπάνιες περιπτώσεις διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (20°C) για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, συνεπώς, η ταχεία ανάπτυξη τοξικογενών ασπεργίλλων, εφόσον υφίσταται, δεν θα αντιμετωπίζεται. Ακόμη, σημαντική είναι η ικανότητα του χλωριούχου νατρίου στην πρόληψη ή μείωση του επιπέδου των υπολειμμάτων αφλατοξίνης B1 και G1 στη φέτα. Το είδος *Aspergillus flavus* έχει τη δυνατότητα παραγωγής αφλατοξινών στη φέτα μετά από προσβολή με σπόρια τοξικογενών ασπεργίλλων της επιφάνειας του τυριού. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ο ενδεχόμενος κίνδυνος για την φυσική εμφάνιση αφλατοξινών στη φέτα έχει πραγματική υπόσταση δεδομένης της ύπαρξης ιδανικών συνθηκών για την ανάπτυξη ασπεργίλλων, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλότερης συγκέντρωσης αλατιού στο τυρί (Ketney et al., 2008).

1.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί στη φέτα

Το ποσοστό επιβίωσης ή/και ο ρυθμός ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων που συναντώνται στα τυριά βασίζονται στις οικολογικές συνθήκες (a_w , pH, περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο, θερμοκρασία ωρίμανσης) που επικρατούν στο τυρί και/ή την άλμη. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα και ειδικότερα τα παρασκευασμένα με παραδοσιακό τρόπο τυριά θεωρούνταν ανέκαθεν ως θρεπτικά και ασφαλή. Ωστόσο, στη γαλακτοβιομηχανία υπήρξαν μερικά γεγονότα με αρνητικό αντίκτυπο σχετικά με την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο τυρί (Bintsis & Papademas, 2002). Τα *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* και

Salmonella spp. συνιστούν τα κύρια τροφιμογενή παθογόνα που απαντώνται στα λευκά τυριά άλμης (Bintsis & Papademas, Papadimitriou et al., 2022).

Η παρουσία των παθογόνων *L. monocytogenes* ή *E. coli* O157:H7 στο πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα και τα αντίστοιχα τυροκομικά προϊόντα έχει επαληθευτεί στο παρελθόν, ενώ αναφορές για εξάρσεις σχετιζόμενες με την κατανάλωση πρόβειου ή κατσικίσιου τυριού εξαιτίας αυτών των παθογόνων έχουν γίνει σε αρκετές χώρες (EFSA, 2009). Παρά τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα τους σε υγρασία, οι εξάρσεις τροφιμογενών ασθενειών εξαιτίας των λευκών τυριών άλμης είναι μηδαμινές, πιθανώς λόγω του χαμηλού pH και του υψηλού ποσοστού σε χλωριούχο νάτριο των συγκεκριμένων τυριών (Bintsis & Papademas, 2002). Το παθογόνο *L. monocytogenes*, εάν υπάρχει στη φέτα, είναι ικανό να επιβιώνει για χρονικό διάστημα άνω των 2 μηνών ωρίμανσης που απαιτούνται από τη νομοθεσία (Papageorgiou & Marth, 1989, Ramsaran et al., 1998, Erkmen, 2000, Morgan et al., 2001), με τα *Listeria spp.* να έχουν τη δυνατότητα επιβίωσης σε δοχεία με φέτα μέχρι τη λιανική πώληση (Gohil et al., 1995). Κατά συνέπεια, η παρουσία στελεχών *L. monocytogenes* στις τυροκομικές μονάδες και συγχρόνως στη φέτα κρίνεται ως ένας δυνητικός κίνδυνος (Bintsis & Papademas, 2002).

Όσον αφορά το παθογόνο *E. coli* O157:H7 μπορεί να επιβιώσει στις όξινες συνθήκες της φέτας και της άλμης και σε τιμές pH μικρότερες του 4,5 για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Govaris et al., 2002). Επιπλέον, η επιβίωση του για σχεδόν 50 ημέρες σε φέτα με τιμή pH χαμηλότερη από 4,6 είναι εφικτή, ενώ παράλληλα το συγκεκριμένο pH ενδέχεται να είναι ανασταλτικό για την επιβίωση και ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων (Karaioanoglou et al., 1985, Papageorgiou & Marth, 1989). Η επίδραση του pH στη μείωση του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 εξαρτάται από τη θερμοκρασία, με υψηλότερη επίδραση να παρατηρείται κατά τη διατήρηση σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Duffy et al., 1999). Η μολυσματική δόση του παθογόνου είναι πολύ χαμηλή της τάξεως των 10-40 CFU/ml, η οποία μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή (Karaioanoglou et al., 1985). Επομένως, οι παρασκευαστές και χειριστές της φέτας οφείλουν να είναι προσεκτικοί ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση του τυριού από το συγκεκριμένο παθογόνο (Govaris et al., 2002).

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* μπορεί να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί στη φέτα για 1 μήνα στη περίπτωση που το pH δεν αναπτύσσεται κανονικά και λαμβάνει τιμές άνω του 4,5 (Karaioanoglou et al., 1985). Ωστόσο, το *Y. enterocolitica* αδρανοποιείται και εν τέλει καταστρέφεται όταν η οξύτητα της φέτας αναπτύσσεται κανονικά. Ο πληθυσμός που βρίσκεται στη φέτα μπορεί να υφίσταται μείωση ανάλογα με τη συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου, τη δραστηριότητα των καλλιεργειών εκκίνησης και του χρόνου αποθήκευσης (Erkmen, 1996).

Η επιβίωση των *Salmonella spp.* δεν μπορεί επιτευχθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου, ενώ συγκεντρώσεις άλμης πάνω από 9% χαρακτηρίζονται ως βακτηριοκτόνες (Jay, 1978). Οι επικρατούσες θερμοκρασίες κατά την ωρίμανση της φέτας (17-18°C) δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του γένους *Salmonella*, ωστόσο η θερμοκρασία αποθήκευσης (4°C) μπορεί να διαδραματίσει περιοριστική δράση (Paradouroulou et al., 1993). Το pH αποτελεί τον κύριο παράγοντα που ευθύνεται για τη μείωση των ζώντων βακτηρίων *Salmonella typhimurium* στη φέτα κατά την επεξεργασία και ωρίμανση. Ο πληθυσμός του *S. typhimurium* είναι μικρότερος στα τυριά που παρασκευάζονται με την εισαγωγή καλλιέργειας εκκίνησης εν αντιθέσει με εκείνα που δεν χρησιμοποιείται (Erkmen & Bozoğlu, 1995). Βέβαια, η ανασταλτική δράση των καλλιιεργειών εκκίνησης ενδέχεται να είναι το αποτέλεσμα της πτώσης του pH λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος (Goerfert et al., 1968, Hargrove et al., 1969, Park et al., 1970, Speck, 1972) και κάποιων παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, όπως αντιβιοτικές ουσίες και υπεροξείδιο του υδρογόνου (Erkmen & Bozoğlu, 1995).

Συνήθως, κατά τα πρώτα στάδια παραγωγής των τυριών οι εντεροτοξινογόνοι σταφυλόκοκκοι έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να παράγουν εντεροτοξίνες, όταν το pH του τυροπήγματος βρίσκεται ακόμη σε υψηλά επίπεδα (5-6) και τα ανταγωνιστικά οξυγαλακτικά βακτήρια δεν έχουν ακόμη σχηματίσει μεγάλους πληθυσμούς (Mantis & Parageorgiou, 2003). Όταν η δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι καλή και η ζύμωση της φέτας συνεχίζεται με ικανοποιητικό ρυθμό, η ανάπτυξη του *S. aureus* γίνεται μόνο τις 2-3 πρώτες ώρες που έπονται της πήξης και μόνο με αρχικό εμβολιασμό μεγαλύτερο των 10³ CFU/ml γάλακτος, ενώ η αύξηση αυτού του πληθυσμού κατά 2-3 λογαρίθμους δεν συνεπάγεται παραγωγή εντεροτοξίνης (Mantis, 1973). Τα λευκά τυριά άλμης, μεταξύ των οποίων και η φέτα, δεν αποτελούν πρόσφορο περιβάλλον για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών (Mantis & Parageorgiou, 2003).

1.4.1 *Listeria monocytogenes*

Το *L. monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram, μη-σπορογόνο, προαιρετικά αναερόβιο, ψυχρότροφο παθογόνο βακτήριο με χαμηλή περιεχόμενη γουανίνη - κυτοσίνη (G-C) (Monk et al., 2008). Έχει ραβδοειδή μορφή με διάμετρο 0,5 μm και μήκος 0,5-2 μm κατά προσέγγιση, ενώ είναι θετικό ως προς την καταλάση και αρνητικό ως προς την οξειδάση (Magalhães et al., 2014). Χαρακτηρίζεται ως το μόνο είδος του γένους *Listeria* που εμπνέει ανησυχία για την ανθρώπινη υγεία (Kathariou, 2002). Η θνησιμότητα των σοβαρών περιστατικών λιστερίωσης κυμαίνεται μεταξύ 20-30% (Buchanan et al., 2004). Οι υγιείς άνθρωποι, συνήθως, δεν είναι ευπαθείς στο *L. monocytogenes*, ωστόσο ενδέχεται να προκαλέσει σημαντικές επιπτώσεις σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως ηλικιωμένοι, νεογέννητα και έγκυες γυναίκες (Buchanan et al., 2017). Μπορεί να

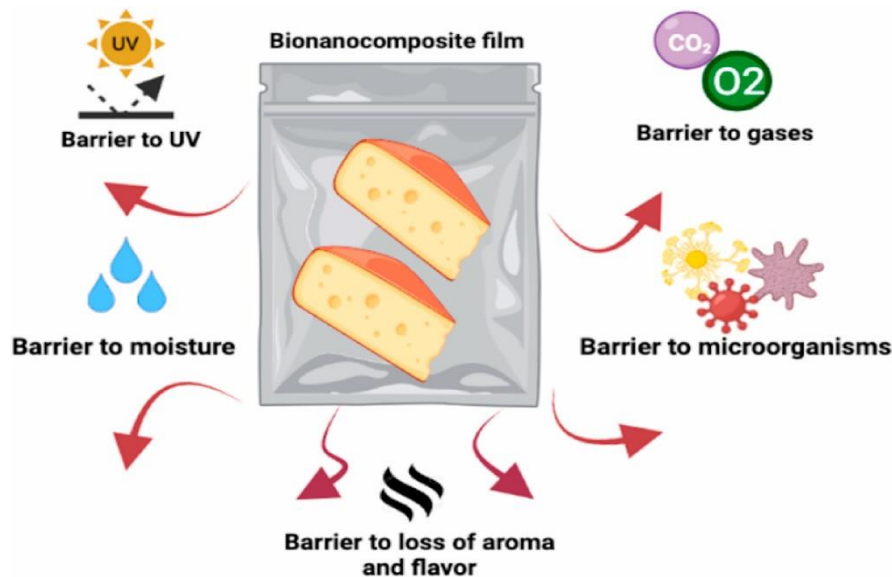
αναπτυχθεί σε τιμές pH από 4,6 έως 9,5 και ενεργότητας νερού άνω του 0,92 (Buchanan et al., 2004, Gandhi & Chikindas, 2007), ενώ δύναται να πολλαπλασιαστεί έως και μερικούς βαθμούς κάτω των 0°C (Carpentier & Cerf, 2011). Χάρη στη διαδεδομένη φύση και τον ψυχρότροφο χαρακτήρα του, καθίσταται επιτρεπτή η ευρέως παρατηρούμενη (διασταυρούμενη) επιμόλυνση των τροφίμων κατά την επεξεργασία, διανομή και αποθήκευση τους κάτι που μπορεί να αποτελέσει σημαντική απειλή για τη μικροβιολογική ασφάλεια των υπό ψύξη RTE (ready-to-eat) τροφίμων (Angelidis et al., 2002, NACMCF, 2005, Lianou & Sofos, 2007). Ο νέος Κανονισμός της Ε.Ε. σχετικά με τα μικροβιολογικά κριτήρια για το *L. monocytogenes* στα RTE τρόφιμα έχει θέσει ανώτατο όριο τα 100 CFU/g κατά τη διάρκεια ζωής των προϊόντων που διατίθενται στην αγορά (EC, 2005). Η εκτίμηση σε επίπεδο Ε.Ε. της αναλογίας δειγμάτων με *L. monocytogenes* άνω των 100 CFU/g στο τέλος της διάρκειας ζωής για τα RTE τυριά είναι 0,06% (EFSA, 2018). Το συγκεκριμένο παθογόνο μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια σοβαρή ανησυχία, καθώς έχουν γίνει γνωστά κρούσματα με πρόκληση θανάτων εξαιτίας της κατανάλωσης μιας ποικιλίας μαλακών και ημίσκληρων τυριών (Campagnollo et al., 2018). Η παρουσία του στα γαλακτοκομικά προϊόντα υποδηλώνει την ανεπαρκή παστερίωση του γάλακτος (Cadavez et al., 2019) ή την επιμόλυνση μετά την παστερίωση λόγω ελλειπών συνθηκών υγιεινής κατά την τυροκόμηση (Karpetanakou et al., 2017). Δύναται να επιβιώσει σε χαμηλές θερμοκρασίες (0°C), χαμηλό pH (pH 4,40) και σε αλατούχο διάλυμα με 10-20% (w/v) NaCl (Almeida et al., 2013), φυσικοχημικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα της συντήρησης της φέτας που απαιτούν μελέτες αξιολόγησης κινδύνου (Papadopoulou et al., 2018). Στην Ελλάδα, η παρουσία του *L. monocytogenes* στη φέτα έχει επιβεβαιωθεί μέσω της τεχνικής μεταγονιδιωματικής ανάλυσης shotgun (Papadimitriou et al., 2022), ενώ το Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (RASFF) εξέδωσε ειδοποίηση για την παρουσία του στο εν λόγω τρόφιμο (RASFF, 2022).

1.5 Συσκευασία τυριών

Η συσκευασία τροφίμων δύναται να επιδράσει στη διατήρηση των ευεργετικών αποτελεσμάτων της επεξεργασίας, την επιβράδυνση της αλλοίωσης του προϊόντος, την παράταση της διάρκειας ζωής, καθώς και τη διατήρηση ή αύξηση της ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων (Marsh & Bugusu, 2007).

Η πλειονότητα των ερευνών αναφορικά με τη διάρκεια ζωής και την αποθήκευση των τυριών σχετίζεται με τις αρνητικές επιπτώσεις που προκύπτουν λόγω μικροβιακής μόλυνσης, ενώ οι υψηλές απώλειες υγρασίας σε ορισμένα είδη εξαιτίας απουσίας φραγμού στη συσκευασία ενδέχεται να αυξήσουν τη σκληρότητα και να επηρεάσουν αρνητικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες τους (Mei et al., 2020). Η συσκευασία των τυριών αφορά κατά βάση την προστασία των προϊόντων από άσχημες

περιβαλλοντικές συνθήκες, μικροβιακή αλλοίωση και μηχανική καταπόνηση στα στάδια της αποστολής και διανομής (Berti et al., 2019). Τόσο η απώλεια βάρους όσο και οι οργανοληπτικές ιδιότητες του τυριού επηρεάζονται από τη σχετική υγρασία του περιβάλλοντος εντός της συσκευασίας. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή της βέλτιστης συσκευασίας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της μεταφοράς οξυγόνου και της απώλειας υγρασίας, την προστασία από διάφορους μικροοργανισμούς και τη βελτίωση της υφής, της εμφάνισης και των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τυριού (Jafarzadeh et al., 2021) (Εικόνα 1.3). O₂



Εικόνα 1.3: Οι ιδιότητες φραγμού των βιονανοσύνθετων μεμβρανών και επικαλύψεων που επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής του τυριού (Jafarzadeh et al., 2021).

1.7.1 Συσκευασία λευκών τυριών άλμης

Η διανομή των λευκών τυριών άλμης σε μεγαλύτερο εύρος περιοχών απαιτεί κάποιες αλλαγές στη συσκευασία. Ωστόσο, η τάση για προσυσκευασμένο τυρί, που προσφέρει περισσότερη ευκολία, ασφάλεια και ανταποκρίνεται όπως καταναλωτικές συνήθειες παρουσιάζει αυξητική πορεία και στα λευκά τυριά άλμης (Alichanidis & Polychroniadou, 2008).

Τα παραγόμενα κομμάτια έχουν αρκετές διακυμάνσεις ως όπως το σχήμα, αλλά ως επί το πλείστον είναι ορθογώνιο ή κυβοειδές με βάρος 250-1000 g, ενώ η συσκευασία όπως γίνεται σε δοχεία ποικίλων χωρητικότητας. Τα συνηθέστερα είναι τα λευκοσιδηρά δοχεία ορθογώνιου σχήματος, τα λακαρισμένα δοχεία από μέταλλο ή πλαστικό χωρητικότητας έως 15-16 kg ή τα παραδοσιακά, ξύλινα βαρέλια χωρητικότητας 40-50 kg (Alichanidis & Polychroniadou, 2008, Geronikou et al., 2020). Μόλις ολοκληρωθεί η ωρίμανση τα λευκά τυριά άλμης επανασυσκευάζονται σε πλαστικά δοχεία με άλμη (8-10% συγκέντρωση NaCl) ή σε πλαστικές συσκευασίες υπό κενό αέρος (χωρίς άλμη)

(Alichanidis & Polychroniadou, 2008). Τα τελευταία χρόνια, αντί όπως άλμης, αποθηκεύονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε συσκευασίες κενού αέρος ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) (Govaris et al., 2011, Hayaloglu et al., 2012, Robertson, 2013), καθώς λόγω όπως καλύτερης εμφάνισης, όπως διατήρησης όπως ποιότητας και όπως παράτασης όπως διάρκειας ζωής η MAP εφαρμόζεται σε σημαντικό_βαθμό (Singh et al., 2012, Robertson, 2013). Ενώ η μείωση όπως περιεκτικότητας των λευκών τυριών άλμης σε NaCl θα οδηγήσει σε μεγαλύτερη αποδοχή από την παγκόσμια αγορά (Ayyash & Shah, 2011), η επίτευξη όπως όπως μείωσης χαρακτηρίζεται δύσκολη χωρίς να επηρεαστεί με αρνητικό τρόπο η μικροβιολογική και οργανοληπτική ποιότητα (Bintsis, 2006).

Η παραγωγή CO₂ και αιθανόλης, που αποτελούν τα κύρια υποπροϊόντα του μεταβολισμού των ζυμών, μπορεί να προκαλέσει διόγκωση των δοχείων τυριού (Bintsis et al., 2000). Επιπλέον, όταν η αιθανόλη αντιδρά με λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου για τον σχηματισμό διάφορων εστέρων ενδέχεται να αναπτυχθεί μια φρουτώδης γεύση (Laslo & György, 2018). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί παραγωγή αερίων σε δοχεία και συσκευασίες τυριού όταν οι ζύμες που ζυμώνουν τη λακτόζη συναντώνται σε πληθυσμούς συνήθως πάνω από 10⁶ CFU/g (Bintsis et al., 2000, Fadda et al., 2001, Sharaf et al., 2014). Σε αρκετές μελέτες σχετικές με προβλήματα διογκωμένων συσκευασιών σε λευκά τυριά άλμης έχουν εμφανιστεί αλλοιωγόνες ζύμες. Επί παραδείγματι, η διόγκωση των συσκευασιών τυριών τύπου φέτα κατά την αποθήκευση σε τυροκομία όπως Δανίας οφείλεται στο γαλακτικό και τον πολλαπλασιασμό όπως ζύμης *T. Delbrueckii* (Westall & Filtenborg, 1998), ενώ οι ζύμες *Dekkera anomala* και *K. Lactis* ευθύνονται για τη διόγκωση συσκευασιών με τύπου φέτα τυρί από τη Σαρδηνία (Fadda et al., 2001).

1.7.1.1 Συσκευασία φέτας

Μέχρι και πριν από λίγα χρόνια η φέτα πωλούνταν χύμα. Κάτι τέτοιο δεν υφίσταται πλέον, με όπως μικρότερες συσκευασίες, όπως συσκευασίες κενού αέρος και πλαστικά δοχεία με άλμη, να κάνουν την εμφάνιση όπως και να μεταβάλλουν τον τρόπο πώλησης όπως. Το άνοιγμα μιας τυπικής συσκευασίας φέτας μπορεί να προκαλέσει εντός λίγων ημερών την έναρξη μολυσματικών διεργασιών, ειδικά όταν η συσκευασία στερείται άλμης, γεγονός που οδηγεί στην ταχύτερη αλλοίωση του τυριού (Alexopoulos et al., 2011). Η αποθήκευση όπως φέτας παραδοσιακά γίνεται σε άλμη, ωστόσο τα τελευταία χρόνια για όπως ανάγκες όπως λιανικής το τυρί συχνά συσκευάζεται σε MAP όπως 4°C (Govaris et al., 2011).

Ένα κομμάτι τυριού που είναι συσκευασμένο υπό κενό αέρος δεν δύναται να αυξηθεί σε βάρος, αλλά όταν αποθηκεύεται μπορεί να απωλέσει βάρος σε ενδεχόμενη συναίρεση. Κατά την αποθήκευση του τυριού Mozzarella σε συνθήκες ψύξης, το νερό που υπάρχει όπως θύλακες ορού του τυριού μετά την Παρασκευή του απορροφάται στην πρωτεϊνική μήτρα. Παράλληλα, η πρωτεϊνική μήτρα

διαστέλλεται και τελικά καταλαμβάνει όλο τον χώρο πλην αυτού που βρίσκονται τα σφαιρίδια λίπους (McMahon et al., 1999). Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται στη μικροδομή όπως φέτας όταν τοποθετείται σε άλμη όπως 3°C (McMahon et al., 2009). Από μικροβιολογικής άποψης, οι ζύμες *T. Blattae*, *C. Sphaerica* και *L. Thermotolerans*, που έχουν απομονωθεί από άλμη φέτας, βρέθηκε να είναι υπεύθυνες για την παραγωγή αερίων σε συσκευασμένη φέτα (Vivier et al., 1994).

1.8 Βιοσυντήρηση

Η βιοσυντήρηση αποτελεί μια ευρέως αναγνωρισμένη τεχνική για τον έλεγχο και την αναστολή όπως ανάπτυξης διάφορων τροφιμογενών παθογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ιδιαίτερα στα τυριά (Asare et al., 2018). Έχει αναπτυχθεί αξιοποιώντας βακτηριακά κύτταρα ή μεταβολίτες μικροοργανισμών, ειδικά οξυγαλακτικών βακτηρίων, προκειμένου να κατασταλεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Bagci et al., 2019, Pinto et al., 2020). Η χρήση βιοπροστατευτικών και αυτόχθονων στελεχών LAB κρίνεται μείζονος σημασίας στην παραγωγή και τη συντήρηση των παραδοσιακών τυριών (Topisirovic et al., 2006). Η βιοσυντήρηση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια βασίζεται κυρίως στην παραγωγή όπως πλήθους ενώσεων με αντιμικροβιακό χαρακτήρα. Το διακετύλιο, η αιθανόλη, η ρεουτερίνη, τα οργανικά οξέα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το CO₂, οι βακτηριοσίνες και άλλοι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες των LAB δύνανται να έχουν προστατευτικό ρόλο από όπως αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς για τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση (Mani-López et al., 2018, Agriopoulou et al., 2020). Το πεδίο δράσης των βακτηριοσινών έναντι ορισμένων τροφιμογενών παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, η αντοχή όπως τόσο σε χαμηλές τιμές pH όσο και υψηλές θερμοκρασίες, αλλά και η ευαισθησία όπως στα ανθρώπινα πρωτεολυτικά ένζυμα αποτελούν χαρακτηριστικά με ιδιαίτερη χρησιμότητα στην αξιοποίηση των συγκεκριμένων ενώσεων για τη βιοσυντήρηση των τροφίμων (Masuda et al., 2011).

Λόγω όπως ανοχής που παρουσιάζουν τα *Enterococcus spp.* Και *Lactobacillus spp.* Στο θερμικό στρες, όπως υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου, το όξινο περιβάλλον και όπως αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να παρουσιαστούν σε έναν σημαντικό αριθμό ζυμωμένων τροφίμων (Müller et al., 2001, Omar et al., 2004). Σε αρκετές περιπτώσεις συναντώνται σε μεγάλους πληθυσμούς, ενώ πιστεύεται ότι συντελούν στην ωρίμανση και την ανάπτυξη του αρώματος των τυριών, ιδίως των παραγόμενων στην ευρύτερη περιοχή όπως Μεσογείου τυροκομικών προϊόντων (Foulquié-Moreno et al., 2006), λόγω των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών δραστηριοτήτων, καθώς και όπως παραγωγής διακετυλίου (Giraffa, 2003). Η αποτελεσματικότητα που διακρίνει το γένος *Lactobacillus* και τη βακτηριοσίνη του έναντι των βακτηρίων χαρακτηρίζεται ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στα φυσικά συντηρητικά τα οποία χρησιμοποιούνται για την

παρεμπόδιση ή τη μείωση όπως ανάπτυξης του τροφιμογενούς παθογόνου *S. aureus* (Silva et al., 2018, Christensen et al., 2021, Pato et al., 2022).

Το *Lc. Lactis* κρίνεται ως ένα από τα πιο σημαντικά είδη των LAB. Η νισίνη, που παράγεται από τα στελέχη του, έχει μια ευρέως φάσματος ανασταλτική επίδραση στα Gram θετικά βακτήρια, όπως το *L. Monocytogenes* στα τρόφιμα (Benech et al., 2002, Jozala et al., 2005). Ακόμη, ο έλεγχος και η μείωση όπως βακτηριακής μόλυνσης προερχόμενης από αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως το *E. Coli*, που προκαλείται από ανεπαρκή παστερίωση ή επιμόλυνση μετά την παστερίωση, με την προσθήκη ασφαλούς βιοσυντηρητικού, όπως η νισίνη, ή νισινογόνου στελέχους *Lc. Lactis*, είναι πολύ σημαντικά στο τυρί (Mirdamadi & Agha Ghazvini, 2015).

1.8.1 *Lactiplantibacillus pentosus* L33 και *Lactiplantibacillus plantarum* L125

Το *Lactobacillus* αποτελεί ένα γένος με ιδιαίτερη ποικιλομορφία που περιλαμβάνει θετικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια, μη-σπορογόνα, ετερο- ή ομοζυμωτικά βακτήρια που συναντώνται σε ένα μεγάλο εύρος ενδιαιτημάτων πλούσιων σε θρεπτικά συστατικά (Duar et al., 2017). Το *Lactiplantibacillus pentosus* είναι ένα πρόσφατα αναταξινομημένο είδος, που παλαιότερα ήταν γνωστό με την ονομασία *Lactobacillus pentosus* (Zheng et al., 2020). Περιέχει στελέχη απομονωμένα από ποικίλα περιβάλλοντα, που κυμαίνονται από τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση έως τη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα των θηλαστικών (Inglin et al., 2018). Επιπλέον, συγκεκριμένα στελέχη θεωρείται πως έχουν προβιοτικές ιδιότητες, ενώ όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες δύνανται να προσφέρουν σημαντικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή (FAO/WHO, 2002). Αρκετά στελέχη εμφανίζουν έντονο ενδιαφέρον από βιοτεχνολογικής άποψης, λόγω όπως ζυμωτικής ικανότητας όπως, ενώ ενσωματώνονται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ποικίλα γαλακτοκομικά και μη προϊόντα (Kok & Hutkins, 2018). Η εξόρυξη γονιδιωμάτων σε στελέχη *L. Pentosus* και η συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση με το στενά συγγενικό είδος *L. Plantarum* έχουν αποκαλύψει λειτουργικά χαρακτηριστικά εμπλεκόμενα στον προβιοτικό φαινότυπο, όπως η παρουσία γονιδίων που έχουν εμπλοκή στην προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο και την παραγωγή βακτηριοσίνης (Maldonado-Barragán et al., 2011), τη μεταβολική ικανότητα (Abriouel et al., 2017) και την απόκριση στο στρες (Ye et al., 2020).

Το *L. Pentosus* L33 είναι ένα στέλεχος που ανήκει στα LAB, το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από παραδοσιακό προϊόν κρέατος, συγκεκριμένα από ζυμωμένα λουκάνικα (Pavli et al., 2016). Το συγκεκριμένο στέλεχος πληροί τα κύρια κριτήρια για την επιλογή του ως προβιοτικό, καθώς παρουσιάζει ανεκτικότητα όπως επικρατούσες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα, ευαισθησία στα κοινά αντιβιοτικά και γ-αιμολυτική δράση. Τα γονίδια του εμπλέκονται στην πλήρη βιοσύνθεση

7 αμινοξέων (θρεονίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη, λυσίνη, αργινίνη, προλίνη, ιστιδίνη), ενώ ευθύνονται για την κωδικοποίηση μέρους των απαιτούμενων πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη βιοσύνθεση των υπόλοιπων 13 αμινοξέων (Stergiou et al., 2021).

Όσον αφορά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, το *L. Pentosus* L33 κωδικοποιεί για τα ένζυμα που έχουν εμπλοκή στη σύνθεση και την αποικοδόμηση ποικίλων απλών και σύνθετων υδατανθράκων, όπως γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, τρεαλόζη, ξυλόζη, χιτίνη και κυτταρίνη (Stergiou et al., 2021). Επιπροσθέτως, κωδικοποιεί για μονάδες δέσμευσης γαλακτόζης, λακτόζης, αμύλου και γλυκογόνου που διευκολύνουν την καταλυτική δράση των υδρολασών (Boraston et al., 2004). Συνεπώς, το *L. Pentosus* L33 δύναται να διαβιεί σε ένα ευρύ φάσμα ενδαιτημάτων (Stergiou et al., 2021).

Το *L. Pentosus* L33 δεν φέρει μεταβιβάσιμα γονίδια που να παρουσιάζουν αντοχή στα αντιβιοτικά (Stergiou et al., 2021). Εξαιρώντας τη βανκομυκίνη, η επιβίωση του στελέχους από θεραπείες με κοινά αντιβιοτικά δεν είναι ικανή να επιτευχθεί (Pavli et al., 2016). Η αντίσταση στελεχών του γένους *Lactobacillus* στη βανκομυκίνη θεωρείται εγγενής (Guo et al., 2017), επομένως δεν καθίσταται περίεργο που το *L. Pentosus* L33 εμφανίζει αντοχή σε αυτό το αντιβιοτικό (Stergiou et al., 2021).

Όσον αφορά τα στελέχη *L. Plantarum*, χαρακτηρίζονται από έναν νομαδικό τρόπο ζωής, καθώς μπορούν να συναντηθούν είτε ελεύθερα σε περιβάλλοντα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, όπως λαχανικά, είτε σε συσχέτιση με ασπόνδυλους ή σπονδυλοτούς ξενιστές (Martino et al., 2016). Όπως σημαντικός αριθμός στελεχών του διαθέτει συστάδες για τη σύνθεση βακτηριοσινών οι οποίες μπορούν να περιορίσουν την ταχεία αλλοίωση των τροφίμων ή/και τον πολλαπλασιασμό κλινικά συναφών βακτηρίων (Yu et al., 2014). Η άμεση αντιμικροβιακή δράση του *L. Plantarum* μπορεί να προκληθεί από την έκκριση ανασταλτικών ενώσεων, όπως βακτηριοσίνες (da Silva Sabo et al., 2014), λιπαρά οξέα, αιθανόλη και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Chen et al., 2019) ή με ανταγωνιστικό αποκλεισμό παθογόνων (Sengupta et al., 2013). Στελέχη με πιθανές προβιοτικές ιδιότητες εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία παραγωγής λειτουργικών τροφίμων, ενώ αρκετά στελέχη *L. Plantarum* έχουν αξιοποιηθεί ως εκκινητές ή συμπληρωματικές καλλιέργειες εκκίνησης τόσο γαλακτοκομικών (Harahap et al., 2021) όσο και μη γαλακτοκομικών (Frediansyah et al., 2021) ζυμωμένων τροφίμων.

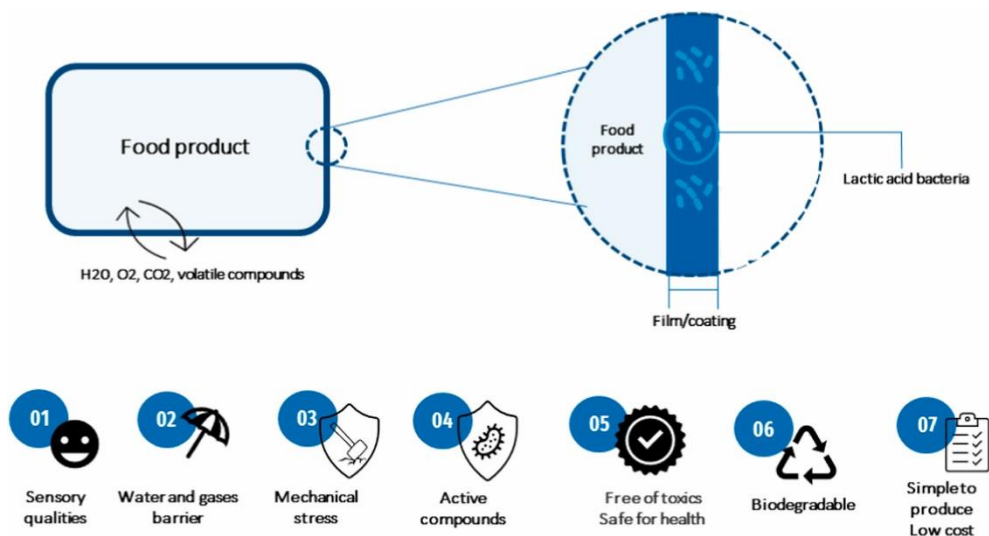
Το *L. Plantarum* L125 είναι ένα στέλεχος με πιθανά προβιοτικά χαρακτηριστικά που υπάγεται στα LAB και απομονώθηκε για πρώτη φορά από παραδοσιακό προϊόν κρέατος, ειδικότερα από ζυμωμένα λουκάνικα (Pavli et al., 2016), ενώ έχει ενσωματωθεί επιτυχώς ως συμπληρωματική

καλλιέργεια εκκίνησης σε ξηρά ζυμωμένα χοιρινά λουκάνικα (Pavli et al., 2020). Επιδεικνύει προβιοτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν όπως προοπτικές, όπως ανοχή όπως χαμηλές τιμές pH, τα χολικά άλατα και τη μερική δράση υδρολάσης χολικού άλατος, ενώ εμφανίζει ευαισθησία στα κοινά αντιβιοτικά και γ-αιμολυτική δράση. Η επιβίωση του στελέχους από θεραπείες που περιλαμβάνουν κοινά αντιβιοτικά δεν δύναται να επιτευχθεί, με μόνη εξαίρεση τη βανκομυκίνη (Pavli et al., 2016). Το *L. Plantarum* L125 διαθέτει πλήρεις βιοσυνθετικές οδούς για 8 από τα 20 αμινοξέα (θρεονίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη, λυσίνη, αργινίνη, προλίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη), επομένως με αυτόν τον τρόπο τονίζεται η ανάγκη για παροχή αμινοξέων από περιβάλλοντα πυκνά σε θρεπτικά συστατικά (Tegopoulos et al., 2021).

1.9 Εδώδιμες μεμβράνες

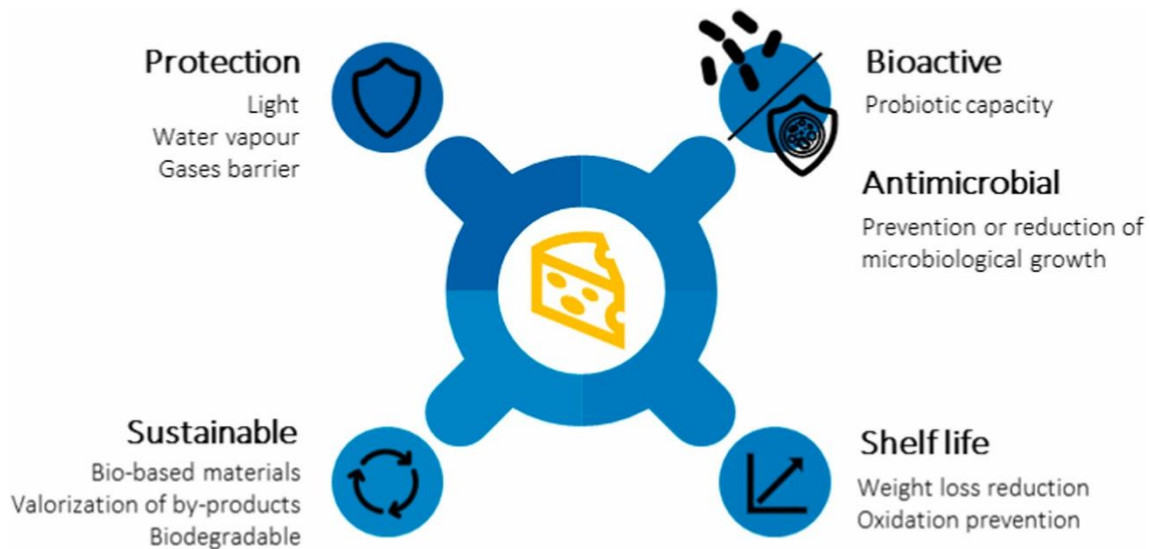
Όπως τελευταίες δεκαετίες υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των εδώδιμων μεμβρανών (edible films) και επικαλύψεων (coatings), καθώς οι καταναλωτές αναζητούν περιβαλλοντικά φιλικούς τρόπους συσκευασίας (Galus et al., 2020, Rai et al., 2021, Yan et al., 2022), ενώ λόγω όπως εφαρμογής όπως ως εναλλακτική λύση των πλαστικών στη συσκευασία τροφίμων έχουν μεγάλη αποδοχή (Smaoui et al., 2022). Η Παρασκευή όπως μπορεί να γίνει από κατάλληλους για τρόφιμα πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα συστατικά, όπως πλαστικοποιητές, για τη βελτίωση ή τροποποίηση όπως βασικής λειτουργικότητας αυτών των πολυμερών (Sharma et al., 2022). Ως πλεονέκτημα των μεμβρανών χαρακτηρίζεται η ικανότητα να λειτουργούν ως φορείς μιας σειράς από βιοδραστικές ενώσεις, όπως τα αντιμικροβιακά, που ενισχύουν τόσο την ασφάλεια όσο και την οργανοληπτική ποιότητα των τροφίμων μειώνοντας τον κίνδυνο μόλυνσης από παθογόνους ή/και αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Sun et al., 2022). Επιπλέον, για τη βελτίωση όπως εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου οι εδώδιμες μεμβράνες δύναται να ενεργήσουν ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, η ενσωμάτωση οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικές ή αντιμικροβιακές ιδιότητες θεωρείται μια καινοτόμος τεχνολογία με μεγάλη επίδραση στην ενίσχυση όπως ασφάλειας και την παράταση όπως διάρκειας ζωής των τροφίμων, αλλά και την αύξηση των οφελών για την υγεία του καταναλωτή (Silva et al., 2023b). Οι μεμβράνες καθιστούν την εισαγωγή προβιοτικών στα τρόφιμα ευκολότερη και πιο προσιτή, ενισχύοντας την επιβίωση των βακτηρίων κατά την αποθήκευση και κατανάλωση (Guimarães et al., 2018). Η προσθήκη όπως οδηγεί στη βελτίωση όπως διαπερατότητας υδρατμών (Akman et al., 2021, Sogut et al., 2022), ενώ παρατηρείται μείωση όπως αντοχής σε εφελκυσμό των μεμβρανών (Nisar et al., 2022, Wai et al., 2022). Η ιδανική μεμβράνη ή επικάλυψη θα πρέπει να διαθέτει μια σειρά από χαρακτηριστικά, όπως υψηλή μικροβιακή σταθερότητα, υψηλή μηχανική αντοχή, εξαιρετικές οργανοληπτικές ιδιότητες, ισχυρό προστατευτικό

φραγμό, ασφάλεια για την ανθρώπινη υγεία, απουσία τοξινών, ευκολία παραγωγής και καλή σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας (Jeevahan et al., 2020) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Ιδιότητες μιας ενεργού συσκευασίας σε εδωδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις (Silva et al., 2023c).

Η χρήση εδωδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων στα τυροκομικά προϊόντα προσφέρει ένα σημαντικό αριθμό πλεονεκτημάτων, καθώς μπορούν να μειώσουν την προερχόμενη από το περιβάλλον μόλυνση, να βελτιώσουν την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων, να περιορίσουν όπως απώλειες υγρασίας, να λειτουργήσουν ως φορείς παραγόντων με αντιμικροβιακό χαρακτήρα ή να ενσωματώσουν διάφορα συστατικά, και να ενισχύσουν την θρεπτική και οργανοληπτική αξία των τυριών, και να παρατείνουν τη διατήρηση όπως (Costa et al., 2018a) (Εικόνα 1.5). Η ενσωμάτωση διάφορων βακτηριοσινών σε μεμβράνες έχει εφαρμοστεί για τον έλεγχο του *L. Monocytogenes* σε ποικίλα είδη τυριών (Iseppi et al., 2008, Guitián et al., 2019, Salvucci et al., 2019). Η χρήση τυρογάλακτος ως θρεπτικό υλικό για στελέχη *E. Faecalis* που παράγουν βακτηριοσίνες εμφανίζει αποτελέσματα με μεγάλο ενδιαφέρον όταν ενσωματώνονται σε μεμβράνες ζελατίνης/γλυκερόλης για τη μείωση όπως επιφανειακής μόλυνσης του τυριού με *L. Monocytogenes* (Silva et al., 2023a). Οι βρώσιμες μεμβράνες που παρασκευάζονται από χιτοζάνη, αλγινικό νάτριο και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, σε συνδυασμό με αντιμικροβιακή μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (AMCC) και επιλεγμένα στελέχη βάκιλλων και γαλακτοβάκιλλων για τη συντήρηση μαλακών τυριών παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι διαφόρων παθογόνων και μη μικροοργανισμών, όπως *E. Coli*, *L. Monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger* και *A. Flavus*. Επιπλέον, οι μεμβράνες από αλγινικό νάτριο και χιτοζάνη διατηρούν το τυρί φρέσκο, αλλά και τη συνολική αποδοχή του για διάστημα 45 ημερών (El-Sayed et al., 2021).



Εικόνα 1.5: Τα κύρια χαρακτηριστικά των εδώδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων για τη συντήρηση των τυριών (Τροποποιήθηκε από: Costa et al., 2018a, Costa et al., 2018b).

1.7.1 Εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου

Τα αλγινικά είναι πολυσακχαρίτες με ιδιαίτερη δημοφιλία λόγω του χαμηλού κόστους και της φυσικής τους αφθονίας, που παράγονται από τα καφέ άλγη της οικογένειας *Phaeophyceae* (Nieto, 2009). Είναι μη τοξικά, βιοδιασπώμενα και βιοσυμβατά, και λόγω αυτού χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μεμβρανών και επικαλύψεων (Reddy, 2021). Το αλγινικό νάτριο αντιδρά με δισθενή μεταλλικά ιόντα, όπως ιόντα ασβεστίου, για τον σχηματισμό ισχυρών πηκτωμάτων που διατηρούν την ικανότητα συγκράτησης νερού των τροφίμων και παρέχουν προστασία από μικροβιακή αλλοίωση και οξείδωση λιπιδίων (Yu et al., 2008). Το συγκεκριμένο γεγονός έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων, των ιδιοτήτων φραγμού, της ακαμψίας και της συνεκτικότητας (Gheorghita et al., 2020). Οι μεμβράνες αλγινικών είναι διαφανείς και δημιουργούν ισχυρό προστατευτικό φραγμό από το οξυγόνο, όμως η αντοχή που εμφανίζουν στο νερό είναι κακή λόγω της υδρόφιλης φύσης τους (Costa et al., 2018b). Η ενσωμάτωση αντιμικροβιακών ενώσεων και φυσικών αντιοξειδωτικών στις εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις αλγινικού νατρίου, καθώς και η εισαγωγή τους στη συσκευασία τροφίμων ελέγχει τη μικροβιακή ανάπτυξη και διατηρεί την ποιότητα τους (Hamedi et al., 2017).

Η συσκευασία τυριού με την αξιοποίηση των βρώσιμων μεμβρανών και επικαλύψεων αποτελεί έναν από τους πιθανούς τομείς εφαρμογής της συγκεκριμένης καινοτόμου τεχνολογίας συσκευασίας (Ajesh Kumar et al., 2021). Για τη παρασκευή εδώδιμων συσκευασιών χρησιμοποιούνται διάφορες “μήτρες”, μεταξύ των οποίων οι μεμβράνες αλγινικού νατρίου, που έχουν δοκιμαστεί σε μια σειρά τυροκομικών προϊόντων προκειμένου να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής και να μειώσουν τον πληθυσμό της αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας τους (Mastromatteo et al., 2014, Angiolillo et al., 2014,

Senturk Parreidt et al., 2018). Οι εδωδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου έχουν την ικανότητα να λειτουργούν ως φορείς για τη μεταφορά λειτουργικών καλλιεργειών σε κομμάτια ημίσκληρου τυριού με ιδιαίτερη επιτυχία, καθώς μέσω της μοριακής τεχνικής Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) έχει επικυρωθεί η μεταφορά ενός σημαντικού πληθυσμού στελεχών (LAB) σε αυτά (Papadopoulou et al., 2022).

1.8 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης και την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών

Οι αναλύσεις τροφίμων περικλείουν κατά βάση τυπικές μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις, μοριακές τεχνικές, όπως η πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Multiplex PCR), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR), η αλληλουχοεξααρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (NASBA) και η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (LAMP), ανοσοενζυμικές μεθόδους, όπως η ενζυμική ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία (ELISA) και βιοχημικές αντιδράσεις, π.χ. ATP βιοφωταύγεια (Mandal et al., 2011, Law et al., 2015). Η ταχεία ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων είναι ένα αντικείμενο που μελετάται συνεχώς, έχοντας αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι (Benoit & Donahue, 2003). Για την ανίχνευση τους οι πιο κοινοί τύποι ELISA είναι ο έμμεσος και ο sandwich. Η ELISA δύναται να ανιχνεύσει αντιγόνα-στόχους ολόκληρων κυττάρων ή μεταβολικά προϊόντα παθογόνων (Verma et al., 2012). Η φασματομετρία μάζας (MS) αποτελεί την πιο δημοφιλή μέθοδο για τη μελέτη των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι η βασική επιλογή για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης παθογόνων στα τρόφιμα, καθώς κρίνεται πιο εύχρηστη και πρακτική από την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) (Hummel et al., 2007). Οι ταχείες μέθοδοι κρίνονται αποδοτικότερες από άποψη χρόνου, εξοικονομούν εργασία, ενώ μπορούν να μειώσουν σημαντικά τα ανθρώπινα λάθη (Mandal et al., 2011). Γενικά, οι ταχείες μέθοδοι διαχωρίζονται σε μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα, σε βιοαισθητήρες και τις ανοσολογικές (Zhao et al., 2014). Η μεταγονιδιωματική είναι η πιο ισχυρή προσέγγιση για τη μελέτη μικροβιακών οικοσυστημάτων σχετιζόμενων με τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του περιβάλλοντος των παραδοσιακών τυριών που περιέχει πλήθος μικροοργανισμών (Kergourlay et al., 2015, Cao et al., 2017, De Filippis et al., 2017, Yeluri Jonnala et al., 2018, Kamilari et al., 2019 Afshari et al., 2020). Η βακτηριακή ποικιλομορφία της φέτας έχει αξιολογηθεί μέσω της φασματομετρίας χρόνου πτήσης με ιοντισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από τη μήτρα (MALDI-TOF-MS) (Tzora et al., 2021), η οποία αποτελεί μια σύγχρονη, οικονομικά αποδοτική μέθοδο σχετικά με το κόστος λειτουργίας και τον απαιτούμενο χρόνο στον εργαστηριακό χώρο (Hart et al., 2015, Lasch et al., 2016, Fernández-Álvarez et al., 2018). Πλην της GC-MS, η MALDI-TOF-MS αξιοποιείται για την ταυτοποίηση διαφορετικών στελεχών

παθογόνων σε βιολογικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων (Böhme et al., 2012, Ojima-Kato et al., 2014, Jadhav et al., 2015).

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η μικροβιολογική αλλοίωση προσδιορίζεται με βάση ποιοτικά και ποσοτικά κριτήρια ή μεθόδους χρονοβόρες και με καταστροφικές συνέπειες για το δείγμα (McMeekin et al., 2007, Nychas et al., 2008). Παρά την εξέλιξη στην ανίχνευση παθογόνων στα τρόφιμα, εξακολουθούν να υφίστανται ποικίλες προκλήσεις και ευκαιρίες για βελτίωση της τρέχουσας τεχνολογίας. Τεχνικές, όπως ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS) και η PCR έχουν ανοίξει τον δρόμο για την ταχεία και με μεγάλη ευαισθησία ανίχνευση παθογόνων, ενώ η πρόοδος της νανοβιοτεχνολογίας έχει επιτρέψει τη σμίκρυνση των συσκευών (Nugen & Baeumner, 2008). Για την περιγραφή της κινητικής των μικροοργανισμών, πλέον, έχει αρχίσει να αξιοποιείται μια σειρά νέων μαθηματικών προσεγγίσεων έτσι ώστε να εκτιμηθεί η αλλοίωση σε ποικίλα τρόφιμα (McMeekin et al., 2006). Αρκετές βιομηχανίες τροφίμων οδηγούνται στη χρησιμοποίηση μη επεμβατικών μεθόδων φασματοσκοπίας για τον έλεγχο των προϊόντων (Sun, 2009, Ropodi et al., 2016), όπως φασματοσκοπία δονήσεων (NIR-φθορισμού, Raman, FTIR) (Ellis et al., 2004, Ammor et al., 2009, Papadopoulou et al., 2011, Argyri et al., 2013, 2014), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Argyri et al., 2011), πολυφασματική και υπερφασματική απεικόνιση (Tsakanikas et al., 2016, Feng et al., 2018) και βιομημητικούς αισθητήρες οσμής και γεύσης (Ropodi et al., 2016). Τα εξαγόμενα δεδομένα αξιοποιούνται συνδυαστικά με αυτοματοποιημένα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης, τα οποία χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα οικονομικά, γρήγορα, ενώ δεν είναι απαραίτητη η χρήση εξειδικευμένου προσωπικού.

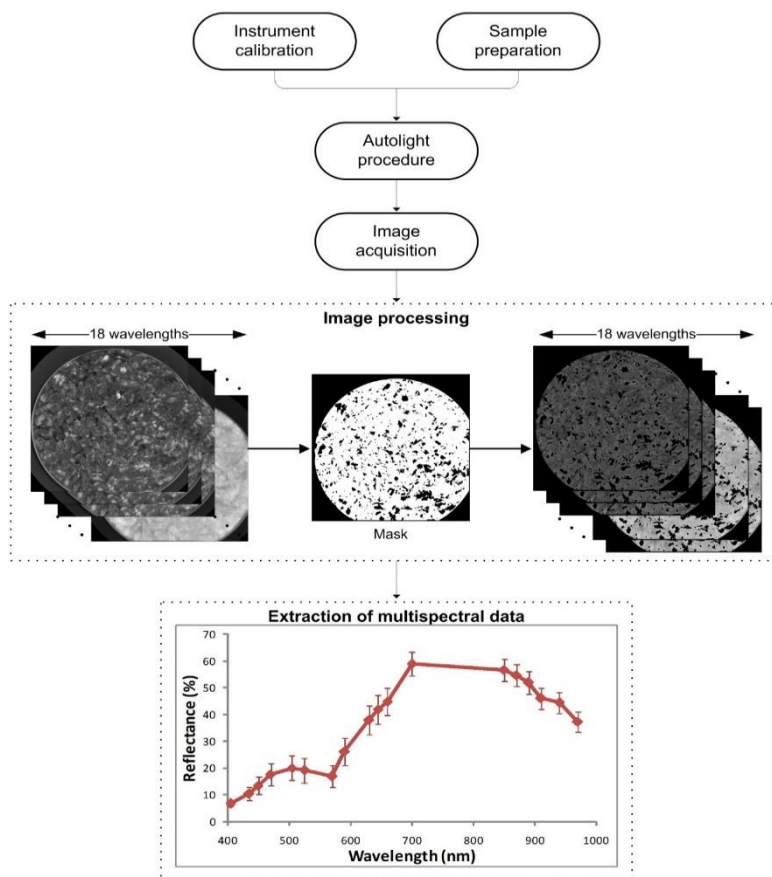
1.8.1 Μέθοδος Πολυφασματικής Απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis, MSI)

Η πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI) (Εικόνα 1.6) κρίνεται ως μια μέθοδος με μη επεμβατικό χαρακτήρα η οποία συνδυάζει τη φασματοσκοπία με την τεχνολογία απεικόνισης (Nixon & Burns, 2017). Αποτελεί έναν συνδυασμό μεθόδων, ειδικότερα της φασματοσκοπίας δονήσεων (Vibrational spectroscopy), της φασματοσκοπίας ορατού (VIS) και της υπολογιστικής όρασης (Computer vision) (Ropodi et al., 2016). Εφαρμόζοντας τη φασματοσκοπία δονήσεων λαμβάνει χώρα ο προσδιορισμός της ενέργειας απορρόφησης των δονούμενων-περιστρεφόμενων μορίων, τη στιγμή που μια δέσμη φωτός προσπίπτει στο δείγμα που βρίσκεται υπό εξέταση (Dufour, 2009). Η φασματοσκοπία ορατού είναι η αναλυτική μέθοδος απορρόφησης της ενέργειας της δέσμης φωτός από την επιφάνεια του τροφίμου, προϊόν της οποίας αποτελούν οι μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων στα ενεργειακά επίπεδα του ατόμου (Ebbing & Gammon, 2011). Η υπολογιστική όραση μιμείται την ανθρώπινη, χρησιμοποιώντας τρεις ζώνες (κόκκινο, πράσινο και μπλε) για να αποκτήσει τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων. Πρακτικά χρησιμοποιεί το φάσμα του

ορατού φωτός για να λάβει το χρώμα, το σχήμα, την υφή και το μέγεθος του δείγματος τροφίμου (Ropodi et al., 2016).

Οι δεσμοί των ενώσεων που απαντώνται στα τρόφιμα είναι κατά κύριο λόγο δεσμοί O-H (νερό, λίπος, υδατάνθρακες), N-H (πρωτεΐνες, αμινοξέα) και C-H (οργανικές ενώσεις), επομένως το εύρος του φάσματος που αξιοποιείται προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα τρόφιμα είναι τα 380-1000 nm (Dufour, 2009, Sun, 2009, Elmasry et al., 2012, Gowen et al., 2015). Η πολυφασματική απεικόνιση διαθέτει κάποια πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους ανάλυσης, καθώς είναι οικονομική, γρήγορη, ενώ παρέχει πληροφορίες από τις φασματικές περιοχές του ορατού και του εγγύς υπερύθρου (Ropodi et al., 2015).

Ένα όργανο πολυφασματικής απεικόνισης περιέχει μια φωτεινή πηγή (δέσμη φωτός), έναν αισθητήρα φωτός, μια φωτογραφική μηχανή (κατά κανόνα κάμερα υψηλής ευκρίνειας), έναν μετατροπέα σήματος, έναν φασματογράφο, όπως και έναν υπολογιστή με εγκατεστημένο λογισμικό για επεξεργασία της εικόνας (Tsakanikas et al., 2016, Feng et al., 2018). Μετά από την απεικόνιση του τροφίμου έπεται η επεξεργασία της εικόνας και ο ορισμός της περιοχής ενδιαφέροντος του (ROI), λόγω του ότι η εικόνα ενδεχομένως να περιλαμβάνει τμήματα από τον περιβάλλοντα χώρο, την επιφάνεια του τρυβλίου, κ.ά. (Carstensen et al., 2009, Daugaard et al., 2010).



Εικόνα 1.6: Διαδικασία λήψης πολυφασματικής εικόνας και εξαγωγής δεδομένων (Ropodi et al., 2015).

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

Οι ολοένα αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών σχετικά με την παραγωγή τόσο ποιοτικών όσο και ασφαλών προϊόντων, καθιστούν επιβεβλημένη την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών όσον αφορά την παραγωγή, συσκευασία και διανομή των προϊόντων (Nychas et al., 2008, Verbeke et al., 2010). Η φασματοσκοπία FTIR χαρακτηρίζεται ως μια μέθοδος σύγχρονη, εμφανίζει πολλές προοπτικές και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης σε ποικίλα τρόφιμα (Ellis et al., 2002, 2004). Η λήψη των φασμάτων είναι αρκετά απλή, ενώ ακολούθως γίνεται σύγκριση ολόκληρων ή μερικών ζωνών απορρόφησης τους με άλλα γνωστά. Συνεπώς, κρίνεται εφικτή η διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και ταυτοποίησης μη γνωστών οργανικών ενώσεων, όπως και η πιστοποίηση της καθαρότητας τους. Για αυτόν τον λόγο, η χρησιμοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου στην ανάλυση τροφίμων είναι συστηματική. Σύμφωνα με τη φύση κάθε προϊόντος εφαρμόζεται διαφορετική τεχνική για την κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος (Ταραντίλης & Παππάς, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2015).

Ένα κοινό φασματόμετρο IR μετασχηματισμού κατά Fourier (FTIR) (Εικόνα 1.7) συνίσταται κατά κύριο λόγο από τα ακόλουθα μέρη (Ταραντίλης & Παππάς, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2015):

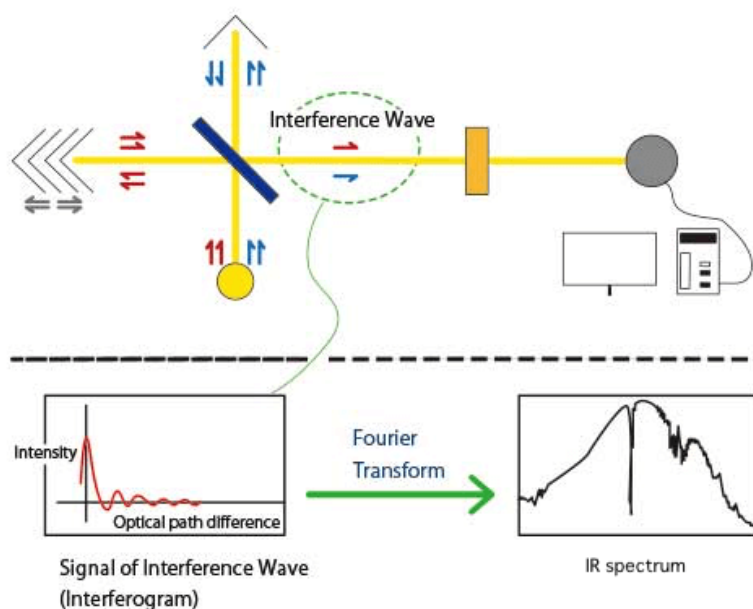
- **Πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας:** η λυχνία νικελίου-χρωμίου (Nicrome) είναι η πιο γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα χαμηλού κόστους. Δεν έχει μεγάλη ισχύ και είναι αερόψυκτη. Αναπτύσσει θερμοκρασίες της τάξεως των 1200-1250°C, ενώ εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου (MIR).
- **Πηγή λέιζερ:** η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ πραγματοποιείται διεγείροντας άτομα ηλίου και νέου (HeNe).
- **Συμβολόμετρο Michelson:** τα φασματόμετρα FTIR δεν έχουν επιλογέα μήκους κύματος, όμως λειτουργούν με το φαινόμενο της συμβολής. Το συμβολόμετρο απαρτίζεται από μια ημιδιαφανή πλάκα-διαχωριστή που έχει κατασκευαστεί από βρωμιούχο κάλιο (KBr) η οποία δεν απορροφά στο υπέρυθρο και δύο κάτοπτρα εκ των οποίων το ένα βρίσκεται σταθερό και το άλλο σε κίνηση με σταθερή ταχύτητα.
- **Δείγμα:** η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας διαμέσου κατόπτρου κατευθύνεται προς την περιοχή του εξεταζόμενου δείγματος. Ένα μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται, ενώ το υπόλοιπο εξέρχεται, εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο και οδηγείται προς τον ανιχνευτή. Κατά αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται το μοριακό αποτύπωμα του δείγματος, που είναι μοναδικό για κάθε μοριακή δομή.

- **Ανιχνευτής:** ο σκοπός του είναι να «αισθανθεί» την υπέρυθρη ακτινοβολία, που έχει διέλθει μέσα από το δείγμα.
- **Υπολογιστής:** γίνεται μετατροπή του σήματος της μέτρησης από αναλογικό σε ψηφιακό και αποστέλλεται στον υπολογιστή προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο μετασχηματισμός Fourier.

Η υγρασία του δείγματος και του χώρου τοποθέτησης του ενδέχεται να αποτελέσουν αρνητικούς παράγοντες στην ποιότητα των φασμάτων από το FTIR. Επιπροσθέτως, λόγω της παρουσίας ατμοσφαιρικού αέρα στον χώρο των οργάνων, το φάσμα συνυπολογίζει και τα συστατικά του αέρα που απορροφώνται στο υπέρυθρο (υδρατμοί, CO₂). Εξαιτίας αυτού, πριν κάθε δειγματοληψία, καταγράφεται φάσμα αναφοράς με τον υποδοχέα του δείγματος να τοποθετείται κενός (Ταραντίλης & Παπάς, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2015).

Η φασματοσκοπία FTIR βασίζεται στο ότι η πλειονότητα των μορίων απορροφούν στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου (MIR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το εύρος συχνότητας υπολογίζεται ως κυματαριθμός στην περιοχή 4000-400 cm⁻¹ (Faix, 1991). Ο κυματαριθμός ($\bar{\nu}$) ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός και είναι αντιστρόφως ανάλογος του μήκους κύματος (Εξίσωση 1.1):

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \text{ (Εξίσωση 1.1)}$$



Εικόνα 1.7: Απλοποιημένη αναπαράσταση της λειτουργίας του φασματομέτρου FTIR (JASCO Global).

1.9 Σκοπός μελέτης

Η παρούσα διπλωματική διατριβή επικεντρώθηκε στην επίδραση των τεχνολογικών βακτηρίων *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 στη συντήρηση και το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* σε φέτα που συντηρήθηκε είτε εντός άλμης είτε υπό συνθήκες κενού αέρος. Επιπλέον, μελετήθηκε η συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το πείραμα αλλοίωσης της φέτας με τα δεδομένα που εξήχθησαν με τη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR), προσδοκώντας την έγκαιρη ανίχνευση της μικροβιολογικής ποιότητας στις δύο συνθήκες συντήρησης. Ακόμη, οι ανωτέρω σύγχρονες μέθοδοι αξιοποιήθηκαν περαιτέρω, με σκοπό τον διαχωρισμό των δειγμάτων φέτας σε εκείνα με *L. monocytogenes* και χωρίς.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Προκαταρκτικό Πείραμα

Πριν την εκκίνηση του βασικού πειραματικού μέρους πραγματοποιήθηκαν πειραματισμοί με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων από ένα σύνολο μικροοργανισμών, οι οποίοι θα είχαν προστατευτικό χαρακτήρα στη φέτα και μεγαλύτερη δράση έναντι της ζύμης *D. hansenii* KZ3 (απομονωμένη από φέτα) και των στελεχών *L. monocytogenes* FMCC B-127 (απομονωμένο από σαλάτα με κοτόπουλο) και *Salmonella enteritidis* FMCC B-286 (απομονωμένο από μαλακό τυρί) που παρασχέθηκαν από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Food Microbiology Culture Collection-FMCC). Τα τεχνολογικά βακτήρια που αξιολογήθηκαν ήταν το *L. pentosus* B-281 (απομονωμένο από ζυμωμένες ελιές), το *L. plantarum* B-282 (απομονωμένο από ζυμωμένες ελιές) (Doulgeraki et al., 2013), το *L. plantarum* T571 (απομονωμένο από άλμη φέτας) (Pavli et al., 2016) το *Leuconostoc mesenteroides* FMX3 (απομονωμένο από λευκό τυρί άλμης), το *Lc. lactis* SMX2 (απομονωμένο από ημίσκληρο τυρί) (Kamarinou et al., 2022), το *L. plantarum* L125 (απομονωμένο από ζυμωμένο προϊόν κρέατος), το *L. pentosus* L33 (απομονωμένο από ζυμωμένο προϊόν κρέατος) (Pavli et al., 2016) και το *Bacillus subtilis* (προβιοτικό) που παρασχέθηκαν, όπως και η ζύμη KZ3, από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ (Λυκόβρυση, Αττική, Ελλάδα). Από τα ανωτέρω τεχνολογικά βακτήρια εκείνα με την ισχυρότερη βιοπροστατευτική δράση αποδείχθηκαν τα *L. plantarum* L125 και *L. pentosus* L33, τα οποία αξιοποιήθηκαν στην κύρια πειραματική διαδικασία έναντι του *L. monocytogenes*.

2.2 Πειραματικός Σχεδιασμός

Κομμάτια του τυριού φέτα (αρχικά δείγματα) συντηρήθηκαν σε 4 διαφορετικές συνθήκες. Η συντήρησή τους έλαβε χώρα είτε εντός άλμης είτε υπό κενό αέρος σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, αυτές των 4°C και 10°C. Διεξήχθησαν 8 δειγματοληψίες για κάθε μια από τις 4 συνθήκες, με σκοπό την παρατήρηση της ανάπτυξης μικροοργανισμών, αλλά και τη συλλογή φασματοσκοπικών δεδομένων στη φέτα.

Σε κάθε δειγματοληψία μεταχειρίζονταν 8 δείγματα, ενώ από κάθε αρχικό δείγμα διαχωρίζονταν 2 κομμάτια που προορίζονταν για διαφορετική χρήση. Ταυτόχρονα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιούνταν μετρήσεις των δειγμάτων με τις μεθόδους της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Κάθε δείγμα αξιοποιούνταν 2 φορές, δηλαδή λαμβάνονταν και επαναληπτική μέτρηση για το ίδιο δείγμα.

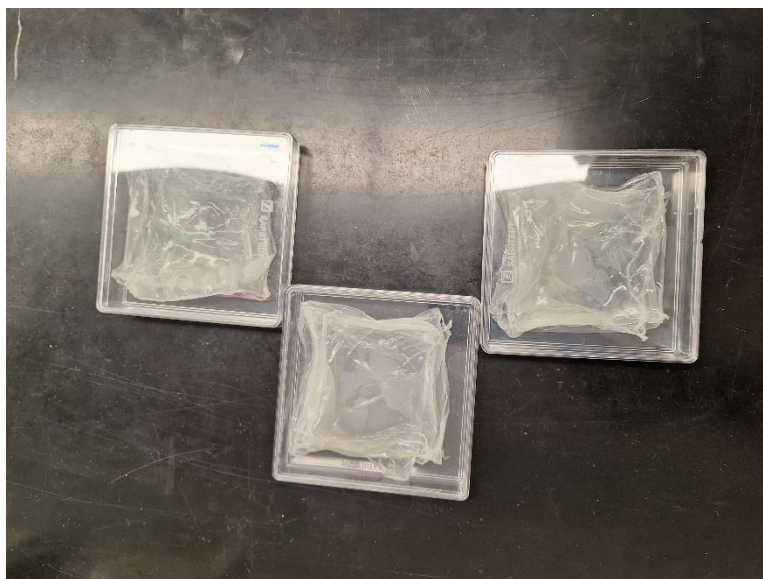
Παράλληλα, λάμβαναν χώρα μετρήσεις pH (στην πρώτη δεκαδική αραίωση) και ενεργότητας νερού (a_w) σε κάθε δειγματοληψία, ενώ αξιολογούνταν τα δείγματα ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

2.3 Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου

Σε ένα αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως τοποθετήθηκαν 1600 ml αποστειρωμένου νερού. Το δοχείο μεταφέρθηκε σε έναν αναδευτήρα στροβιλισμού με θερμαινόμενη πλάκα (Stuart CB162, Cole-Palmer, Vernon Hills, Illinois, U.S.) και με μαγνητάκι έγινε ανάδευση έως ότου φτάσει η θερμοκρασία του νερού κοντά στους 60°C. Το ζέσεως ήταν καλυμμένο με αλουμινόχαρτο μέχρι το πέρας της όλης διαδικασίας, ενώ τακτικά ελεγχόταν η θερμοκρασία με θερμόμετρο. Μόλις η θερμοκρασία πλησίασε τους 60°C έλαβε χώρα η σταδιακή προσθήκη της σκόνης αλγινικού νατρίου (A3249, PanReac AppliChem ITW Reagents, S.R.L, Monza, Italy) με ταυτόχρονη ανάδευση. Όταν η πρώτη ποσότητα σκόνης διαλύθηκε, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη σε δόσεις και της υπόλοιπης με την ίδια ακριβώς διαδικασία. Το διάλυμα αλγινικών ήταν 2% (w/v). Τη στιγμή που όλη η απαιτούμενη ποσότητα των αλγινικών διαλύθηκε στο διάλυμα, το ζέσεως αποσύρθηκε από την εστία και μεταφέρθηκε στο ψυγείο (4°C) για 30 λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων που είχαν δημιουργηθεί λόγω της ανάδευσης. Παράλληλα, σε ένα μικρό ζέσεως θερμάνθηκε η απαιτούμενη ποσότητα γλυκερόλης (1% (v/v) στο τελικό διάλυμα αλγινικών). Αφού παρήλθε το διάστημα των 30 λεπτών, το μίγμα απομακρύνθηκε από το ψυγείο και προστέθηκε η γλυκερόλη αναδεύοντας με το μαγνητάκι πολύ αργά για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων. Μετά την προσθήκη της γλυκερόλης, και αφού το μίγμα ομογενοποιήθηκε, προστέθηκε η βιομάζα (cells) των τεχνολογικών βακτηρίων *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125.

Ειδικότερα, δύο ημέρες πριν την παρασκευή των μεμβρανών έγινε ανανέωση των τεχνολογικών βακτηρίων σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό MRS Broth with Tween 80 (Ref. 4017292, Biolife Italiana S.r.l., Monza, Italy). Εμβολιάστηκαν 50 μl από κάθε τεχνολογικό σε 50 ml MRS Broth, αναμίχθηκαν και επώαστηκαν στους 30°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε 1 falcon των 50 ml για το κάθε οξυγαλακτικό βακτήριο. Ακολούθως, εμβολιάστηκαν 50 μl από κάθε τεχνολογικό σε 20 ml MRS Broth, έγινε ανάμιξη με τροχιακό αναδευτήρα (Vortex Genius 3, IKA-Werke GmbH & Co., Staufen, Germany) και επώαστηκαν στους 30°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε 16 falcons των 50 ml για το κάθε οξυγαλακτικό βακτήριο. Την ημέρα παρασκευής των μεμβρανών έλαβε χώρα ο διαχωρισμός της βιομάζας και του υπερκειμένου των *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 με τη φυγόκεντρο (Heraeus Multifuge 1S-R, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) (Πρόγραμμα 1: 6000 rpm, 10 min, 4°C). Πραγματοποιήθηκε η 1^η φυγοκέντρηση,

απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 30ml Ringer για επαναιώρηση των κυττάρων, έγινε ανάμιξη, έλαβε χώρα 2^η φυγοκέντρωση, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα με 5 ml Ringer, αναμίχθηκαν εκ νέου και προστέθηκε το σύνολο της βιομάζας σε αναλογία 1:1 στο μίγμα, το οποίο αναδευόταν αργά για να μην σχηματιστούν φυσαλίδες, αλλά παράλληλα να επιτευχθεί ομογενοποίηση. Ακολούθως, σε τετράγωνα αποστειρωμένα τρυβλία εισήχθησαν από 17 g μίγματος προσέχοντας να καλυφθεί όλη η επιφάνεια τους. Έπειτα, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανοιχτά σε θάλαμο νηματικής ροής (Bio II Advance, Telstar, Terrassa, Spain) για περίπου 17-18 ώρες, ενώ παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα CaCl₂ (2% w/v) (131232, PanReac AppliChem ITW Reagents, S.R.L, Monza, Italy) και προστέθηκαν 15-20 ml σε κάθε τρυβλίο, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια. Αφού παρήλθαν 60 s, αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι παραχθείσες εδώδιμες μεμβράνες (Εικόνα 2.1) και τοποθετήθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή σε διηθητικό χαρτί για 10 min, ώστε να απομακρυνθεί η περιττή υγρασία. Όλη η διαδικασία παρασκευής των μεμβρανών έλαβε χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες, ενώ αποθηκεύτηκαν σε αεροστεγώς κλεισμένα με parafilm τρυβλία στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.



Εικόνα 2.1: Εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου.

2.4 Προετοιμασία δειγμάτων

Από την Ελληνική Γαλακτοβιομηχανία “FAMILY FARM” παραδόθηκε φέτα η οποία ήταν συσκευασμένη σε λευκοσιδηρό δοχείο ορθογώνιου σχήματος που περιείχε άλμη με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι της τάξεως του 4% w/v. Το καθαρό βάρος (net weight) του προϊόντος ήταν 14 kg, ενώ το μικτό (gross weight) 20 kg. Η φέτα αφαιρέθηκε με ιδιαίτερη προσοχή και υπό ασηπτικές συνθήκες από το δοχείο, και τεμαχίστηκε σε κομμάτια των 150 g.

Ανάλογα τη μεταχείριση των δειγμάτων φέτας έλαβε χώρα ψεκασμός ή/και εμβολιασμός ή/και κάλυψη με εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών. Σχετικά με τον ψεκασμό, πραγματοποιήθηκε είτε με σκέτο

UHT (Ultra-High-Temperature) γάλα είτε με UHT γάλα που περιείχε τη βιομάζα των τεχνολογικών βακτηρίων σε αναλογία 1:1, ενώ πληθυσμός που ψεκάστηκε ήταν περίπου $5 \log$ CFU/g. Δύο ημέρες πριν την προετοιμασία των δειγμάτων τα τεχνολογικά βακτήρια ανανεώθηκαν σε MRS Broth. Εμβολιάστηκαν 50 μl από κάθε τεχνολογικό σε 9 ml MRS Broth, αναμίχθηκαν και επώαστηκαν στους 30°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες για το κάθε βακτήριο. Έπειτα, εμβολιάστηκε 1 ml από το κάθε τεχνολογικό σε 50 ml MRS Broth, έγινε ανάμιξη και τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε 6 falcons των 50ml για το κάθε οξυγαλακτικό βακτήριο. Την ημέρα προετοιμασίας των δειγμάτων φυγοκεντρήθηκαν για τον διαχωρισμό της βιομάζας και του υπερκείμενου. Πραγματοποιήθηκε η 1^η φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα με 30 ml Ringer, αναμίχθηκαν, έλαβε χώρα 2^η φυγοκέντρηση, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 5 ml UHT γάλακτος για επαναιώρηση των κυττάρων, έγινε εκ νέου ανάμιξη και προστέθηκε το σύνολο της βιομάζας σε αποστειρωμένο δοχείο ψεκασμού. Αντίστοιχα, έγινε πλήρωση παρόμοιου δοχείου με σκέτο UHT γάλα. Η ποσότητα που ψεκάστηκε σε κάθε κομμάτι 150 g ήταν 3,2 ml (4 ψεκασμοί).

Όσον αφορά τον εμβολιασμό, έλαβε χώρα με τη βιομάζα των στελεχών *L. monocytogenes* FMCC B-127 και FMCC B-133. Δύο ημέρες νωρίτερα από την προετοιμασία των δειγμάτων έγινε ανανέωση των B-127 και B-133 σε γενικό θρεπτικό μέσο Tryptone Soy Broth (TSB) (NCM0019A, Neogen, Lansing, Michigan, U.S.). Εμβολιάστηκαν 50 μl από το κάθε στέλεχος σε 9 ml TSB, έγινε ανάμιξη και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες για το κάθε στέλεχος. Στη συνέχεια, εμβολιάστηκαν 20 μl από το κάθε στέλεχος σε 10 ml TSB, αναμίχθηκαν και τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε 2 falcons των 15 ml για το κάθε στέλεχος. Την ημέρα προετοιμασίας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός της βιομάζας και του υπερκείμενου. Έλαβε χώρα η 1^η φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 9 ml Ringer για επαναιώρηση των κυττάρων, αναμίχθηκαν, έλαβε χώρα 2^η φυγοκέντρηση, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα με 9 ml Ringer και έγινε εκ νέου ανάμιξη. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Από την 10^{-6} αραιώση λήφθηκε ίση ποσότητα από τα δύο στελέχη και αναμίχθηκαν (αναλογία 1:1) σε άδειο δοκιμαστικό σωλήνα. Στα αντίστοιχα κομμάτια 150 g εμβολιάστηκαν 150 μl παθογόνου, με τον τελικό πληθυσμό να ήταν $5 \log$ CFU/g.

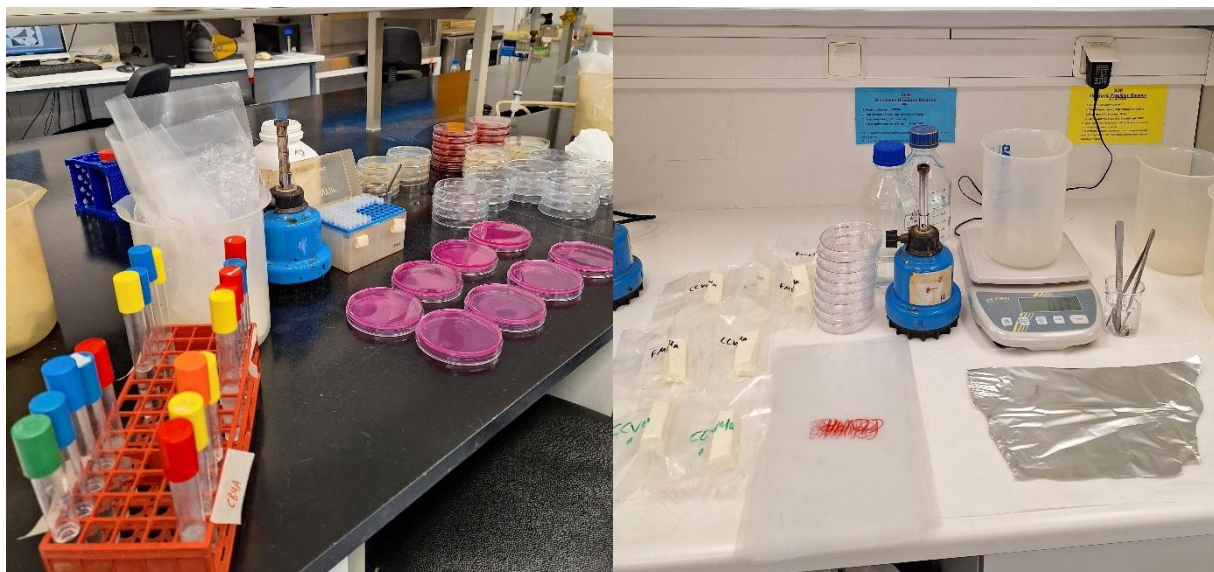
Αντίθετα, η κάλυψη με βρώσιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου στις οποίες είχαν ενσωματωθεί τα τεχνολογικά βακτήρια σε πληθυσμό της τάξεως των $3 \log$ CFU/g έγινε όταν τα κομμάτια τεμαχίστηκαν μετέπειτα στο βάρος των 30 g.

Ο τεμαχισμός της φέτας έγινε σε συνολικά 240 κομμάτια (αρχικά δείγματα) των 30 g, τα οποία κατανεμήθηκαν ισόποσα στις 4 συνθήκες συντήρησης. Κάθε συνθήκη αποτελείτο από 4 μεταχειρίσεις. Επομένως, οι περιπτώσεις ήταν στο σύνολο τους 16, ενώ σε καθεμία κατανεμήθηκαν 15 δείγματα. Τα μισά δείγματα συσκευάστηκαν σε σακούλες τροφίμων κενού αέρος vacuum που σφραγίστηκαν με μηχανήμα συσκευασίας κενού αέρος (Henkovac H 1900 H KK, Henkovac, 's Hertogenbosch, the Netherlands) και διανεμήθηκαν στους αντίστοιχους θαλάμους συντήρησης (4°C ή 10°C) (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan). Τα υπόλοιπα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια τύπου falcon με βιδωτό πώμα των 50 ml. Σε κάθε falcon προστέθηκε άλμη 4% (w/v), που παρασκευάστηκε εντός του εργαστηριακού χώρου υπό ασηπτικές συνθήκες και έγινε κατανομή τους στις ίδιες θερμοκρασίες.

2.5 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Κατά τη δειγματοληψία (Εικόνες 2.2), ζυγίζονταν 10 g δείγματος σε αποστειρωμένη σακούλα ομογενοποίησης υπό ασηπτικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας νυστέρι και λαβίδα. Ακολούθως, το δείγμα αραιωνόταν με αποστειρωμένο αλατούχο διάλυμα Ringer (LAB100Z, LAB M, Heywood, Lancashire, U.K.) ποσότητας 90 ml και ακολουθούσε ομογενοποίηση με χρήση συσκευής Stomacher (Lab Blender 400, Seward, Worthing, West Sussex, U.K.) για 1 min. Στη συνέχεια, γίνονταν διαδοχικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιείχαν 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer.

Ο εμβολιασμός των τρυβλίων πραγματοποιούνταν υπό ασηπτικές συνθήκες στα ανάλογα θρεπτικά υποστρώματα. Όσον αφορά τα μέσα επιφανειακής επίστρωσης, λάμβανε χώρα εμβολιασμός με 0,1 ml δείγματος από την επιλεγμένη αραιώση και έπειτα γινόταν διασπορά στην επιφάνεια του μέσου με χρήση αποστειρωμένου τριγώνου. Σχετικά με την τεχνική ενσωμάτωσης, 1 ml δείγματος εμβολιαζόταν σε άδειο τρυβλίο και έπειτα προστίθετο το υπόστρωμα σε υγρή μορφή, ενώ ακολουθούσαν ανάδευση. Αφού στερεοποιούνταν, γινόταν προσθήκη δεύτερης στρώσης του ίδιου μέσου προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Ύστερα από τον εμβολιασμό τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικούς κλιβάνους. Το χρονικό διάστημα και η θερμοκρασία διέφεραν ανάλογα με τις απαιτήσεις ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού. Όταν παρέρχονταν το αντίστοιχο διάστημα, λάμβανε χώρα καταμέτρηση των παρατηρούμενων αποικιών στα τρυβλία κάθε αραιώσης.



Εικόνες 2.2: Διαδικασία δειγματοληψίας.

Οι μικροοργανισμοί που μελετιούνταν για τη μικροβιακή αλλοίωση των δειγμάτων φέτας που δεν είχαν εμβολιαστεί με *L. monocytogenes* ήταν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι και οι ζύμες/μύκητες. Για τα εμβολιασμένα με *L. monocytogenes* δείγματα μελετιούνταν το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο και η OMX. Τα θρεπτικά υλικά (Εικόνες 2.3) που χρησιμοποιούνταν για την ανάπτυξη των ανωτέρω μικροοργανισμών ήταν τα εξής:

Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης:

- Plate Count Agar (PCA) (Tryptic Glucose Yeast Agar – Standard Methods Agar) (Ref. 4021452, Biolife Italiana S.r.l, Monza, Italy): γενικό θρεπτικό μέσο για καταμέτρηση της OMX. Η επώαση γινόταν στους 30°C για 72 ώρες.
- Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar Base (LAB036, LAB M, Heywood, Lancashire, U.K.) με προσθήκη αντιβιοτικού Chloramphenicol (NCM4051-0.5, Neogen, Lansing, Michigan, U.S.): εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για καταμέτρηση των ζυμών και μυκήτων. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 72 ώρες.
- Listeria Palcam Agar Base (Ref. 4016042, Biolife Italiana S.r.l., Monza, Italy) με προσθήκη αντιβιοτικού Listeria Palcam Antimicrobial Supplement (Ref. 4240042, Biolife Italiana S.r.l, Monza, Italy): εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για καταμέτρηση του *L. monocytogenes*. Οι σχηματιζόμενες αποικίες είχαν μαύρο χρώμα με μαύρο περίγραμμα. Η επώαση γινόταν στους 37°C για 48 ώρες.

Τεχνική ενσωμάτωσης:

- De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar ISO Formulation (Ref. 401728S2, Biolife Italiana S.r.l, Monza, Italy): εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για καταμέτρηση των LAB. Οι εμφανιζόμενες αποικίες παρουσίαζαν φακοειδές σχήμα. Η επώαση γινόταν στους 30°C για 72 ώρες.
- M17 Agar (Ref. 4017192, Biolife Italiana S.r.l., Monza, Italy): εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για καταμέτρηση των γαλακτικών. Οι αποικίες είχαν φακοειδές σχήμα. Η επώαση γινόταν στους 37°C για 48 ώρες.



Εικόνες 2.3: Αποικίες μικροοργανισμών σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα.

2.6 Μέτρηση pH

Μετά την ολοκλήρωση των μικροβιολογικών αναλύσεων κάθε δειγματοληψίας, πραγματοποιούνταν μέτρηση του pH (στην πρώτη δεκαδική αραίωση). Με τη χρήση ψηφιακού οργάνου μέτρησης pH (RL150, Russell Inc., Boston, Massachusetts, U.S.) με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). Βαθμονόμηση του οργάνου γινόταν πριν αρχίσει η μέτρηση με πρότυπα διαλύματα με pH 4, 7 και 10.

2.7 Μέτρηση ενεργότητας νερού (a_w)

Μόλις ολοκληρωνόταν η μέτρηση του pH γινόταν μέτρηση της a_w . Με τη χρήση ψηφιακού οργάνου μέτρησης a_w (Dew Point Water Activity Meter 4TE, Aqualab, Pullman, Washington, U.S.)

μετριόταν η ενεργότητα νερού σε κάθε τεμαχισμένο σε λεπτά τετράγωνα κομμάτια δείγμα. Ένα κομμάτι από κάθε δείγμα τοποθετούνταν σε μιας χρήσης δοχείο πριν αποθεθεί στον θάλαμο δειγμάτων του οργάνου προκειμένου να ξεκινήσει η μέτρηση.

2.8 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων που έλαβε χώρα στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας είχε ως κριτήρια την υφή, την οσμή, την εμφάνιση (χρώμα) και τη γεύση (στα δείγματα χωρίς *L. monocytogenes*). Η αξιολόγηση των δειγμάτων φέτας από τις 4 διαφορετικές συνθήκες συντήρησης έγινε σε μη εκπαιδευμένο πάνελ 4 ατόμων, τα οποία ήταν μέλη του εργαστηρίου. Η κλίμακα βαθμολόγησης ορίστηκε από το 1 έως το 3, με την τιμή 1 να αποτελεί το φρέσκο – αποδεκτό, 2 το οριακά φρέσκο – αποδεκτό και 3 το αλλοιωμένο – μη αποδεκτό.

2.9 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)

Η λήψη δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης πραγματοποιούνταν με τη χρήση των οργάνων VideometerLab και VideometerLite (Videometer A/S, Herlev, Denmark).

2.9.1 Όργανο VideometerLab

Το VideometerLab έχει τη δυνατότητα καταγραφής της επιφανειακής ανάκλασης των δειγμάτων σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος των οποίων το εύρος κυμαίνεται από τα 405 nm (περιοχή ορατού) έως τα 970 nm (περιοχή εγγύς υπερύθρου) και ειδικότερα: 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm (Panagou et al., 2014, Spyrelli et al., 2020). Με μια τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (Charge Coupled Device chip, CCD chip) γίνεται η καταγραφή της ανάκλασης από την επιφάνεια κάθε δείγματος (Spyrelli et al., 2020). Κατά τη διαδικασία (Εικόνες 2.4), το τεμαχισμένο σε λεπτά τετράγωνα κομμάτια δείγμα βάρους 20 g που βρισκόταν ομοιόμορφα διανεμημένο μέσα σε τρυβλίο, τοποθετούνταν χωρίς καπάκι εντός της σφαίρας Ulbricht στο εσωτερικό της οποίας υπάρχει μια λευκή ματ επίστρωση, ενώ στο επάνω τμήμα της έχει τοποθετηθεί μια Point Grey Scorpion κάμερα. Η λευκή επίστρωση συνδυαστικά με το σχήμα της σφαίρας επιτυγχάνουν μια ομοιόμορφη ανάκλαση του διάχυτου φωτός. Περιμετρικά της σφαίρας και ομοιόμορφα κατανεμημένοι βρίσκονται δίοδοι εκπομπής φωτός (light-emitting diodes, LEDs) για τα 18 μήκη κύματος. Τη στιγμή που λαμβάνεται μια εικόνα τα LEDs ανάβουν με τη σειρά και γίνεται από την κάμερα καταγραφή της ανάκλασης από το κάθε μήκος κύματος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια μονόχρωμη εικόνα με 32-bit ακρίβεια για κάθε τύπο LED, οδηγώντας σε έναν κύβο χωρικών και φασματικών δεδομένων για κάθε δείγμα με διαστάσεις 1280×960×18 (Dissing et al., 2013, Tsakanikas et al., 2015).

Για την πραγματοποίηση της σωστής καταγραφής πολυφασματικών εικόνων απαιτείται αρχικά να λάβει χώρα η διαδικασία του light setup. Έτσι, γίνεται η προετοιμασία των διόδων εκπομπής σύμφωνα με τον τύπο του αντικειμένου προς απεικόνιση. Με την αξιοποίηση ενός εκ των δειγμάτων στην πρώτη χρήση του VideometerLab δημιουργείται ένα αρχείο με την πρώτη απεικόνιση (autolight) που ανακαλείται όποτε γίνεται το light setup. Με την ολοκλήρωση του light setup το όργανο απαιτεί ραδιομετρική και γεωμετρική βαθμονόμηση με την εφαρμογή πρότυπων στόχων (Folm-Hansen, 1999). Το ομοιογενές διάχυτο φως σε συνδυασμό με τα βήματα βαθμονόμησης επιτυγχάνουν ένα ιδανικό δυναμικό εύρος, ελαττώνουν τις σκιές, τα φαινόμενα σκίασης, την κατοπτρική ανάκλαση και την παραμόρφωση των ειδώλων (Dissing et al., 2013, Panagou et al., 2014).

Η εικόνα εκτός από χωρικά και φασματικά δεδομένα περιέχει πληροφορίες που δεν έχουν σχέση με την ανάλυση, όπως το τρυβλίο και ο περιβάλλοντας χώρος. Για αυτόν τον λόγο, απαιτείται επεξεργασία των εικόνων προκειμένου να αφαιρεθούν ανάλογα τμήματα και να απομείνουν εκείνα που χρήζουν ανάλυσης (segmentation) (Ropodi et al., 2017). Κάτι τέτοιο γίνεται με τη μεγιστοποίηση της αντίθεσης ανάμεσα στο δείγμα και τα υπόλοιπα αντικείμενα (Daugaard et al., 2010). Η επεξεργασία υλοποιήθηκε από το λογισμικό του VideometerLab (έκδοση 2.12.39) μέσω του οποίου ελέγχεται η λειτουργία του οργάνου (Ropodi et al., 2017), ενώ στηρίζεται στην αρχή της κανονικής διακριτικής ανάλυσης (Canonical Discriminant Analysis, CDA). Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτει μια κατατμημένη εικόνα για κάθε δείγμα αποκλειστικά με την περιοχή ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI), η οποία αξιοποιείται για την εξαγωγή φασματικών δεδομένων. Υπολογίζοντας τον μέσο όρο έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής ενδιαφέροντος γίνεται ο υπολογισμός για κάθε εικόνα του μέσου φάσματος ανάκλασης σε κάθε μήκος κύματος (Ropodi et al., 2015).

Για κάθε δείγμα φέτας λαμβάνονταν 2 πολυφασματικές εικόνες. Αφού γινόταν η λήψη της πρώτης το δείγμα μεταφερόταν στο καπάκι του τρυβλίου και με λαβίδα γυριζόταν από την άλλη πλευρά. Ακολούθως, τοποθετούνταν στο εσωτερικό της σφαίρας για νέα λήψη. Συνολικά, με τη χρήση του VideometerLab ελήφθησαν 460 φάσματα (n=460).



Εικόνες 2.4: Διαδικασία λήψης πολυφασματικών εικόνων με το όργανο VideometerLab.

2.9.2 Όργανο VideometerLite

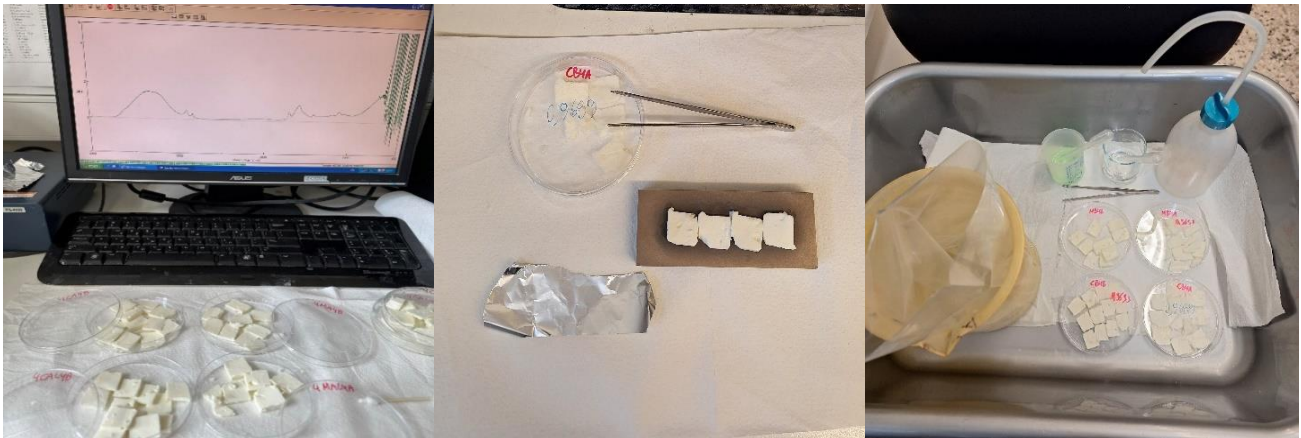
Το VideometerLite είναι μια φορητή και ασύρματη συσκευή φασματικής απεικόνισης σχεδιασμένη για την εύκολη, σαφή και ακριβή ανάλυση εικόνας. Χρησιμοποιώντας συστήματα στροβοσκοπικού LED, το VideometerLite συνδυάζει αποτελεσματικά τις μετρήσεις 10 μηκών κύματος, που κυμαίνονται μεταξύ 405 nm και 850 nm, σε μια ενιαία φασματική εικόνα, όπου κάθε εικονοστοιχείο αντιστοιχεί σε διαφορετικό φάσμα ανάκλασης (Nychas et al., 2022). Τα μήκη κύματος που περιλαμβάνονται στο VideometerLite είναι: 405 nm (βιολετί), 430 nm (λιλά), 450 nm (μπλε), 490 nm (κυανό), 515 nm (πράσινο) 590 nm (πορτοκαλί), 630 nm (κόκκινο), 660 nm (κόκκινο), 690 nm (κόκκινο) και 850 nm (εγγύς υπέρυθρο). Οι εικόνες δύνανται να ληφθούν σε διάστημα 7-10 δευτερολέπτων, επιτρέποντας ταχεία ανάλυση στο πεδίο, ενώ επιτρέπει τη συνδεσιμότητα με το λογισμικό VideometerLab. Η ενσωματωμένη σφαίρα του έχει διάμετρο 130 mm και αποτελείται από εύχρηστα κουμπιά για εκκίνηση, τερματισμό λειτουργίας και λήψη εικόνων.

Όπως και στο VideometerLab, για να αφαιρεθούν αντίστοιχα τμήματα και να απομείνουν εκείνα που πρέπει να αναλυθούν, κρίνεται αναγκαία η επεξεργασία των εικόνων, η οποία επιτυγχάνεται με τη μεγιστοποίηση της αντίθεσης μεταξύ του δείγματος και των υπόλοιπων αντικειμένων. Η επεξεργασία έγινε από το λογισμικό του VideometerLite (έκδοση 2.12.39) μέσω του οποίου ελέγχεται η λειτουργία του οργάνου, ενώ βασίζεται στην αρχή της κανονικής διακριτικής ανάλυσης (CDA). Παράλληλα, προκύπτει μια κατατμημένη εικόνα για κάθε δείγμα μόνο με την περιοχή ενδιαφέροντος (ROI), η οποία χρησιμοποιείται για την εξαγωγή φασματικών δεδομένων.

Το δείγμα που βρισκόταν μέσα σε τρυβλίο τοποθετούνταν χωρίς καπάκι εντός της σφαίρας ώστε να ληφθεί η εικόνα. Για κάθε δείγμα φέτας λαμβάνονταν εκ νέου 2 εικόνες. Όταν γινόταν η λήψη της πρώτης το δείγμα μεταφερόταν στο καπάκι του τρυβλίου και γυριζόταν από την άλλη μεριά. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν στο εσωτερικό της σφαίρας για δεύτερη λήψη. Στο σύνολο, με τη χρήση του VideometerLite ελήφθησαν 352 φάσματα (n=352).

2.10 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Τα δείγματα με τα οποία έγινε η πολυφασματική απεικόνιση αξιοποιούνταν για την εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier. Για τα φασματοσκοπικά δεδομένα χρησιμοποιούνταν το φασματόμετρο FTIR-6200 (Jasco Corp., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με έναν τυπικό θάλαμο για το δείγμα, έναν ανιχνευτή DLaTGS και έναν διαχωριστή δέσμης Ge/KBr, και ένας ZnSe 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) κρύσταλλος (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, U.S.). Ο κρύσταλλος έχει δείκτη διάθλασης 2.4 και βάθος διείσδυσης 2.0 μm στα 1000 cm^{-1} . Σχετικά με τη διαδικασία (Εικόνες 2.5), μια ποσότητα από κάθε δείγμα φέτας τοποθετούνταν στην κρυστάλλινη πλάκα, καλυπτόταν με ένα μικρό κομμάτι αλουμινόχαρτου και εφαρμοζόταν πίεση ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή επαφή του δείγματος με την επιφάνεια του κρυστάλλου. Μόλις ολοκληρωνόταν η πρώτη μέτρηση, τοποθετούνταν ποσότητα από το ίδιο δείγμα φέτας για επαναληπτική μέτρηση. Ανά 4 δείγματα πραγματοποιούνταν βαθμονόμηση του οργάνου λαμβάνοντας φάσμα αναφοράς όπου η κρυστάλλινη πλάκα τοποθετούνταν στον θάλαμο χωρίς δείγμα. Μετά από κάθε μέτρηση λάμβανε χώρα ο προσεκτικός καθαρισμός του κρυστάλλου με απορρυπαντικό, απιονισμένο νερό και ακολούθως ακετόνη με τη βοήθεια μπατονέτας. Η συλλογή των φασμάτων γίνεται μέσω του λογισμικού Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) έκδοση 2 (Jasco Corp.). Μέσα σε χρονικό διάστημα 2 min πραγματοποιούνται 100 σαρώσεις ανάλυσης 4 cm^{-1} για κάθε δείγμα, παρέχοντας ένα φάσμα δεδομένων με μήκη κύματος εύρους 4000 έως 400 cm^{-1} . Συνολικά, με τη χρήση του FTIR-6200 JASCO ελήφθησαν 460 φάσματα (n=460). Τα φάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για επιπλέον αναλύσεις ήταν σε μήκη κύματος εύρους από 1800 έως 900 cm^{-1} (Papadopoulou et al., 2021).



Εικόνες 2.5: Διαδικασία λήψης φασμάτων με το φασματοόμετρο FTIR-6200 JASCO.

2.11 Ανάλυση δεδομένων

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο μικροβιακός πληθυσμός των δειγμάτων φέτας, τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις και τα τρία όργανα υποβλήθηκαν σε επιπρόσθετες αναλύσεις.

2.11.1 Μοντέλο εκτίμησης της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLS-R)

Τα δεδομένα που προέκυψαν τόσο από τις μικροβιολογικές αναλύσεις της φέτας όσο και από τα όργανα VideometerLab, VideometerLite και FTIR-6200 JASCO χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Με τη μέθοδο αυτή συσχετίζονται τα δεδομένα από σύνολα δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (εξαρτημένες) με ένα γραμμικό πολυπαραγοντικό μοντέλο. Ειδικότερα, δημιουργείται ένα καινούργιο σύνολο – χώρος ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X -scores), με ορθογώνια διάταξη, και συγχρόνως εξάγεται ένας αριθμός κυρίων συνιστωσών γνωστών και ως λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables, LVs) για τον νέο χώρο μέσω των οποίων ερμηνεύεται η μέγιστη διασπορά στην απόκριση (Wold et al., 2001, Romia & Bernárdez, 2009, Panagou et al., 2014). Στοχεύοντας στην απαλλαγή από την υπερπροσαρμογή (overfitting) που προκύπτει μερικές φορές στις πολυάριθμες και συσχετιζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές, το μοντέλο εκπαιδεύεται και εκτιμάει τη σημαντικότητα όλων των παραγόντων κατά τη διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation). Βάσει αυτής, λαμβάνει χώρα διάκριση των δεδομένων σε ομάδες, που αξιοποιούνται αλληπαλά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μοντέλων με τα εναπομείναντα δεδομένα. Έπειτα από τη δημιουργία ενός μοντέλου, πραγματοποιείται η καταμέτρηση των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της μεταβλητής Y . Είναι απαραίτητη η επικύρωση (validation) κάθε μοντέλου πριν την εφαρμογή του για πρόβλεψη (prediction) του μικροβιακού φορτίου. Κάτι τέτοιο ιδανικά πρέπει να γίνεται με ανεξάρτητα αντιπροσωπευτικά δείγματα με την προϋπόθεση ότι αυτά υφίστανται. Σε διαφορετική περίπτωση,

δίνεται η δυνατότητα επανεκτίμησης του μοντέλου ύστερα από τυχαιοποίηση των δεδομένων (Wold et al., 2001). Η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμήθηκε, επειδή επιτρέπει την ανάλυση δεδομένων με μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων μεταβλητών X και με πολύ «θόρυβο» (Wold et al., 2001, Abdi, 2003). Επιπροσθέτως, η PLS-R διαφέρει από τις υπόλοιπες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης, καθώς με την εφαρμογή της διατηρείται η ασυμμετρία ανάμεσα στις προβλεπόμενες και τις εξαρτημένες μεταβλητές (Abdi, 2003).

Η αξιολόγηση του μοντέλου PLS-R έλαβε χώρα με βάση τον αριθμό των λανθανουσών συνιστωσών (Latent Components) που εξήχθησαν από τα δεδομένα, κάτι το οποίο καθορίστηκε χρησιμοποιώντας μια διαδικασία leave-one-out διασταυρούμενης επικύρωσης (cross-validation) μόνο για το επίπεδο της ανάπτυξης (training). Ο αριθμός των λανθανουσών συνιστωσών που απαιτούνται για την απόδοση της μικρότερης ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE) της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross-validation) καθορίστηκε για τη μοντελοποίηση, ελέγχοντας συγχρόνως το διάγραμμα της υπολειπόμενης διακύμανσης διασταυρούμενης επικύρωσης (cross-validation) έναντι του αριθμού των λανθανουσών συνιστωσών, με έως και 20 συνιστώσες που περιλαμβάνονται. Εάν η υπολειπόμενη διακύμανση δεν μειώθηκε πλέον με πρόσθετες συνιστώσες, η επιλογή του αριθμού των λανθανουσών συνιστωσών της πρώτης ελάχιστης τιμής (first minimum value) της υπολειπόμενης διακύμανσης έγινε για την αποφυγή της υπερπροσαρμογής.

Πιο αναλυτικά, τα αποτελέσματα που είχαν συσχέτιση με το σύνολο των 240 αρχικών δειγμάτων φέτας αξιοποιήθηκαν με στόχο την ανάλυση των δεδομένων. Τα δεδομένα που λήφθηκαν από τα τρία όργανα αξιολογήθηκαν με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα με το μοντέλο PLS-R. Σε αυτή τη μέθοδο, τα φασματικά δεδομένα που εξήχθησαν από το VideometerLab ($n=36$, 18 Mean και 18 SD), το VideometerLite ($n=26$, 13 Mean και 13 SD) και το FTIR-6200 JASCO με τους 934 κυματαριθμούς μεταξύ των περιοχών $1800-900\text{ cm}^{-1}$ χρησιμοποιήθηκαν σαν ανεξάρτητες μεταβλητές X , ενώ ως εξαρτημένες μεταβλητές Y χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα της OMX. Για την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα XLSTAT (έκδοση 2023.3.1, Lumivero, Denver, Colorado, U.S.) και δημιουργήθηκαν μοντέλα για τις συνθήκες συσκευασίας υπό κενό αέρος και εντός άλμης στους 4°C και 10°C με διαφορετική προ-επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων που αντλήθηκαν από τα τρία όργανα, η οποία έγινε με τη χρήση του λογισμικού The Unscrambler® (έκδοση 9.7, CAMO Software AS, Oslo, Norway). Για κάθε προκύπτον μοντέλο δοκιμάστηκαν συγκεκριμένοι μετασχηματισμοί αρχικών δεδομένων [Savitzky-Golay Derivatives $1^{\text{η}}$ και $2^{\text{η}}$ παράγωγος, και τυπική κανονική μεταβλητή (Standard Normal Variate, SNV)].

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξήχθησαν από το VideometerLab:

- i. **Συσκευασία υπό κενό αέρος (4°C και 10°C):** το 70% (n=158) του συνόλου των δειγμάτων αξιοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το εναπομείναν 30% (n=69) για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου. Οι μεταβλητές X (n=36) που επιλέχθηκαν, μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό SNV. Ο μετασχηματισμός SNV εφαρμόζεται στα φασματοσκοπικά δεδομένα, καθώς ελαττώνει ενδεχόμενες παρεμβολές ή αλληλοεπικαλύψεις (Sinelli et al., 2005). Ως μεταβλητές Y (n=1) θεωρήθηκαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα της OMX.
- ii. **Συσκευασία εντός άλμης (4°C και 10°C):** το 70% (n=161) του συνόλου των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30% (n=69) για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου. Οι μεταβλητές X (n=36) που επιλέχθηκαν, μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό SNV. Ως μεταβλητές Y (n=1) επιλέχθηκαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα της OMX.

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξήχθησαν από το VideometerLite:

- i. **Συσκευασία υπό κενό αέρος (4°C και 10°C):** το 70% (n=137) του συνόλου των δειγμάτων αξιοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το εναπομείναν 30% (n=59) για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου. Οι μεταβλητές X (n=26) που επιλέχθηκαν, μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό SNV. Τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX χρησιμοποιήθηκαν ως Y μεταβλητές (n=1).
- ii. **Συσκευασία εντός άλμης (4°C και 10°C):** το 70% (n=108) του συνόλου των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30% (n=47) για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου. Επιλέχθηκαν οι μεταβλητές X (n=26) χωρίς μετασχηματισμό. Ως μεταβλητές Y (n=1) θεωρήθηκαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα της OMX.

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξήχθησαν από το FTIR-6200 JASCO:

- i. **Συσκευασία υπό κενό αέρος (4°C και 10°C):** το 70% (n=159) του συνόλου των δειγμάτων αξιοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30% (n=69) για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου. Οι μεταβλητές X (n=934) που επιλέχθηκαν, μετασχηματίστηκαν με την 2^η παράγωγο Savitzky-Golay (παράθυρο 13 σημείων). Ως μεταβλητές Y (n=1) επιλέχθηκαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα της OMX.

- ii. **Συσκευασία εντός άλμης (4°C και 10°C):** το 70% (n=160) του συνόλου των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το εναπομείναν 30% (n=70) για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου. Οι μεταβλητές X (n=934) που επιλέχθηκαν, μετασχηματίστηκαν με την 1^η παράγωγο Savitzky-Golay (παράθυρο 13 σημείων) για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων και τη μείωση του θορύβου. Τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX αξιοποιήθηκαν ως Y μεταβλητές (n=1).

Η απόδοση του μοντέλου PLS-R συγκρίθηκε με βάση την τιμή RMSE και τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) για τις πραγματικές τιμές έναντι της πρόβλεψης (prediction) των τιμών της OMX.

2.11.2 Μοντέλο διαχωρισμού δειγμάτων με και χωρίς το παθογόνο *L. monocytogenes* με διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)

Η διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA) δύναται να επιτρέψει τον διαχωρισμό των δειγμάτων φέτας σε επιλεγμένες κλάσεις. Στην προκειμένη περίπτωση λαμβάνει χώρα διαχωρισμός σε δείγματα με και χωρίς *L. monocytogenes*. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος έχει σκοπό τη δημιουργία μιας καινούργιας νοητής γραμμικής περιοχής (περιοχή X και Y μεταβλητών) που θα διαχωρίζει τις κλάσεις μεταξύ τους και συγχρόνως θα προβάλλει τα αρχικά δεδομένα εισόδου-εξόδου σε έναν λανθάνοντα χώρο, εξάγοντας έναν αριθμό κυρίων συνιστωσών, των λανθανουσών μεταβλητών (LVs) με ορθογώνια δομή (Panagou et al., 2014). Η πρώτη LV μεταφέρει τον μεγαλύτερο αριθμό πληροφοριών, ενώ έπεται η δεύτερη LV, η τρίτη κ.ο.κ., οι οποίες επιτρέπουν τη θέση στον νέο χώρο των X ανεξάρτητων μεταβλητών και την πρόβλεψη (prediction) των Y εξαρτημένων μεταβλητών (Ballabio & Todeschini, 2009, Brereton & Lloyd, 2014, Gromski et al., 2015). Ο προσδιορισμός του βέλτιστου αριθμού LVs πραγματοποιείται μέσω των υπολειπόμενων διακυμάνσεων προκειμένου να γίνει η μοντελοποίηση χρήσιμων πληροφοριών και να αποφευχθεί η υπέρμετρη προσαρμογή των δεδομένων (Brereton, 2006).

Όσον αφορά την παρούσα εργασία, έγινε ταξινόμηση των φασματικών δεδομένων που προέκυψαν από τα τρία όργανα αρχικά σε έναν δισδιάστατο πίνακα, όπου οι σειρές (X) εκφράζουν τα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (Κενό 4°C, Κενό 10°C, Άλμη 4°C, Άλμη 10°C), ενώ οι στήλες αντιπροσωπεύουν τις μεταβλητές (36 μήκη κύματος για το VideometerLab ή 26 μήκη κύματος για το VideometerLite ή 934 κυματαριθμούς για το FTIR-6200 JASCO). Ακόμη, μια στήλη (Y) που περιέχει την εξαρτημένη μεταβλητή (δείγματα χωρίς και με *L. monocytogenes*) εισήχθη στον συγκεκριμένο πίνακα. Με γνώμονα τον διαχωρισμό κάθε κλάσης, η μεταβλητή Y

κωδικοποιήθηκε σε αριθμητική μορφή αναθέτοντας το -1 στην «Κλάση 1» (απουσία *L. monocytogenes*) και το 1 στην «Κλάση 2» (παρουσία *L. monocytogenes*), ενώ το 0 επιλέχθηκε ως η οριακή τιμή διάκρισης της. Ο υπολογισμός της ευαισθησίας ταξινόμησης (sensitivity, %) του μοντέλου PLS-DA έλαβε χώρα μέσω του αριθμού των ορθά ταξινομημένων δειγμάτων φέτας σε κάθε κλάση διαιρεμένου με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων της αρχικής κλάσης (Sokolova & Lapalme, 2009). Ο προσδιορισμός της ακρίβειας (precision, %) του μοντέλου πραγματοποιήθηκε μέσω του αριθμού των δειγμάτων φέτας που ταξινομήθηκαν ορθά σε κάθε κλάση διαιρεμένου με τον αριθμό των δειγμάτων που προβλέφθηκαν θετικά από το μοντέλο σε κάθε κλάση. Ο υπολογισμός της συνολικά σωστής ακρίβειας ταξινόμησης (accuracy, %) του μοντέλου έγινε μέσω του αριθμού των ορθών ταξινομήσεων σε όλες τις κλάσεις διαιρεμένου με τον συνολικό αριθμό των αναλυμένων δειγμάτων (Sokolova & Lapalme, 2009).

Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος XLSTAT δημιουργήθηκαν τα μοντέλα. Τα προερχόμενα από την πολυφασματική απεικόνιση και τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier δεδομένα δεν επιδέχθηκαν καμία περαιτέρω προ-επεξεργασία.

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξήχθησαν από το VideometerLab:

- i. **Συσκευασία υπό κενό αέρος (4°C και 10°C):** για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου αξιοποιήθηκε το 70% των φασματικών δεδομένων όλων των δειγμάτων (n=158), χωρίς και με *L. monocytogenes*. Το εναπομείναν 30% (n=69) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου.
- ii. **Συσκευασία εντός άλμης (4°C και 10°C):** για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το 70% των φασματικών δεδομένων από όλα τα δείγματα (n=162), δίχως και με *L. monocytogenes*. Το υπόλοιπο 30% (n=70) αξιοποιήθηκε για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου.

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξήχθησαν από το VideometerLite:

- i. **Συσκευασία υπό κενό αέρος (4°C και 10°C):** για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου αξιοποιήθηκε το 70% των φασματικών δεδομένων όλων των δειγμάτων (n=137), χωρίς και με *L. monocytogenes*. Το υπόλοιπο 30% (n=59) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου.
- ii. **Συσκευασία εντός άλμης (4°C και 10°C):** για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το 70% των φασματικών δεδομένων από όλα τα δείγματα (n=108), δίχως και με *L. monocytogenes*. Το εναπομείναν 30% (n=47) αξιοποιήθηκε για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου.

Στην περίπτωση όπου τα δεδομένα εξήχθησαν από το FTIR-6200 JASCO:

- i. **Συσκευασία υπό κενό αέρος (4°C και 10°C):** αξιοποιήθηκε το 70% των φασματικών δεδομένων όλων των δειγμάτων (n=159) για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, χωρίς και με *L. monocytogenes*. Το εναπομείναν 30% (n=69) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου.
- ii. **Συσκευασία εντός άλμης (4°C και 10°C):** χρησιμοποιήθηκε το 70% των φασματικών δεδομένων από όλα τα δείγματα (n=161) για την ανάπτυξη (training) και επικύρωση (validation) του μοντέλου, δίχως και με *L. monocytogenes*. Το υπόλοιπο 30% (n=70) αξιοποιήθηκε για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου.

Για τα VideometerLab και VideometerLite ως X μεταβλητές ορίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των 18 (n=36) και 13 φασμάτων (n=26) αντίστοιχα, ενώ για το FTIR-6200 JASCO οι 934 κυματαριθμοί για κάθε δείγμα φέτας στην περιοχή 1800-900 cm⁻¹. Ως Y μεταβλητή και για τα τρία όργανα ορίστηκαν οι δύο κλάσεις -1 (απουσία *L. monocytogenes*) και 1 (παρουσία *L. monocytogenes*).

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

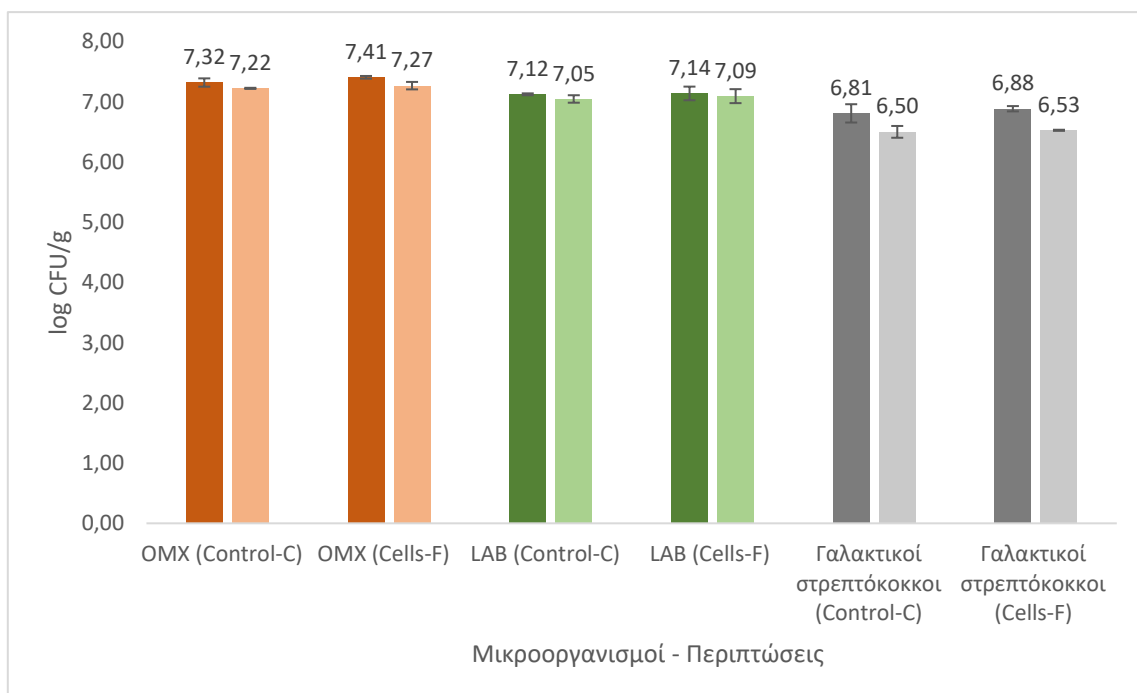
3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων

Στα παρακάτω σχήματα (Διαγράμματα 3.1-3.4) παρουσιάζεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών για τις 4 διαφορετικές συνθήκες συντήρησης. Στα ραβδογράμματα παρατίθενται οι μέσοι όροι του μικροβιακού φορτίου (\log CFU/g) και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Στις υπό μελέτη συνθήκες μετρήθηκαν η OMX, τα LAB και οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι είτε σε δείγματα φέτας που δεν περιείχαν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 (Control) είτε σε δείγματα που περιλάμβαναν τα τεχνολογικά βακτήρια με κάποια μορφή (Cells ή Film). Οι ακόλουθες μετρήσεις έλαβαν χώρα κατά την ημέρα εκκίνησης του πειράματος (Day 0) (αριστερές ράβδοι), καθώς και κατά την τελευταία δειγματοληψία (δεξιές ράβδοι).

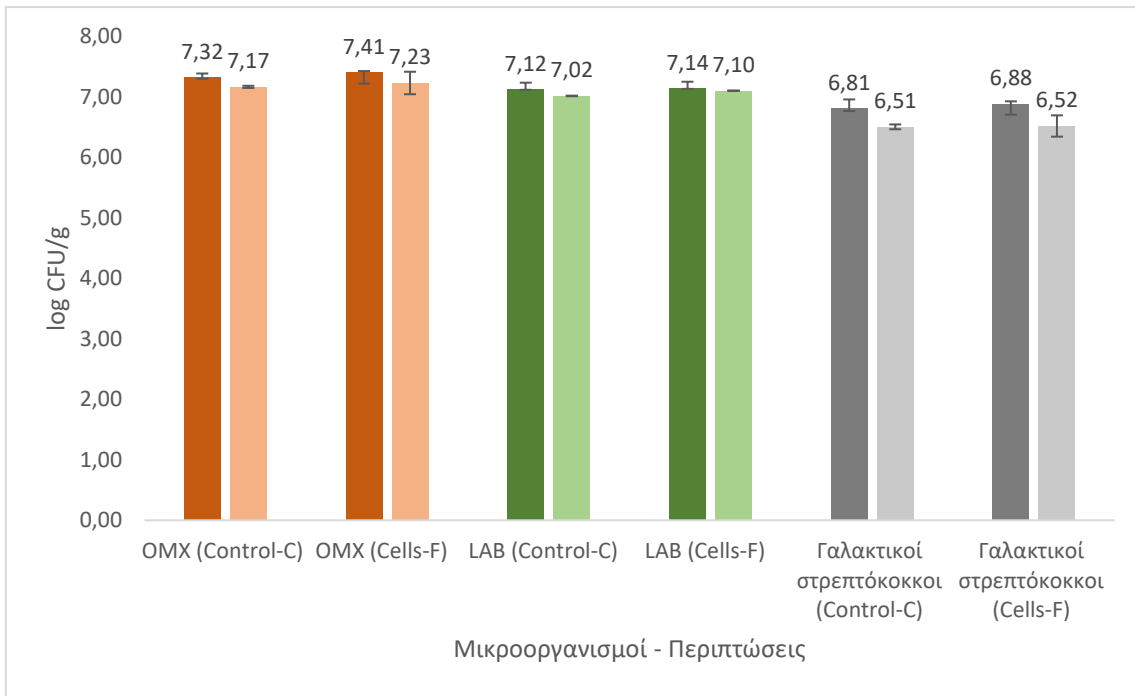
Στα Διαγράμματα 3.1-3.4 απεικονίζεται ο πληθυσμός της OMX, των LAB και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων στις διαφορετικές συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων φέτας. Ενδεικτικά, δίνονται οι μετρήσεις για την πρώτη και την τελευταία ημέρα συντήρησης σε κάθε συνθήκη, καθώς δεν υπήρξαν μεγάλες μεταβολές μεταξύ των δειγματοληψιών. Για τα δείγματα φέτας ο αρχικός πληθυσμός της OMX (Day 0) για τα Control (C) δείγματα ήταν $7,32 \log$ CFU/g ($\pm 0,07$), ενώ για τα Cells (F) και τα Film (EF) δείγματα $7,41 \log$ CFU/g ($\pm 0,02$). Επιπλέον, την Day 0 ο πληθυσμός των LAB για τα C δείγματα ήταν $7,12 \log$ CFU/g ($\pm 0,02$), ενώ για τα F και τα EF δείγματα $7,14 \log$ CFU/g ($\pm 0,11$). Ακόμη, την Day 0 ο πληθυσμός των γαλακτικών στρεπτόκοκκων για τα C δείγματα ήταν $6,81 \log$ CFU/g ($\pm 0,15$), ενώ για τα F και τα EF δείγματα $6,88 \log$ CFU/g ($\pm 0,04$).

Για τη συντήρηση εντός άλμης η OMX δεν μεταβλήθηκε σε μεγάλο βαθμό μέχρι το πέρας της και στις δύο θερμοκρασίες (4°C και 10°C), καθώς για τα C δείγματα ήταν $7,22 \log$ CFU/g ($\pm 0,01$) και $7,17 \log$ CFU/g ($\pm 0,02$) αντίστοιχα, ενώ για τα F δείγματα $7,27 \log$ CFU/g ($\pm 0,06$) και $7,23 \log$ CFU/g ($\pm 0,19$) αντίστοιχως. Στο τέλος της συντήρησης στους 4°C ο πληθυσμός των LAB και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων ήταν παρόμοιος για τα C δείγματα ($7,05 \pm 0,06 \log$ CFU/g και $6,50 \pm 0,10 \log$ CFU/g αντίστοιχα) και τα F δείγματα ($7,09 \pm 0,12 \log$ CFU/g και $6,53 \pm 0,01 \log$ CFU/g αντίστοιχα). Με την ολοκλήρωση της συντήρησης στους 10°C τα πληθυσμιακά επίπεδα για τα C δείγματα ($7,02 \pm 0,01 \log$ CFU/g και $6,51 \pm 0,04 \log$ CFU/g αντίστοιχα) ήταν παρόμοια με τα F δείγματα ($7,10 \pm 0,01 \log$ CFU/g και $6,52 \pm 0,18 \log$ CFU/g αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των LAB δεν μεταβλήθηκε σε μεγάλο βαθμό κατά τη συντήρηση σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες. Αντίθετα, τα πληθυσμιακά επίπεδα των γαλακτικών στρεπτόκοκκων μειώθηκαν ελαφρώς κατά τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4°C όσο και τους 10°C .

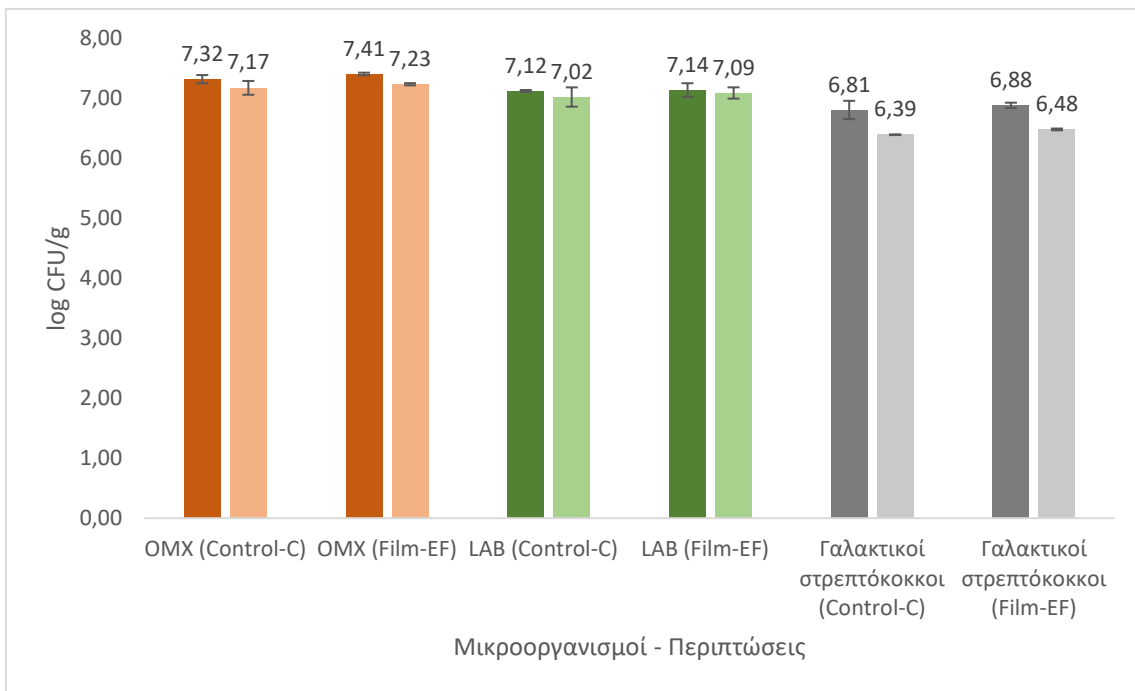
Αναφορικά με τη συντήρηση υπό κενό αέρος η OMX δεν μεταβλήθηκε σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια της και στις δύο θερμοκρασίες (4°C και 10°C), δεδομένου πως για τα C δείγματα ήταν 7,17 log CFU/g ($\pm 0,16$) και 7,58 log CFU/g ($\pm 0,23$) αντίστοιχα, ενώ για τα EF δείγματα 7,23 log CFU/g ($\pm 0,02$) και 7,59 log CFU/g ($\pm 0,29$) αντιστοίχως. Με την ολοκλήρωση της συντήρησης στους 4°C ο πληθυσμός των LAB και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων ήταν παρόμοιος για τα C δείγματα (7,02 \pm 0,16 log CFU/g και 6,39 \pm 0,01 log CFU/g αντίστοιχα) και τα EF δείγματα (7,09 \pm 0,09 log CFU/g και 6,48 \pm 0,02 log CFU/g αντίστοιχα). Στο τέλος της συντήρησης στους 10°C τα πληθυσμιακά επίπεδα για τα C δείγματα (7,35 \pm 0,10 log CFU/g και 6,42 \pm 0,01 log CFU/g αντίστοιχα) ήταν παρόμοια με τα EF δείγματα (7,39 \pm 0,01 log CFU/g και 6,51 \pm 0,17 log CFU/g αντίστοιχα). Ειδικότερα, ο πληθυσμός των LAB δεν μεταβλήθηκε ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες. Ωστόσο, τα πληθυσμιακά επίπεδα των γαλακτικών στρεπτόκοκκων μειώθηκαν ελαφρώς κατά τη συντήρηση τόσο στους 4°C όσο και τους 10°C.



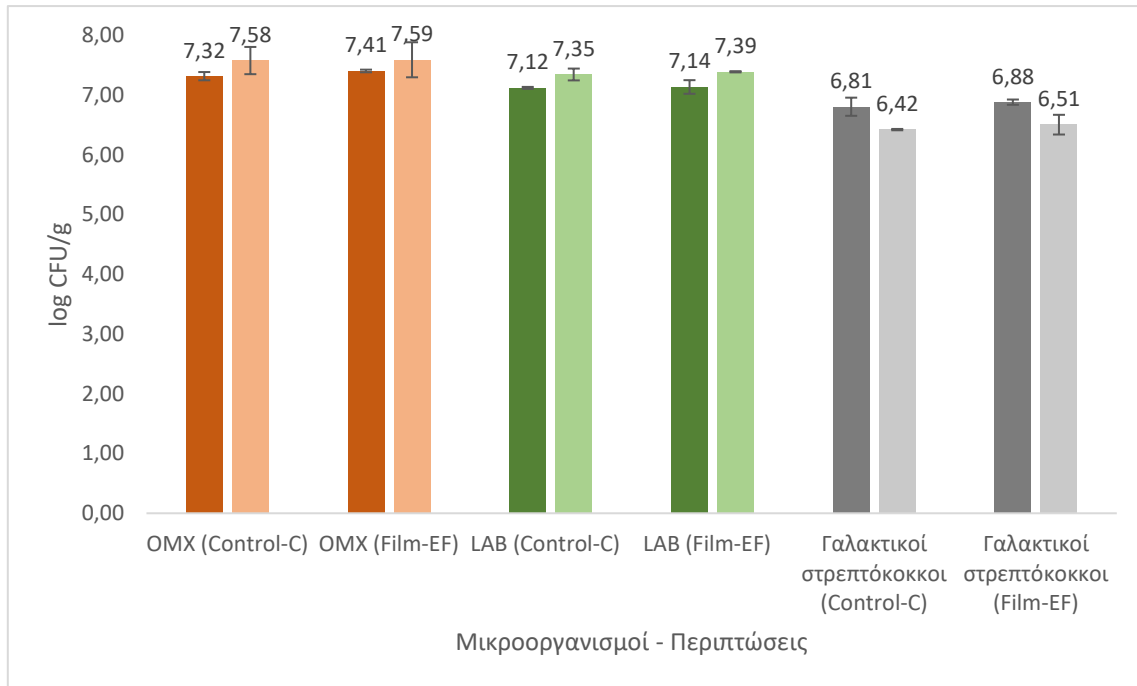
Διάγραμμα 3.1: Ραβδόγραμμα των μετρήσεων για τη συντήρηση της φέτας στους 4°C εντός άλμης για την OMX, τα LAB και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης (Day 76). Οι πιο έντονες χρωματικές αποχρώσεις των ράβδων αντιστοιχούν στην Day 0, ενώ οι πιο ανοιχτές στην Day 76 για κάθε περίπτωση.



Διάγραμμα 3.2: Ραβδόγραμμα των μετρήσεων για τη συντήρηση της φέτας στους 10°C εντός άλμης για την OMX, τα LAB και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης (Day 71). Οι πιο έντονες χρωματικές αποχρώσεις των ράβδων αντιστοιχούν στην Day 0, ενώ οι πιο ανοιχτές στην Day 71 για κάθε περίπτωση.



Διάγραμμα 3.3: Ραβδόγραμμα των μετρήσεων για τη συντήρηση της φέτας στους 4°C υπό κενό αέρος για την OMX, τα LAB και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης (Day 74). Οι πιο έντονες χρωματικές αποχρώσεις των ράβδων αντιστοιχούν στην Day 0, ενώ οι πιο ανοιχτές στην Day 74 για κάθε περίπτωση.



Διάγραμμα 3.4: Ραβδόγραμμα των μετρήσεων για τη συντήρηση της φέτας στους 10°C υπό κενό αέρος για την OMX, τα LAB και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης (Day 69). Οι πιο έντονες χρωματικές αποχρώσεις των ράβδων αντιστοιχούν στην Day 0, ενώ οι πιο ανοιχτές στην Day 69 για κάθε περίπτωση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εξέλιξη των μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του τυριού κατά την αποθήκευση του σε διαφορετικές συνθήκες προσομοιώνοντας καλές (εμπορικές) πρακτικές (άλμη και κενό αέρος). Επιπλέον, η μικροχλωρίδα της φέτας αξιολογήθηκε κατά την αποθήκευση στους 4°C και 10°C. Η εξέλιξη του πληθυσμού των LAB κατά τη συντήρηση του τυριού ήταν παρεμφερής και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης, αποτέλεσμα που εξάχθηκε και στη μελέτη των Papadopoulou et al. (2018). Κατά την αποθήκευση των τυριών ο πληθυσμός των μεσόφιλων LAB ήταν σταθερός, ενώ εκείνος των γαλακτικών στρεπτόκοκκων μειώθηκε ελαφρώς σε όλες τις περιπτώσεις. Ωστόσο, τα LAB και οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι αποτελούν την κυρίαρχη μικροβιακή χλωρίδα των τυριών στο σύνολο των περιπτώσεων, όπως φαίνεται από τα υψηλά πληθυσμιακά επίπεδα της φέτας κατά τη συντήρηση, αποτέλεσμα που βρέθηκε και σε άλλες έρευνες (Papadopoulou et al., 2018, Kamarinou et al., 2023). Ειδικότερα, στη μελέτη των Kamarinou et al. (2023), η OMX εμφάνισε παρόμοιες τιμές με την κυρίαρχη μικροχλωρίδα. Βέβαια, στις συγκεκριμένες μελέτες τα LAB προστέθηκαν κατά την ζύμωση/ωρίμανση και δεν ψεκάστηκαν ή ενσωματώθηκαν στις εδώδιμες μεμβράνες που κάλυπταν το τελικό προϊόν, όπως τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125.

Σύμφωνα με τους Papadopoulou et al. (2018) και Kamarinou et al. (2023), κατά την αποθήκευση του τυριού παρατηρήθηκε μια ελαφριά μείωση στον πληθυσμό των μεσόφιλων LAB σε όλες τις

περιπτώσεις. Επιπλέον, στα προβιοτικά δείγματα (προσθήκη *L. plantarum* T571) το φορτίο των μεσόφιλων LAB ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τα control δείγματα (Papadopoulou et al., 2018), κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε στην παρούσα εργασία. Στην ίδια μελέτη (Papadopoulou et al., 2018), παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη της συμπληρωματικής καλλιέργειας δεν επηρέασε τις τιμές των LAB κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, αποτέλεσμα παρόμοιο και με προηγούμενη μελέτη σχετικά με τη φέτα (Dimitrellou et al., 2014).

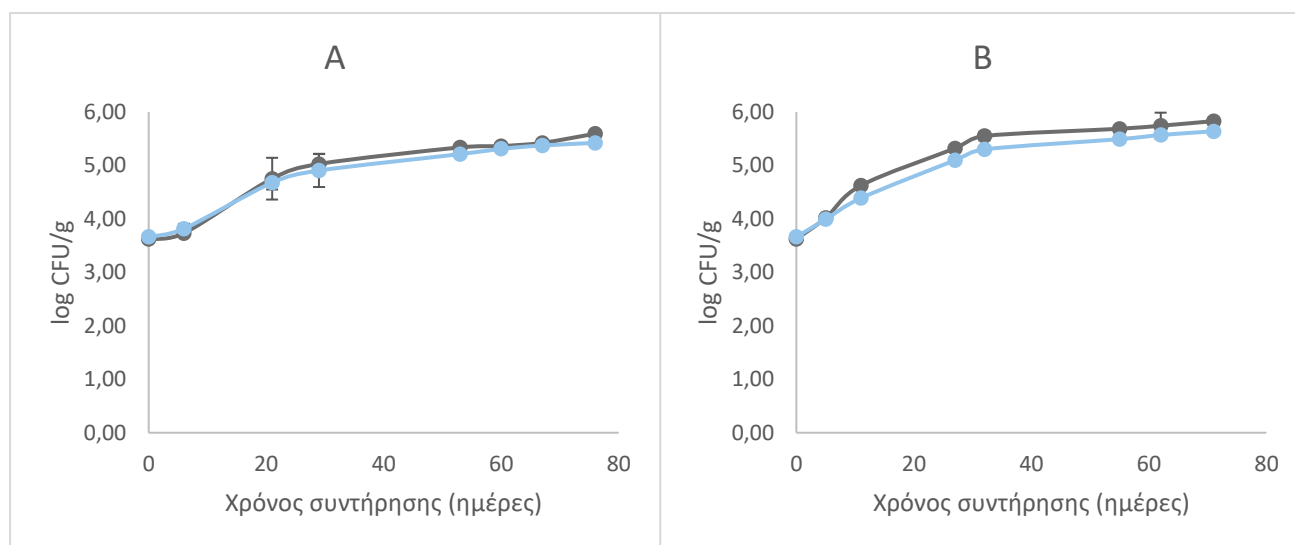
Στα σχήματα που ακολουθούν (Διαγράμματα 3.5-3.8) παρατίθεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών για τις 4 διαφορετικές συνθήκες συντήρησης. Στα διαγράμματα διασποράς παρουσιάζονται οι μέσοι όροι του μικροβιακού φορτίου (log CFU/g) και οι ανάλογες τυπικές αποκλίσεις. Στις μελετώμενες συνθήκες απαριθμήθηκαν οι ζύμες-μύκητες και το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* είτε σε δείγματα φέτας που δεν περιλάμβαναν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 (C) είτε σε δείγματα που δεν περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια, αλλά περιλάμβαναν το παθογόνο (Control + *L. monocytogenes*), είτε σε δείγματα που περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια με κάποια μορφή (F ή EF), είτε σε δείγματα που δεν περιλάμβαναν τα τεχνολογικά βακτήρια, όμως περιείχαν το παθογόνο (Cells ή Film + *L. monocytogenes*). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα χρονικά σημεία (δειγματοληψίες), που διέφεραν για κάθε συνθήκη συντήρησης.

Στα Διαγράμματα 3.5-3.8 απεικονίζεται ο πληθυσμός των ζυμών – μυκήτων και του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* στις διαφορετικές συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων φέτας. Για τα δείγματα φέτας ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών - μυκήτων (Day 0) για τα C δείγματα ήταν 3,62 log CFU/g ($\pm 0,01$), ενώ για τα F και τα EF δείγματα 3,66 log CFU/g ($\pm 0,01$). Ακόμη, την Day 0 ο πληθυσμός του παθογόνου για τα Control + *L. monocytogenes* (CL) δείγματα ήταν 2,48 log CFU/g ($\pm 0,06$), ενώ για τα Cells + *L. monocytogenes* (FL) και τα Film + *L. monocytogenes* (EFL) δείγματα 2,60 log CFU/g ($\pm 0,05$).

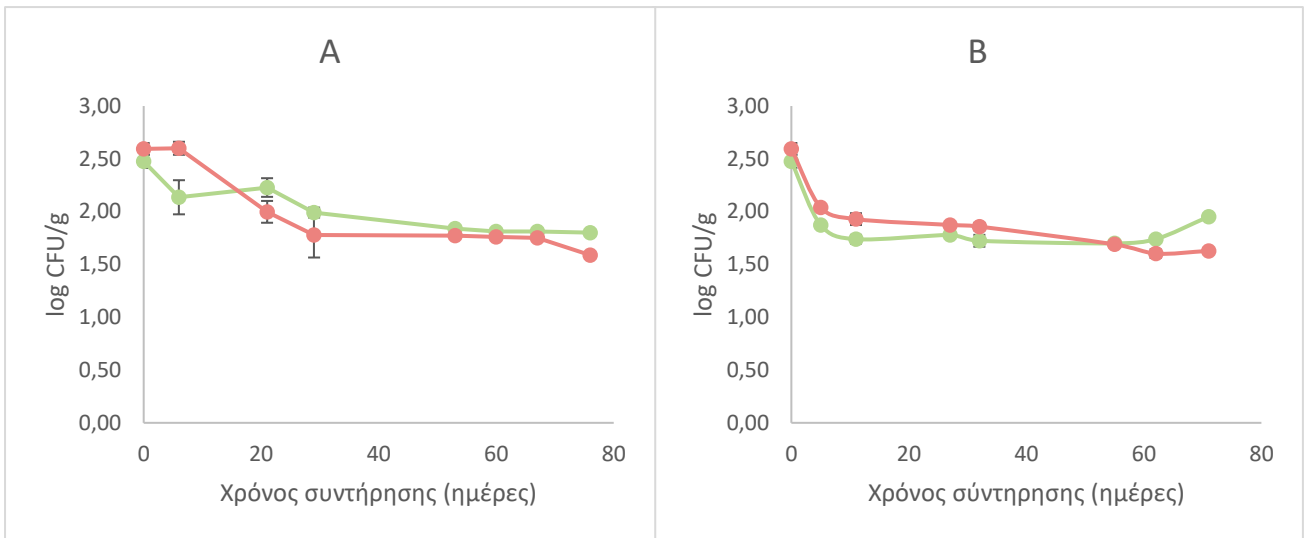
Στο τέλος της συντήρησης εντός άλμης στους 4°C και 10°C ο πληθυσμός των ζυμών - μυκήτων για τα C δείγματα ήταν 5,59 log CFU/g \pm (0,26) και 5,83 log CFU/g \pm (0,05) αντίστοιχα, ενώ για τα F δείγματα 5,42 log CFU/g \pm (0,04) και 5,64 log CFU/g \pm (0,04) αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, τα πληθυσμιακά επίπεδα των ζυμών - μυκήτων αυξήθηκαν ιδιαίτερα κατά τη συντήρηση και στις δύο θερμοκρασίες. Η αύξηση ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη για τα C δείγματα συγκριτικά με τα F τόσο στους 4°C όσο και τους 10°C. Με την ολοκλήρωση της συντήρησης εντός άλμης στους 4°C και 10°C ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* για τα CL δείγματα ήταν 1,80 log CFU/g \pm (0,14) και 1,95 log CFU/g \pm (0,07) αντίστοιχα, ενώ για τα FL δείγματα 1,59 log CFU/g \pm (0,16) και 1,63 log CFU/g \pm (0,21) αντίστοιχα. Ειδικότερα, τα πληθυσμιακά επίπεδα του *L. monocytogenes* μειώθηκαν σε μεγάλο

βαθμό κατά τη συντήρηση και στις δύο θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός του παθογόνου ήταν ελαφρώς μικρότερος για τα FL δείγματα σε σχέση με τα CL δείγματα τόσο στους 4°C όσο και τους 10°C.

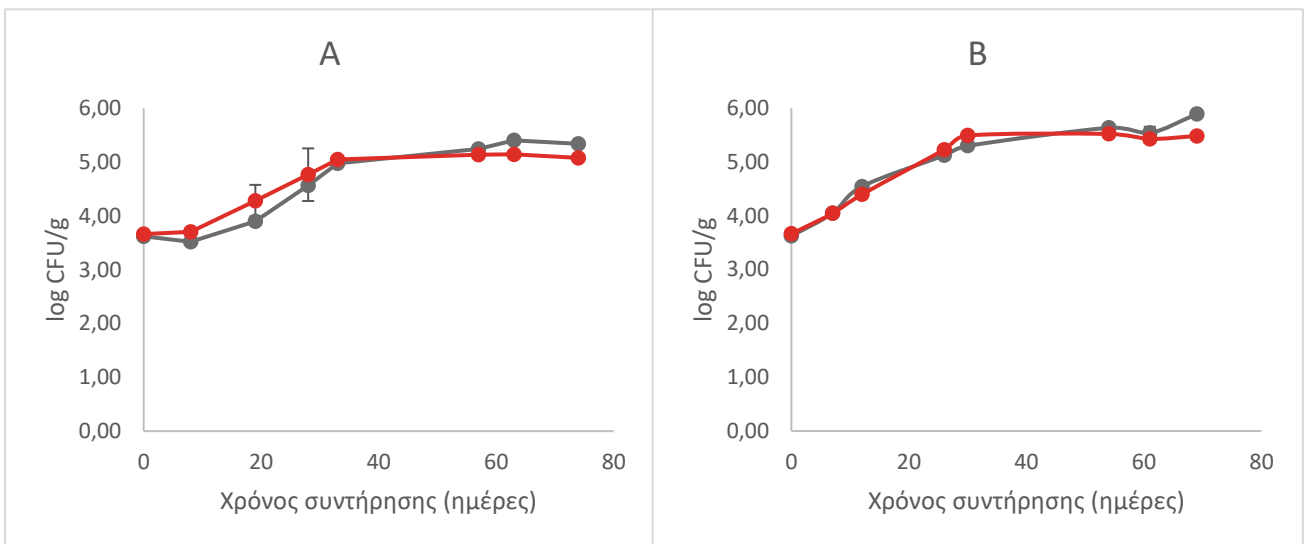
Αναφορικά με την ολοκλήρωση της συντήρησης υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C ο πληθυσμός των ζυμών - μυκήτων για τα C δείγματα ήταν $5,34 \log \text{CFU/g} \pm (0,03)$ και $5,89 \log \text{CFU/g} \pm (0,13)$ αντίστοιχα, ενώ για τα EF δείγματα $5,08 \log \text{CFU/g} \pm (0,09)$ και $5,48 \log \text{CFU/g} \pm (0,02)$ αντίστοιχα. Ειδικότερα, τα πληθυσμιακά επίπεδα των ζυμών - μυκήτων αυξήθηκαν σε μεγάλο βαθμό κατά τη συντήρηση και στις δύο θερμοκρασίες. Η αύξηση ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη για τα C δείγματα σε σύγκριση με τα EF τόσο στους 4°C όσο και τους 10°C. Στο τέλος της συντήρησης υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* για τα CL δείγματα ήταν $1,54 \log \text{CFU/g} \pm (0,09)$ και $1,81 \log \text{CFU/g} \pm (0,05)$ αντίστοιχα, ενώ τα EFL δείγματα $1,15 \log \text{CFU/g} \pm (0,21)$ και $1,45 \log \text{CFU/g} \pm (0,21)$ αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα πληθυσμιακά επίπεδα του *L. monocytogenes* μειώθηκαν αρκετά κατά τη συντήρηση και στις δύο θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός του παθογόνου ήταν ελαφρώς μικρότερος για τα EFL δείγματα σε σχέση με τα CL δείγματα τόσο στους 4°C όσο και τους 10°C.



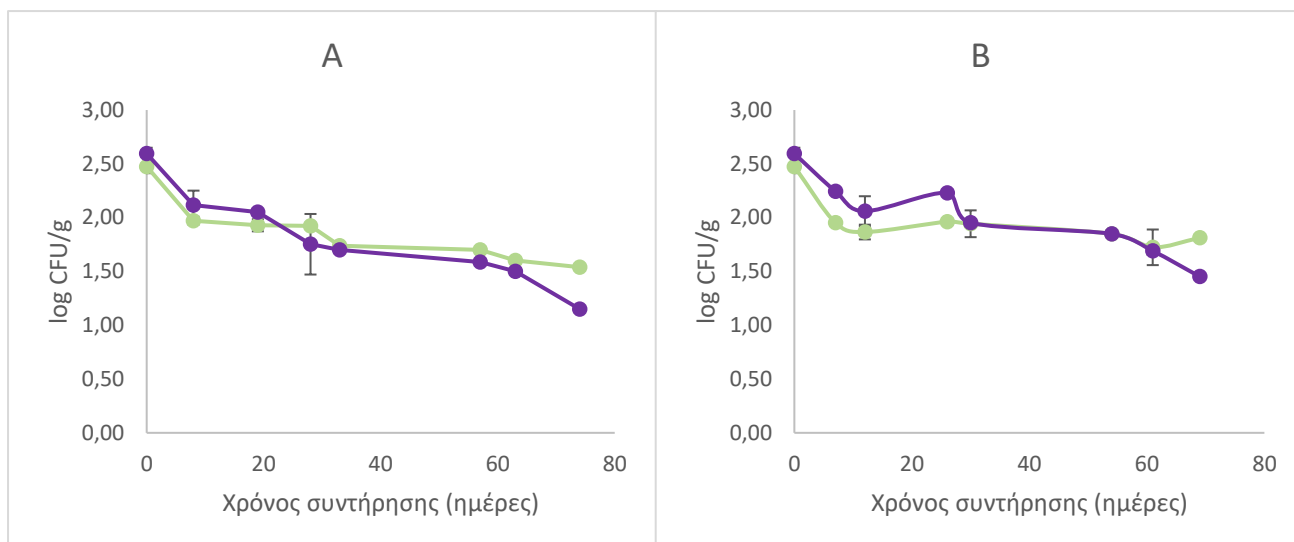
Διάγραμμα 3.5: Διάγραμμα ανάπτυξης και τυπικών αποκλίσεων (\pm) για τις ζύμες – μύκητες κατά τη συντήρηση της φέτας στους 4°C (A) και 10°C (B) εντός άλμης αναφορικά με τις μεταχειρίσεις Control (C) (●) και Cells (F) (●).



Διάγραμμα 3.6: Διάγραμμα ανάπτυξης και τυπικών αποκλίσεων (\pm) για το *L. monocytogenes* κατά τη συντήρηση της φέτας στους 4°C (A) και 10°C (B) εντός άλμης αναφορικά με τις μεταχειρίσεις Control + *L. monocytogenes* (CL) (●) και Cells + *L. monocytogenes* (FL) (●).



Διάγραμμα 3.7: Διάγραμμα ανάπτυξης και τυπικών αποκλίσεων (\pm) για τις ζύμες - μύκητες κατά τη συντήρηση της φέτας στους 4°C (A) και 10°C (B) υπό κενό αέρος αναφορικά με τις μεταχειρίσεις Control (●) (C) και Film (EF) (●).



Διάγραμμα 3.8: Διάγραμμα ανάπτυξης και τυπικών αποκλίσεων (\pm) για το *L. monocytogenes* κατά τη συντήρηση της φέτας στους 4°C (A) και 10°C (B) υπό κενό αέρος αναφορικά με τις μεταχειρίσεις Control + *L. monocytogenes* (CL) (●) και Film + *L. monocytogenes* (EFL) (●).

Οι ζύμες αποτελούν συχνά μέρος της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας των παραδοσιακών τυριών σε άλμη, όπως η φέτα (Geronikou et al., 2022). Τα επίπεδα μόλυνσης εξαιτίας ζυμών επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας και κατ' επέκταση τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Fadda et al., 2001, Bintsis & Papademas, 2002). Στην παρούσα μελέτη, ο πληθυσμός των ζυμών/μυκήτων αυξήθηκε περίπου 2 log σε όλες τις περιπτώσεις, με την αύξηση να ήταν μεγαλύτερη στους 10°C συγκριτικά με τους 4°C, όπως και στα control δείγματα σε σχέση με τα δείγματα που περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια. Σε έρευνα των Papadopoulou et al. (2018), κατά την αποθήκευση της φέτας στους 4°C και 12°C, οι ζύμες/μύκητες αυξήθηκαν αρκετά τόσο στα control όσο και στα προβιοτικά δείγματα, αποτέλεσμα που συμβαδίζει με την τρέχουσα εργασία. Αν και οι ζύμες/μύκητες δεν προστίθενται ως μέρος της καλλιέργειας εκκίνησης, συνήθως παρατηρούνται υψηλοί αριθμοί, που προέρχονται από το περιβάλλον ή τον εξοπλισμό επεξεργασίας (Manolopoulou et al., 2003).

Οι βακτηριοκτόνες/βακτηριοστατικές ενώσεις που παράγονται από τα LAB μπορούν να εξαλείψουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* (Murdock et al., 2007). Στην πραγματικότητα, πολλά στελέχη LAB έχουν αποδεδειγμένη αντιλειτουργική δράση, ενώ ένας σημαντικός αριθμός από αυτά έχει αξιοποιηθεί ως συνκαλλιέργεια στη ζύμωση τυριών για τον έλεγχο του *L. monocytogenes* (Silva et al., 2018). Οι Papadopoulou et al. (2018) αξιολόγησαν τη συμπεριφορά του κατά την ωρίμανση και αποθήκευση της φέτας χωρίς ή με την προσθήκη του *L. plantarum* T571 ως συμπληρωματική καλλιέργεια και διέκριναν ότι το προστιθέμενο στέλεχος LAB αδρανοποίησε το παθογόνο συντομότερα σε σύγκριση με τα control δείγματα. Στην ίδια μελέτη, η συντήρηση στους 12°C εξάλειψε το παθογόνο σε μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τη συντήρηση υπό ψύξη

(Papadopoulou et al., 2018). Σε πρότερες έρευνες για την παρακολούθηση της επιβίωσης του *L. monocytogenes* σε ποικίλα τυριά αναφέρθηκε πως η αδρανοποίηση του παθογόνου ήταν ταχύτερη σε υψηλές θερμοκρασίες συγκριτικά με τις χαμηλές θερμοκρασίες (Kagkli et al., 2009, Jesus et al., 2016). Σύμφωνα με τους Papadopoulou et al. (2018), οι διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, π.χ. 4°C και 12°C, και η προσθήκη στελεχών LAB με προβιοτικές ιδιότητες επηρεάζουν την ποικιλομορφία των πληθυσμών των παθογόνων, καθώς και την ανάπτυξη και επιβίωση των διάφορων στελεχών παθογόνων σε ένα πραγματικό οικοσύστημα τροφίμων.

Στην παρούσα μελέτη, δύο στελέχη *L. monocytogenes* εμβολιάστηκαν σε φέτα προκειμένου να αξιολογηθεί ο μικροβιακός κίνδυνος. Στις περιπτώσεις με παρουσία των στελεχών LAB στα δείγματα φέτας που εμβολιάστηκαν με τα δύο στελέχη υπήρξε μια ελαφριά αναστολή του παθογόνου σε σύγκριση με τα control τόσο κατά τη διάρκεια της συντήρησης εντός άλμης όσο και υπό κενό αέρος. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες. Οι Prezzi et al. (2020) διερεύνησαν την επίδραση του *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes* που εμβολιάστηκε στην επιφάνεια του τυριού Minas Frescal κατά την αποθήκευση στους 7°C. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν μείωση 1,1-1,6 log CFU/g στον πληθυσμό του μετά από 21 ημέρες αποθήκευσης. Οι Pisano et al. (2022) αξιολόγησαν τη χρήση τριών στελεχών *Lc. lactis* και δύο στελεχών *L. plantarum* στον περιορισμό της ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε εργαστηριακά φρέσκα τυριά, αναφέροντας ότι τα εξεταζόμενα στελέχη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προστατευτικές καλλιέργειες, καθώς μείωσαν τον πληθυσμό του παθογόνου κατά 3-4 log CFU/g σε σύγκριση με τα control.

3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 3.1-3.2) παρουσιάζονται οι μετρήσεις του pH για τις 4 συνθήκες συντήρησης. Στους πίνακες παρατίθενται οι μέσοι όροι των τιμών του pH και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Στις υπό μελέτη συνθήκες το pH μετρήθηκε είτε σε δείγματα φέτας που δεν περιείχαν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 (C), είτε σε δείγματα που περιλάμβαναν τα τεχνολογικά βακτήρια με κάποια μορφή (F ή EF), είτε σε δείγματα που δεν περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια, αλλά περιλάμβαναν το παθογόνο (CL), είτε σε δείγματα που περιείχαν τόσο τα τεχνολογικά βακτήρια όσο και το παθογόνο (FL ή EFL). Οι μετρήσεις που έπονται πραγματοποιήθηκαν κατά την ημέρα εκκίνησης του πειράματος (Day 0), όπως και κατά την τελευταία δειγματοληψία.

Στους Πίνακες 3.1-3.2 απεικονίζονται οι τιμές του pH στις διαφορετικές συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων φέτας. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται οι μετρήσεις για την πρώτη και την τελευταία ημέρα συντήρησης σε κάθε συνθήκη, καθώς δεν υπήρξαν μεγάλες μεταβολές μεταξύ των

δειγματοληψιών. Για τα δείγματα, οι αρχικές τιμές του pH (Day 0) είχαν εύρος τιμών από 4,25 ($\pm 0,01$) έως 4,30 ($\pm 0,05$).

Στο τέλος της συντήρησης εντός άλμης στους 4°C το pH βρέθηκε μεταξύ 4,31 ($\pm 0,02$) και 4,40 ($\pm 0,03$), ενώ στους 10°C κυμάνθηκε από 4,00 ($\pm 0,02$) έως 4,08 ($\pm 0,02$). Με την ολοκλήρωση της συντήρησης υπό κενό αέρος στους 4°C το pH βρέθηκε μεταξύ 3,96 ($\pm 0,01$) και 4,03 ($\pm 0,01$), ενώ στους 10°C κυμάνθηκε από 4,08 ($\pm 0,01$) έως 4,16 ($\pm 0,05$). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης εντός άλμης οι τιμές του pH δεν μεταβλήθηκαν ιδιαίτερα. Ωστόσο, για τους 4°C υπήρξε μια ελαφρώς αυξητική τάση, ενώ για τους 10°C μια ελαφρώς πτωτική πορεία. Κατά τη συντήρηση υπό κενό αέρος δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή των τιμών του pH. Εντούτοις, και για τις δύο θερμοκρασίες παρατηρήθηκε μια ελαφρώς πτωτική τάση.

Πίνακας 3.1: Τιμές του pH για τη συντήρηση της φέτας στους 4°C και 10°C εντός άλμης την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης σε κάθε συνθήκη (Days 71, 76). C: Control, F: Cells, CL: Control + *L. monocytogenes*, FL: Cells + *L. monocytogenes*.

ΆΛΜΗ				
4°C				
Ημέρες	C	F	CL	FL
0	4,30 \pm 0,05	4,25 \pm 0,01	4,28 \pm 0,01	4,26 \pm 0,03
76	4,31 \pm 0,02	4,34 \pm 0,04	4,32 \pm 0,02	4,40 \pm 0,03
10°C				
Ημέρες	C	F	CL	FL
0	4,30 \pm 0,05	4,25 \pm 0,01	4,28 \pm 0,01	4,26 \pm 0,03
71	4,08 \pm 0,02	4,08 \pm 0,01	4,02 \pm 0,04	4,00 \pm 0,02

Πίνακας 3.2: Τιμές του pH για τη συντήρηση της φέτας στους 4°C και 10°C υπό κενό αέρος την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης σε κάθε συνθήκη (Days 69, 74). C: Control, EF: Film, CL: Control + *L. monocytogenes*, EFL: Film + *L. monocytogenes*.

KENO				
4°C				
Ημέρες	C	EF	CL	EFL
0	4,30 \pm 0,05	4,25 \pm 0,01	4,28 \pm 0,01	4,26 \pm 0,03
74	4,03 \pm 0,01	3,97 \pm 0,05	3,97 \pm 0,01	3,96 \pm 0,01
10°C				
Ημέρες	C	EF	CL	EFL
0	4,30 \pm 0,05	4,25 \pm 0,01	4,28 \pm 0,01	4,26 \pm 0,03
69	4,16 \pm 0,05	4,08 \pm 0,01	4,11 \pm 0,01	4,10 \pm 0,01

Τα είδη του γένους *Lactobacillus* γενικά αναφέρεται ότι έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης και επιβίωσης σε ζυμωμένα τρόφιμα με χαμηλές τιμές pH, που μπορεί να κυμαίνονται από 3,7 έως 4,3 (Tripathi & Giri, 2014), ένα αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και από την παρούσα μελέτη. Σε προηγούμενες έρευνες των Milesi et al. (2009) και Burns et al. (2012) σε μαλακά και ημίσκληρα είδη τυριού καταγράφηκαν χαμηλότερες τιμές pH για τα τυριά που εμβολιάστηκαν με προβιοτικές καλλιέργειες ως συμπληρωματικές. Σε μελέτη των Kamarinou et al. (2023) με τη χρήση LAB ως συμπληρωματικών καλλιεργειών, παρατηρήθηκε κατά την αποθήκευση στους 4°C μείωση των τιμών του pH της φέτας, με τις τιμές να βρίσκονται μεταξύ 4,1 και 4,4. Σύμφωνα με τους Kourkoutas et al. (2006), Dimitrellou et al. (2014) και Papadopoulou et al. (2018), οι οποίοι μελέτησαν τη φέτα και κάποια λευκά τυριά άλμης που παράχθηκαν με την προσθήκη συμπληρωματικών στελεχών LAB, είναι συνηθισμένη μια πτώση του pH σε τιμές 4,4 ή μικρότερες.

Παρόλο που στην παρούσα μελέτη τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 ψεκάστηκαν ή ενσωματώθηκαν στις εδώδιμες μεμβράνες που κάλυπταν το τελικό προϊόν και δεν προστέθηκαν κατά την ζύμωση/ωρίμανση, παρατηρήθηκε μια μικρή πτώση του pH στην πλειονότητα των περιπτώσεων με εξαίρεση εκείνες της συντήρησης εντός άλμης στους 4°C που υπήρξε μια μικρή αύξηση. Ειδικότερα, για τα δείγματα που προστέθηκαν τα στελέχη LAB η μείωση ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα control, αποτέλεσμα παρόμοιο με εκείνα των ανωτέρω ερευνών (Kourkoutas et al. 2006, Dimitrellou et al. 2014, Papadopoulou et al. 2018).

3.3 Αποτελέσματα μέτρησης ενεργότητας νερού (a_w)

Στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 3.3-3.4) παρατίθενται οι μετρήσεις της a_w για τις 4 συνθήκες συντήρησης. Στους πίνακες παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της a_w και οι ανάλογες τυπικές αποκλίσεις. Στις μελετώμενες συνθήκες η a_w μετρήθηκε είτε σε δείγματα φέτας που δεν περιλάμβαναν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 (C), είτε σε δείγματα που περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια με κάποια μορφή (F ή EF), είτε σε δείγματα που δεν περιλάμβαναν τα τεχνολογικά βακτήρια, όμως περιείχαν το παθογόνο (CL), είτε σε δείγματα που περιλάμβαναν, όχι μόνο τα τεχνολογικά βακτήρια, αλλά και το παθογόνο (FL ή EFL). Οι ακόλουθες μετρήσεις έλαβαν χώρα κατά την ημέρα εκκίνησης του πειράματος (Day 0), καθώς και κατά την τελευταία δειγματοληψία.

Στους Πίνακες 3.3-3.4 απεικονίζονται οι τιμές της a_w στις διαφορετικές συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων φέτας. Ενδεικτικά, παραθέτονται οι μετρήσεις για την πρώτη και την τελευταία ημέρα συντήρησης σε κάθε συνθήκη, καθώς δεν υπήρξαν μεγάλες μεταβολές μεταξύ των δειγματοληψιών.

Για τα δείγματα, οι αρχικές τιμές της a_w (Day 0) είχαν εύρος τιμών από 0,9616 ($\pm 0,0005$) έως 0,9648 ($\pm 0,0015$).

Στο τέλος της συντήρησης εντός άλμης στους 4°C η a_w βρέθηκε μεταξύ 0,9669 ($\pm 0,0016$) και 0,9693 ($\pm 0,0015$), ενώ στους 10°C κυμάνθηκε από 0,9727 ($\pm 0,0009$) έως 0,9736 ($\pm 0,0001$). Με την ολοκλήρωση της συντήρησης υπό κενό αέρος στους 4°C η a_w βρέθηκε μεταξύ 0,9635 ($\pm 0,0014$) και 0,9695 ($\pm 0,0002$), ενώ στους 10°C κυμάνθηκε από 0,9604 ($\pm 0,0002$) έως 0,9646 ($\pm 0,0049$). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης εντός άλμης οι τιμές της a_w δεν μεταβλήθηκαν ιδιαίτερα. Ωστόσο, και για τις δύο θερμοκρασίες υπήρξε μια ελαφρώς αυξητική τάση. Κατά τη συντήρηση υπό κενό αέρος δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή των τιμών της a_w . Εντούτοις, για τους 4°C παρατηρήθηκε μια ελαφρώς αυξητική πορεία, ενώ για τους 10°C μια ελαφρώς πτωτική τάση.

Πίνακας 3.3: Τιμές της ενεργότητας νερού (a_w) για τη συντήρηση της φέτας στους 4°C και 10°C εντός άλμης την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης σε κάθε συνθήκη (Days 71, 76). C: Control, F: Cells, CL: Control + *L. monocytogenes*, FL: Cells + *L. monocytogenes*.

ΑΛΜΗ				
4°C				
Ημέρες	C	F	CL	FL
0	0,9648 \pm 0,0015	0,9628 \pm 0,0010	0,9625 \pm 0,0021	0,9616 \pm 0,0005
76	0,9691 \pm 0,0003	0,9669 \pm 0,0016	0,9693 \pm 0,0015	0,9672 \pm 0,0016
10°C				
Ημέρες	C	F	CL	FL
0	0,9648 \pm 0,0015	0,9628 \pm 0,0010	0,9625 \pm 0,0021	0,9616 \pm 0,0005
71	0,9736 \pm 0,0001	0,9732 \pm 0,0001	0,9730 \pm 0,0004	0,9727 \pm 0,0009

Πίνακας 3.4: Τιμές της ενεργότητας νερού (a_w) για τη συντήρηση της φέτας στους 4°C και 10°C υπό κενό αέρος την πρώτη (Day 0) και την τελευταία ημέρα συντήρησης σε κάθε συνθήκη (Days 69, 74). C: Control, EF: Film, CL: Control + *L. monocytogenes*, EFL: Film + *L. monocytogenes*.

ΚΕΝΟ				
4°C				
Ημέρες	C	EF	CL	EFL
0	0,9648 \pm 0,0015	0,9628 \pm 0,0010	0,9625 \pm 0,0021	0,9616 \pm 0,0005
74	0,9658 \pm 0,0016	0,9678 \pm 0,0026	0,9635 \pm 0,0014	0,9695 \pm 0,0002
10°C				
Ημέρες	C	EF	CL	EFL
0	0,9648 \pm 0,0015	0,9628 \pm 0,0010	0,9625 \pm 0,0021	0,9616 \pm 0,0005
69	0,9646 \pm 0,0049	0,9604 \pm 0,0002	0,9615 \pm 0,0008	0,9615 \pm 0,0004

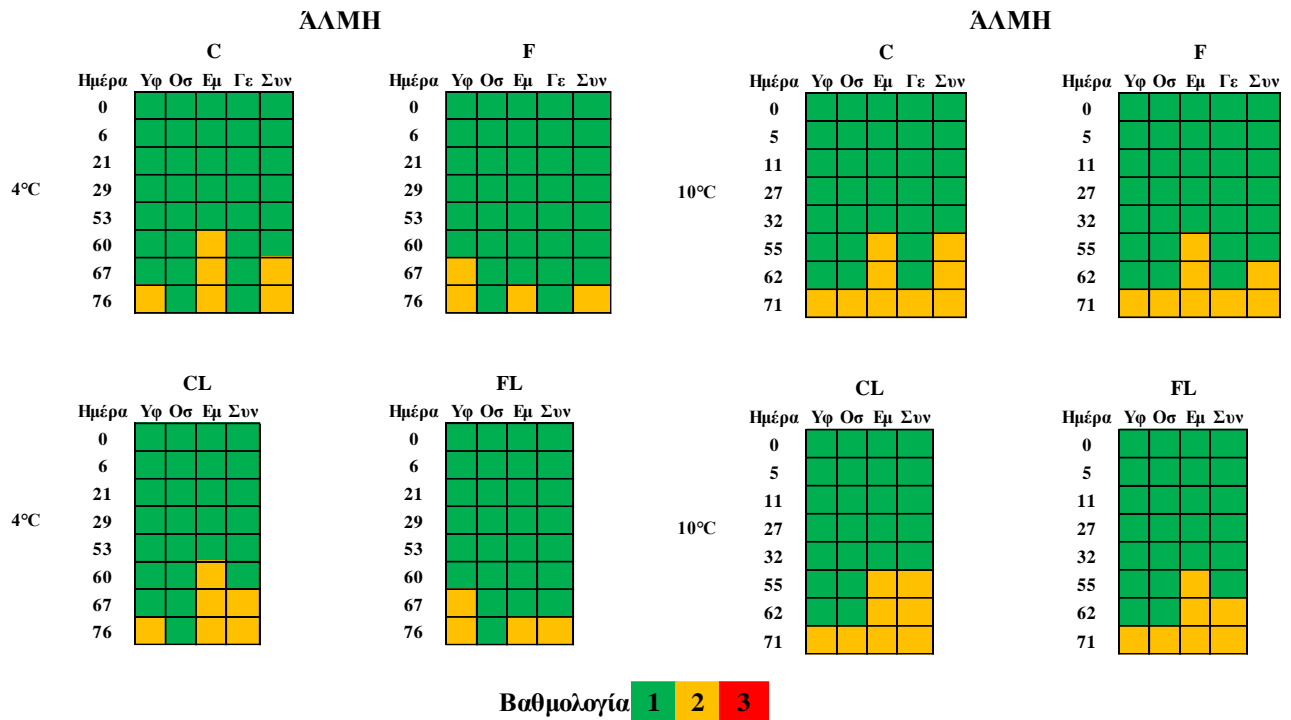
Να αναφερθεί πως έρευνες σχετικά με την επίδραση των LAB στην a_w των τυριών και ειδικότερα της φέτας δεν έχουν πραγματοποιηθεί κατά το παρελθόν. Η παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια εκτίμησης της πορείας της a_w της φέτας με την προσθήκη στελεχών LAB κατά την αποθήκευση του τυριού.

3.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 3.1-3.2) παρουσιάζεται η αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών για τις 4 συνθήκες συντήρησης. Στις εικόνες παρατίθεται χρωματικά η βαθμολογία (1 έως 3) των δειγμάτων φέτας που αξιολογήθηκαν ως προς την υφή, την οσμή, την εμφάνιση, τη γεύση (δείγματα χωρίς παθογόνο), ενώ βάσει αυτών συμπληρώθηκε και η συνολική βαθμολογία. Στις υπό μελέτη συνθήκες η οργανοληπτική αξιολόγηση έγινε είτε σε δείγματα φέτας που δεν περιείχαν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 (C), είτε σε δείγματα που περιλάμβαναν τα τεχνολογικά βακτήρια με κάποια μορφή (F ή EF), είτε σε δείγματα που δεν περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια, αλλά περιλάμβαναν το παθογόνο (CL), είτε σε δείγματα που περιείχαν τόσο τα τεχνολογικά βακτήρια όσο και το παθογόνο (FL ή EFL). Η αξιολόγηση έλαβε χώρα σε διάφορα χρονικά σημεία (δειγματοληψίες), οι οποίες διέφεραν για κάθε συνθήκη συντήρησης.

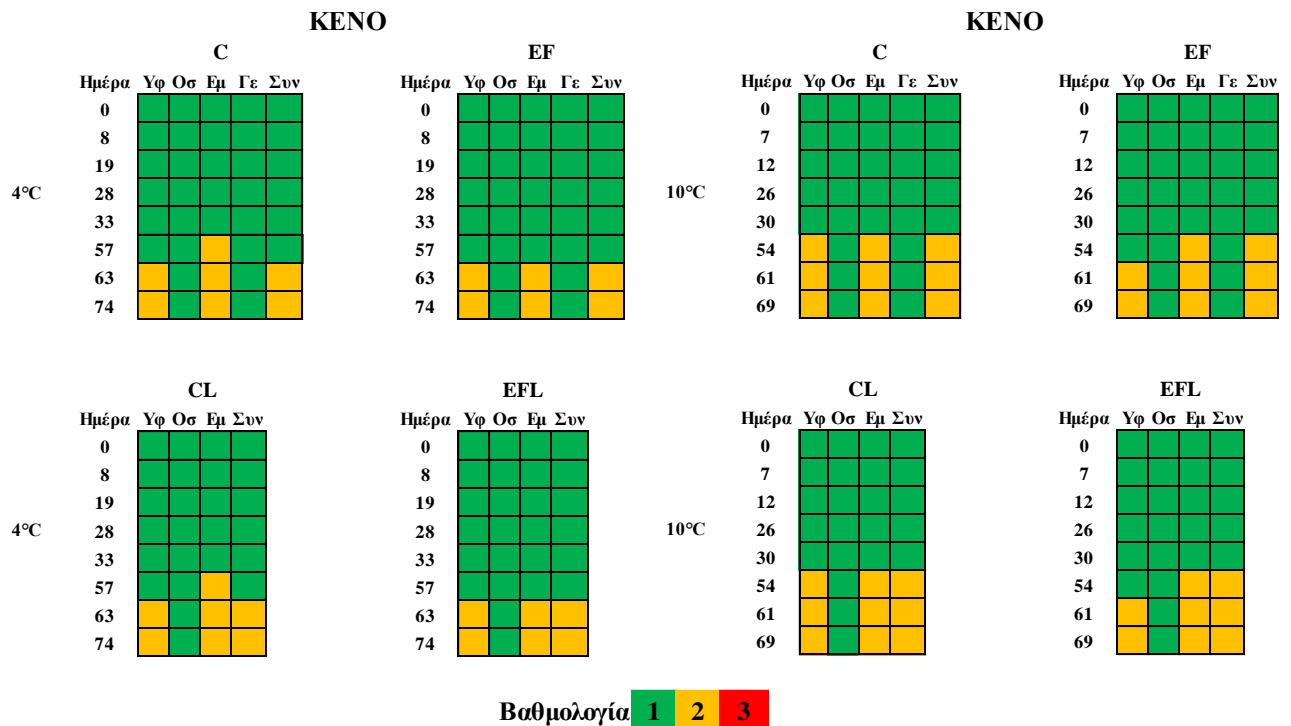
Στις Εικόνες 3.1-3.2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης για τις υπό εξέταση συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων φέτας. Σε καμία συνθήκη και για κανένα χρονικό σημείο δεν υπήρξε οργανοληπτική απόρριψη κάποιου δείγματος.

Στη συντήρηση εντός άλμης και στις δύο θερμοκρασίες τα F και FL δείγματα έλαβαν καλύτερες συνολικές βαθμολογίες για τα εξεταζόμενα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τα C και τα CL δείγματα. Συγκεκριμένα, στους 4°C τα C και CL δείγματα αξιολογήθηκαν με υψηλότερη συνολική βαθμολογία την Day 67, ενώ τα F και FL την Day 76. Στους 10°C τα C και CL δείγματα έλαβαν μεγαλύτερη συνολική βαθμολογία την Day 55, ενώ τα F και FL την Day 62. Στη συντήρηση υπό κενό αέρος δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στις συνολικές βαθμολογίες μεταξύ των C, CL, EF και EFL δειγμάτων τόσο στους 4°C όσο και τους 10°C. Ειδικότερα, στους 4°C τα C, CL, EF και EFL δείγματα αξιολογήθηκαν με υψηλότερη συνολική βαθμολογία την Day 63, ενώ στους 10°C την Day 54.



Υφ=Υφή, Οσ=Οσμή, Εμ=Εμφάνιση, Γε=Γεύση, Συν=Συνολικά

Εικόνα 3.1: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων φέτας των οποίων η συντήρηση έλαβε χώρα στους 4°C και 10°C εντός άλμης. Η “συνολική” τιμή αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή της υφής, της οσμής, της εμφάνισης και της γεύσης των δειγμάτων, η οποία έχει στρογγυλοποιηθεί στην πλησιέστερη τιμή. C: Control, F: Cells, CL: Control + *L. monocytogenes*, FL: Cells + *L. monocytogenes*.



Υφ=Υφή, Οσ=Οσμή, Εμ=Εμφάνιση, Γε=Γεύση, Συν=Συνολικά

Εικόνα 3.2: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων φέτας των οποίων η συντήρηση έλαβε χώρα στους 4°C και 10°C υπό κενό αέρος. Η “συνολική” τιμή αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή της υφής, της οσμής, της

εμφάνισης και της γεύσης των δειγμάτων, η οποία έχει στρογγυλοποιηθεί στην πλησιέστερη τιμή. C: Control, EF: Film, CL: Control + *L. monocytogenes*, EFL: Film + *L. monocytogenes*.

Τα προστιθέμενα αυτόχθονα στελέχη LAB έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνουν ενδοκυτταρικά ένζυμα κατά την ωρίμανση και αποθήκευση, τα οποία επηρεάζουν κατά βάση τις τεχνολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των τυριών (Escobar-Zepeda et al., 2016, Fox et al., 2017). Ένας σημαντικός αριθμός ερευνητών έχει αξιοποιήσει ως συμπληρωματικές καλλιέργειες αυτόχθονα στελέχη LAB για την παραγωγή φέτας και τυριών τύπου φέτα διαπιστώνοντας βελτίωση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Michaelidou et al., 2003, Manolaki et al., 2006, Dimitrellou et al., 2014, Mantzourani et al., 2018, Kamarinou et al., 2023). Παρόμοια βακτήρια με ιδιαίτερες τεχνολογικές και λειτουργικές επιδόσεις αποτελούν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 που στην τρέχουσα έρευνα δεν προστέθηκαν κατά την ζύμωση/ωρίμανση, όμως ψεκάστηκαν ή ενσωματώθηκαν στις εδώδιμες μεμβράνες που κάλυπταν το τελικό προϊόν.

Τα βιομηχανικά γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν αυτόχθονα στελέχη LAB που ενδέχεται να σχετίζονται τόσο με επιθυμητές τεχνολογικές λειτουργίες όσο και με ιδιότητες που αφορούν την υγεία (Kamarinou et al., 2022, Kamarinou et al., 2023). Στην τρέχουσα μελέτη τα στελέχη LAB που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προβιοτικό χαρακτήρα (Pavli et al., 2016, Stergiou et al., 2021, Tegoroulos et al., 2021), τα οποία αξιοποιήθηκαν ως συγκαλλιέργειες σε τρόφιμα που είχαν υποστεί ζύμωση (Pavli et al., 2017), ενώ αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα όχι μόνο στο τέλος της ζύμωσης, αλλά και στη λήξη του χρόνου ζωής των προϊόντων. Ωστόσο, το συγκεκριμένο αντικείμενο δεν ήταν σκοπός της παρούσας μελέτης, επομένως δεν διερευνήθηκε εκτενέστερα.

Ποικίλα στελέχη LAB έχουν χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στην παρασκευή διάφορων τυριών, ενώ η προσθήκη τους μπορεί να επηρεάσει τις οργανοληπτικές ιδιότητες τους (Kamarinou et al., 2023). Οι Ahmed et al. (2021) χρησιμοποίησαν τα *Lactobacillus casei* LBC, *Bifidobacterium bifidum* BB και *Lc. lactis subsp. lactis* LL ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στην παραγωγή τυριού τύπου φέτα με χαμηλά λιπαρά, συμπεραίνοντας ότι το τυρί με τα πρόσθετα στελέχη επέδειξε καλή εμφάνιση και χρώμα καθ' όλη την αποθήκευση. Οι Mantzourani et al. (2018) έδειξαν ότι η εισαγωγή του *L. paracasei* SP3 σε τυρί τύπου φέτα βελτίωσε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Στη μελέτη των Papadopoulou et al. (2018) αποδείχθηκε ότι η προσθήκη του *L. plantarum* T571 ως συμπληρωματική καλλιέργεια στην παραγωγή φέτας επηρέασε θετικά τη συνολική υφή του τυριού κατά τη συντήρηση στους 4°C. Ακόμη, η εισαγωγή αρκετών στελεχών *L. paracasei* ως συμπληρωματικές καλλιέργειες ενίσχυσαν τη γεύση και αύξησαν τη συνολική ποιότητα ενός ημίσκληρου ιταλικού τυριού βραχείας ωρίμανσης (Bancalari et al., 2020),

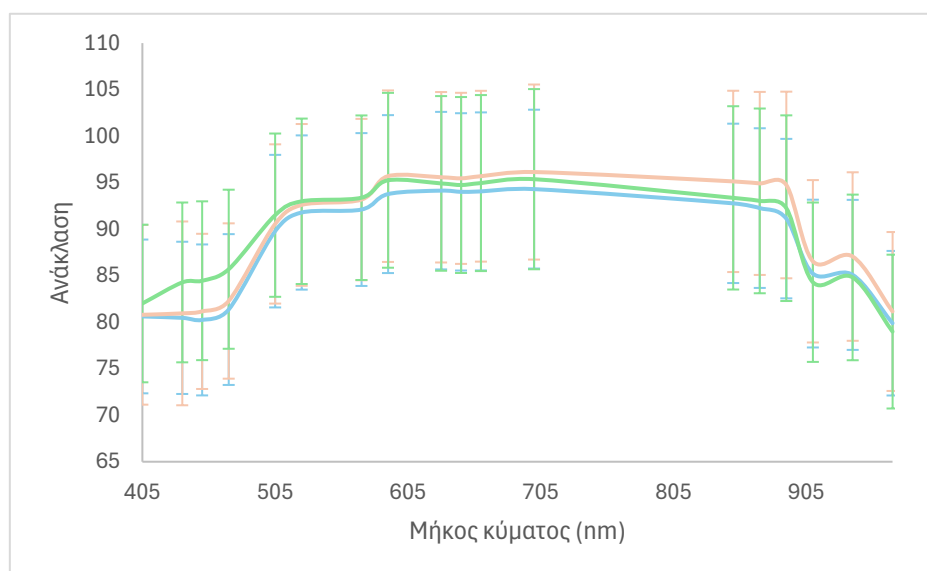
ενός τυριού τύπου φέτα (Bintsis & Robinson, 2004), καθώς και ενός λευκού τυριού άλμης (Terrou et al., 2018).

Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης της εργασίας αναφορικά με τα δείγματα που περιείχαν τα στελέχη LAB, και τα οποία συντηρήθηκαν εντός άλμης τόσο στους 4°C όσο και στους 10°C ταυτίστηκαν με τις ανωτέρω έρευνες, καθώς έλαβαν καλύτερες συνολικές βαθμολογίες συγκριτικά με τα control δείγματα. Εντούτοις, για τα αντίστοιχα δείγματα που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος και στις δύο θερμοκρασίες κάτι ανάλογο δεν επιβεβαιώθηκε από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, δεδομένου πως δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με παρουσία των στελεχών LAB και των control.

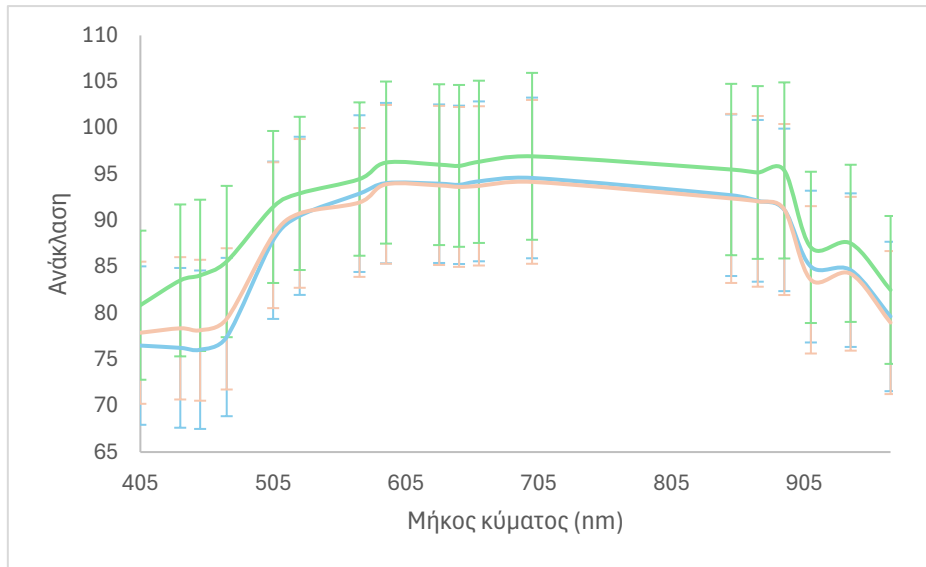
3.5 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων

3.5.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)

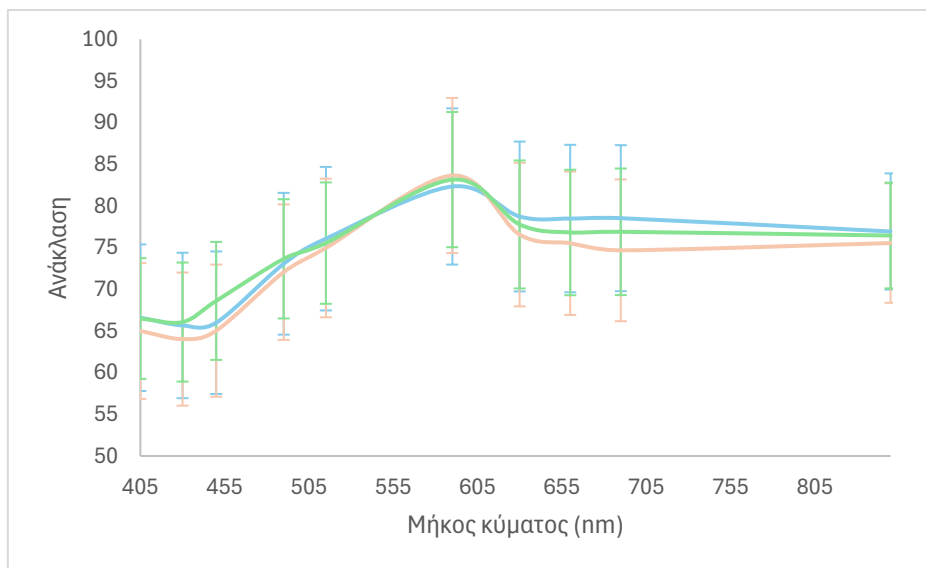
Στα σχήματα που ακολουθούν (Διαγράμματα 3.9-3.12) δίνονται τα φάσματα MSI των φρέσκων (0-1^η δειγματοληψία) και των αλλοιωμένων (7^η δειγματοληψία) δειγμάτων φέτας, όπως προκύπτουν για τα 18 μήκη κύματος (405-970 nm) του VideometerLab και τα 10 μήκη κύματος (405-850 nm) του VideometerLite για τη συντήρηση εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C. Επιπλέον, στα διαγράμματα παρατίθενται οι μέσοι όροι των ανακλάσεων των δειγμάτων για κάθε μήκος κύματος, καθώς και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις.



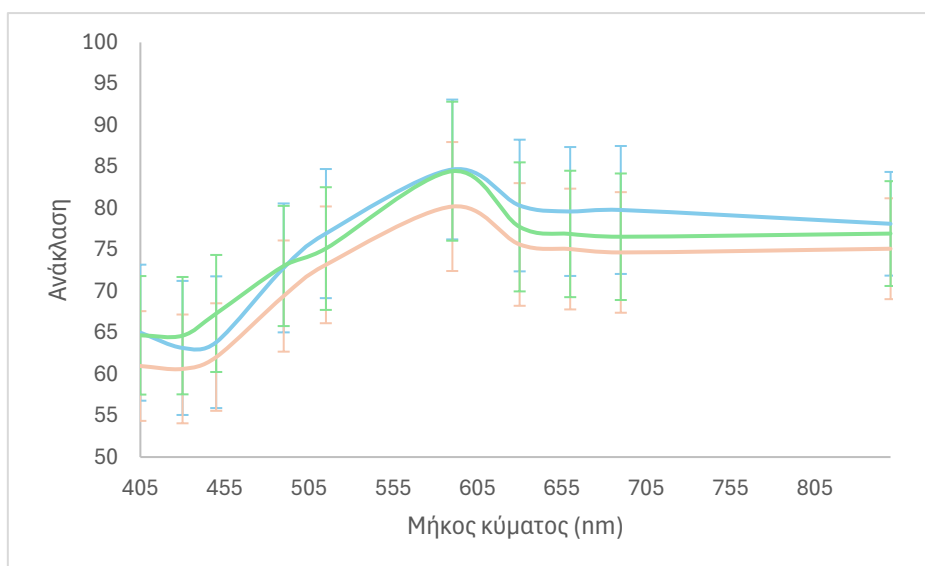
Διάγραμμα 3.9: Σύγκριση του φάσματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (Fresh 4°C/10°C) (●) με εκείνα των αλλοιωμένων (Spoiled 4°C) (●) και (Spoiled 10°C) (●), που προέρχονται από το VideometerLab, για τη συντήρηση στους 4°C και 10°C εντός άλμης.



Διάγραμμα 3.10: Σύγκριση του φάσματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (Fresh 4°C/10°C) (●) με εκείνα των αλλοιωμένων (Spoiled 4°C) (●) και (Spoiled 10°C) (●), που προέρχονται από το VideometerLab, για τη συντήρηση στους 4°C και 10°C υπό κενό αέρος.



Διάγραμμα 3.11: Σύγκριση του φάσματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (Fresh 4°C/10°C) (●) με εκείνα των αλλοιωμένων (Spoiled 4°C) (●) και (Spoiled 10°C) (●), που προέρχονται από το VideometerLite, για τη συντήρηση στους 4°C και 10°C εντός άλμης.



Διάγραμμα 3.12: Σύγκριση του φάσματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (Fresh 4°C/10°C) (●) με εκείνα των αλλοιωμένων (Spoiled 4°C) (●) και (Spoiled 10°C) (●), που προέρχονται από το VideometerLite, για τη συντήρηση στους 4°C και 10°C υπό κενό αέρος.

Μετά από οπτική παρατήρηση των ανωτέρω σχημάτων για το VideometerLab (Διαγρ. 3.9-3.10) εξάγεται το συμπέρασμα πως για την άλμη στα μήκη κύματος 405, 435, 450, 470, 505, 525 και 570 nm η ανάκλαση είναι μεγαλύτερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10°C σε σύγκριση με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 4°C, ενώ στα 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm η ανάκλαση είναι υψηλότερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4°C συγκριτικά με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 10°C. Για το κενό αέρος, η ανάκλαση σε όλα τα μήκη κύματος είναι μεγαλύτερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10°C σε σύγκριση με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 4°C.

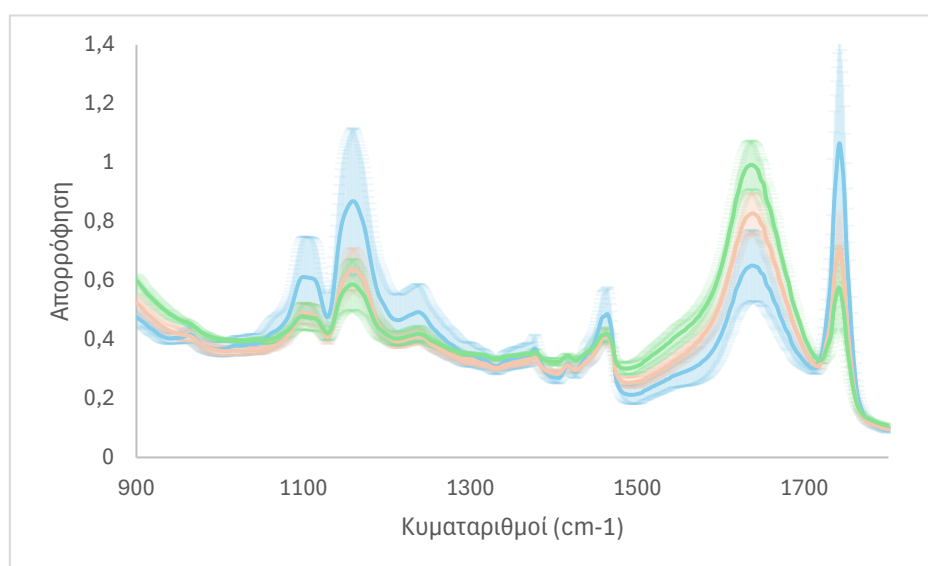
Αναφορικά με τα παραπάνω σχήματα για το VideometerLite (Διαγρ. 3.11-3.12) συμπεραίνεται πως για την άλμη στα 405 nm η ανάκλαση ταυτίζεται για τα φρέσκα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4°C και 10°C και τα αλλοιωμένα στους 10°C, ενώ είναι υψηλότερη από εκείνη των αλλοιωμένων στους 4°C. Στα 430, 450 και 490 nm η ανάκλαση είναι μεγαλύτερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10°C συγκριτικά με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 4°C. Στα 590 nm η ανάκλαση είναι υψηλότερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4°C σε σύγκριση με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 10°C. Τέλος, στα 515, 630, 660, 690 και 850 nm η ανάκλαση είναι μεγαλύτερη για τα φρέσκα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4°C και 10°C συγκριτικά με τα αλλοιωμένα (4°C και 10°C). Όσον αφορά το κενό αέρος, στα 405, 515, 590, 630, 660, 690 και 850 nm η ανάκλαση είναι υψηλότερη για τα φρέσκα δείγματα που

αποθηκεύτηκαν στους 4°C και 10°C σε σύγκριση με τα αλλοιωμένα (4°C και 10°C), ενώ στα 430, 450 και 490 nm η ανάκλαση είναι μεγαλύτερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10°C συγκριτικά με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 4°C.

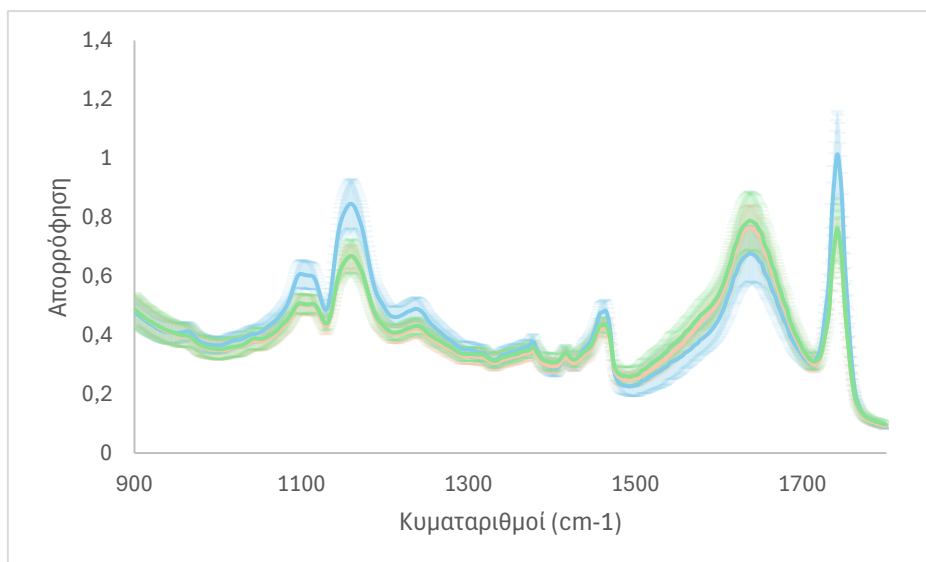
Η πολυφασματική απεικόνιση αξιοποιείται όλο και περισσότερο ως ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο για τον γρήγορο και μη καταστροφικό προσδιορισμό της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων του κρέατος (Ma et al., 2014, Tsakanikas et al., 2016, Feng et al., 2018), του ψαριού (Cheng et al., 2016, Fengou et al., 2019), και των φρούτων και λαχανικών (Løkke et al., 2013, Huang et al., 2015, Khodabakhshian et al., 2017). Εντούτοις, δεν υπάρχουν δημοσιευμένα επιστημονικά δεδομένα σχετικά με την εφαρμογή και αξιολόγηση της πολυφασματικής ανάλυσης εικόνων ως μέσου εκτίμησης της μικροβιολογικής ποιότητας των τυριών και ειδικότερα της φέτας.

3.5.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Στα παρακάτω σχήματα (Διαγράμματα 3.13-3.14) διακρίνονται τα φάσματα FTIR των φρέσκων (0-1^η δειγματοληψία) και των αλλοιωμένων (7^η δειγματοληψία) δειγμάτων φέτας στην περιοχή 1800-900 cm^{-1} για τη συντήρηση εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C. Ακόμη, στα διαγράμματα παρατίθενται οι μέσοι όροι των απορροφήσεων των δειγμάτων για κάθε κυματαριθμό, καθώς και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις.



Διάγραμμα 3.13: Σύγκριση του φάσματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (Fresh 4°C/10°C) (●) με εκείνα των αλλοιωμένων (Spoiled 4°C) (●) και (Spoiled 10°C) (●), που προέρχονται από το FTIR-6200 JASCO, για τη συντήρηση στους 4°C και 10°C εντός άλμης.



Διάγραμμα 3.14: Σύγκριση του φάσματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (Fresh 4°C/10°C) (●) με εκείνα των αλλοιωμένων (Spoiled 4°C) (●) και (Spoiled 10°C) (●), που προέρχονται από το FTIR-6200 JASCO, για τη συντήρηση στους 4°C και 10°C υπό κενό αέρος.

Στην παρούσα εργασία, από τα φασματοσκοπικά δεδομένα που ελήφθησαν, ερευνήθηκε η περιοχή μεταξύ 1800 και 900 cm^{-1} . Μετά από οπτική παρατήρηση των ανωτέρω σχημάτων (Διαγρ. 3.13-3.14) εξάγεται το συμπέρασμα πως οι σημαντικότερες κορυφές που δόθηκαν από τα φάσματα για την ανάπτυξη του κάθε μοντέλου εντοπίζονται στους κυματαριθμούς 965, 1105, 1170, 1245, 1385, 1425, 1465, 1650 και 1745 cm^{-1} , με υψηλότερη απορρόφηση στα 1170, 1650 και 1745 cm^{-1} . Εντούτοις, δύο μικρές κορυφές δεν υπάρχουν στα φάσματα των δειγμάτων φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης, αλλά αποκλειστικά σε εκείνα που αποθηκεύτηκαν υπό κενό αέρος και αφορούν τα 965 και 1425 cm^{-1} . Τόσο για την άλμη όσο και για το κενό αέρος η απορρόφηση στο μεγαλύτερο μέρος της περιοχής του φάσματος και ιδίως στις πιο σημαντικές κορυφές είναι μεγαλύτερη όσον αφορά τα φρέσκα δείγματα σε σύγκριση με τα αλλοιωμένα. Τα είδη της απορρόφησης που δημιουργούν τις κορυφές του φάσματος παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.5).

Αναφορικά με τη συντήρηση εντός άλμης, στις κορυφές που παρατηρούνται στα 1105, 1170, 1245, 1385, 1465 και 1745 cm^{-1} η απορρόφηση είναι υψηλότερη για τα φρέσκα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4°C και 10°C σε σχέση με τα αλλοιωμένα (4°C και 10°C). Στην κορυφή που εμφανίζεται στα 1650 cm^{-1} η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 10°C συγκριτικά με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 4°C. Όσον αφορά τη συντήρηση υπό κενό αέρος, στις κορυφές που παρατηρούνται στα 1105, 1170, 1245, 1385, 1465 και 1745 cm^{-1} η απορρόφηση είναι υψηλότερη για τα φρέσκα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4°C και 10°C σε σχέση με τα αλλοιωμένα (4°C και 10°C). Στις κορυφές που εμφανίζονται στα

965, 1425 και 1650 cm^{-1} η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη για τα αλλοιωμένα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 10°C συγκριτικά με τα φρέσκα (4°C και 10°C) και τα αλλοιωμένα στους 4°C.

Πίνακας 3.5: Παρατηρούμενες συχνότητες από την εφαρμογή της φασματοσκοπίας FTIR στα δείγματα φέτας και αντιστοιχία τους με το είδος της απορρόφησης. Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κυματαριθμοί που εμφανίστηκαν οι κορυφές των φασμάτων στα υπό μελέτη δείγματα (Papadopoulou et al., 2018).

Κυματαριθμοί (cm^{-1})	Είδος απορρόφησης	Πηγή
980-960 (965)	α, β ενώσεις πυρανόζης (ring vib, αρωματικά καρβοξυλικά οξέα	Socrates, 2001
1110-1070 (1105)	νουκλειικά οξέα και φωσφολιπίδια (PO_2 sym stretch)/C-O stretch	Böcker et al., 2007
1195-1130 (1170)	σχετικό με λίπος (C-O stretch), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O stretch), - NH_2 def	Chen et al., 1998, Böcker et al., 2007, Pappas et al., 2008
1260-1205 (1245)	λιπίδια, νουκλειικά οξέα (asym PO_2 - stretch), αμίδιο III (C-N stretch, N-H bend, C=O-N bend, P=O stretch), αμίνες από ελεύθερα αμινοξέα (C-N stretch)	Pistorius, 1995, Chen et al., 1998, Socrates, 2001, Ellis et al., 2002, Böcker et al., 2007, Pappas et al., 2008
1390-1370 (1385)	πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, λιπίδια, υδατάνθρακες (CH bend ή C-O stretch σε καρβοξύλια) ή ομάδες αζώτου (- NO_2 sym stretch)	Pistorius, 1995, Ellis et al., 2005, Pappas et al., 2008
1425-1400 (1425)	αμίδιο (C-N stretch) ή λιπίδια (RCOO^- sym str COO^- , - CH_2 - COOR def vib of CH_2)	Socrates, 2001, Ellis et al., 2004
1485-1425 (1465)	λιπίδια (CH_3 asym def, CH_3 asym bend, C-H def of CH_2 , CH_2 scissoring vib, C-H bend) ή αμίνες (asym CH_3 def vib), CH_2 bending	Chen et al., 1998, Socrates, 2001, Böcker et al., 2007
1715-1570 (1650)	νερό (H-O-H def vib) και αμίδιο I band (80% C=O stretch, 10% C-N stretch, 10% N-H bend)	Socrates, 2001, Wu et al., 2006
1770-1715 (1745)	C=O stretch εστέρων και οργανικών οξέων	Martin-del-Campo et al., 2007

Προηγούμενες μελέτες σε διάφορα τυριά αξιολόγησαν τη δυναμική της φασματοσκοπίας FTIR στην παρακολούθηση της ωρίμανσης (Lanciotti et al., 2005, Subramanian et al., 2011, Kraggerud et al., 2014), καθώς και την εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας των τυριών (Papadopoulou et al., 2018). Η επιστημονική βιβλιογραφία για την εκτίμηση της διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων με τη χρήση FTIR είναι περιορισμένη, καθώς η πλειονότητα των άρθρων ασχολείται με την εφαρμογή του FTIR για τον προσδιορισμό της χημικής σύνθεσης, της νοθείας και της αυθεντικότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων (De Marchi et al., 2018).

Κάποιες από τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν σε μελέτη των Papadopoulou et al. (2018) αναφέρθηκαν επίσης κατά τη ζύμωση ενός τυριού τύπου Camembert από τους Martin-del-Campo et al. (2007), υποδεικνύοντας ότι η ωρίμανση της φέτας πιθανότατα συνεχίζεται και μετά τη συσκευασία. Σύμφωνα με τους Papadopoulou et al. (2018), οι κορυφές που εμφανίστηκαν γύρω στα 1650 και 1550 cm^{-1} αυξήθηκαν κατά την αποθήκευση, εκτός από τα προβιοτικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4°C, ενώ οι κορυφές μεταξύ 1295 και 1000 cm^{-1} μειώθηκαν στα control δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 12°C, μια παρατήρηση παρόμοια με εκείνη κατά την ωρίμανση του τυριού τύπου Camembert (Martin-del-Campo et al., 2007).

Σύμφωνα με τους Papadopoulou et al. (2018), οι σημαντικότερες κορυφές για τη φέτα παρατηρούνται στα 1090 cm^{-1} και 1105 cm^{-1} [νουκλειϊκά οξέα και φωσφολιπίδια (PO_2 sym stretch)/C-O stretch 1740], τα 1170 cm^{-1} και 1175 cm^{-1} [σχετικό με λίπος (C-O stretch), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O stretch), $-\text{NH}_2$ def], τα 1240 cm^{-1} [λιπίδια, νουκλειϊκά οξέα (asym PO_2 - stretch), αμίδιο III (C-N stretch, N-H bend, C=O-N bend, P=O stretch), αμίνες από ελεύθερα αμινοξέα (C-N stretch)], τα 1333 cm^{-1} [CH_2 δονήσεις πλευρικής αλυσίδας, ελεύθερα αμινοξέα/ αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα μακράς αλυσίδας (CH stretch/ CH_2 def vib)], τα 1410 cm^{-1} [αμίδιο (C-N stretch) ή λιπίδια (RCOO- sym stretch COO-, $-\text{CH}_2\text{-COOR}$ def vib of CH_2)], τα 1460 cm^{-1} και 1466 cm^{-1} [λιπίδια (CH_3 asym def, CH_3 asym bend, C-H def of CH_2 , CH_2 scissoring vib, C-H bend) ή αμίνες (asym CH_3 def vib), CH_2 bending], τα 1550 cm^{-1} [ζώνη αμιδίου II (40% CN stretch, 60% NH bend vib)], τα 1650 cm^{-1} [νερό (H-O-H) και αμίδιο I (80% C=O, 10% C-N, 10% N-H)] και τα 1740 cm^{-1} (C=O εστέρες και οργανικά οξέα) (Pistorius, 1995, Chen et al., 1998, Socrates, 2001, Ellis et al., 2002, Ellis et al., 2004, Wu et al., 2006, Böcker et al., 2007, Martin-del-Campo et al., 2007, Pappas et al., 2008).

Η τρέχουσα εργασία επιβεβαιώνει μερικά εκ των αποτελεσμάτων της έρευνας των Papadopoulou et al. (2018), καθώς οι κορυφές στους κυματαριθμούς 1105, 1170 και 1650 cm^{-1} ταυτίζονται. Ακόμη, αρκετές από τις υπόλοιπες κορυφές της παρούσας εργασίας βρίσκονται σε πολύ κοντινό φάσμα με εκείνες της προηγούμενης έρευνας (Papadopoulou et al., 2018).

Σε παρόμοια έρευνα που έγινε σε γιαούρτι από τους Papadopoulou et al. (2021) παρατηρήθηκαν σημαντικές κορυφές στα 1030 cm⁻¹ [(πολυσακχαρίτες (C-O stretch), αμίνες (CN stretch)], τα 1065 cm⁻¹ [λιπίδια, πολυσακχαρίτες (C-O, C-O-P stretch)], τα 1111 cm⁻¹ [ριβόζες (C-O stretch), αμίνες NH₂ rock/twist)], τα 1157 cm⁻¹ [σχετικό με λίπος (C-O stretch), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O stretch), -NH₂ def] και τα 1640 cm⁻¹ [νερό (H-O-H) και αμίδιο I (80% C=O, 10% C-N, 10% N-H)] (Chen et al., 1998, Socrates, 2001, Wu et al., 2006, Böcker et al., 2007, Pappas et al., 2008).

Παλαιότερες μελέτες ανέφεραν ότι οι πολυσακχαρίτες είναι κυρίαρχοι στην περιοχή ανάμεσα στα 1200 και 900 cm⁻¹ (C-O stretch), και μεταξύ αυτών, η λακτόζη και η γλυκόζη εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές στα 1159 cm⁻¹ και 1035 cm⁻¹ αντίστοιχα (Moros et al., 2006, Păucean et al., 2014). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Păucean et al. (2014), η γλυκόζη βρέθηκε αποκλειστικά στο μη ζυμωμένο γάλα, ενώ τα φωσφορικά μειώθηκαν κατά τη ζύμωση λόγω της μικροβιακής δραστηριότητας. Επιπλέον, η συγκέντρωση εστέρων, γαλακτικού οξέος και λιπαρών οξέων παρουσίασε αύξηση μετά τη ζύμωση του γάλακτος, όπως απεικονίστηκε στα φάσματα FTIR της προαναφερθείσας μελέτης (Păucean et al., 2014).

3.5.3 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την πολυφασματική απεικόνιση (MSI)

Για την εκτίμηση του πληθυσμού της OMX κατά τη συντήρηση της φέτας δημιουργήθηκαν με τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης τέσσερα διαφορετικά μοντέλα. Ειδικότερα, για τα δείγματα των οποίων η συντήρηση έλαβε χώρα εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα με τα δεδομένα από το VideometerLab και δύο με εκείνα από το VideometerLite. Στους πίνακες που έπονται (Πίνακες 3.6-3.7) παρουσιάζονται οι δείκτες απόδοσης για την αξιολόγηση των μοντέλων αναφορικά με την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη τους. Τα δεδομένα που αξιοποιήθηκαν παρατίθενται στην Ενότητα 2.11.1.

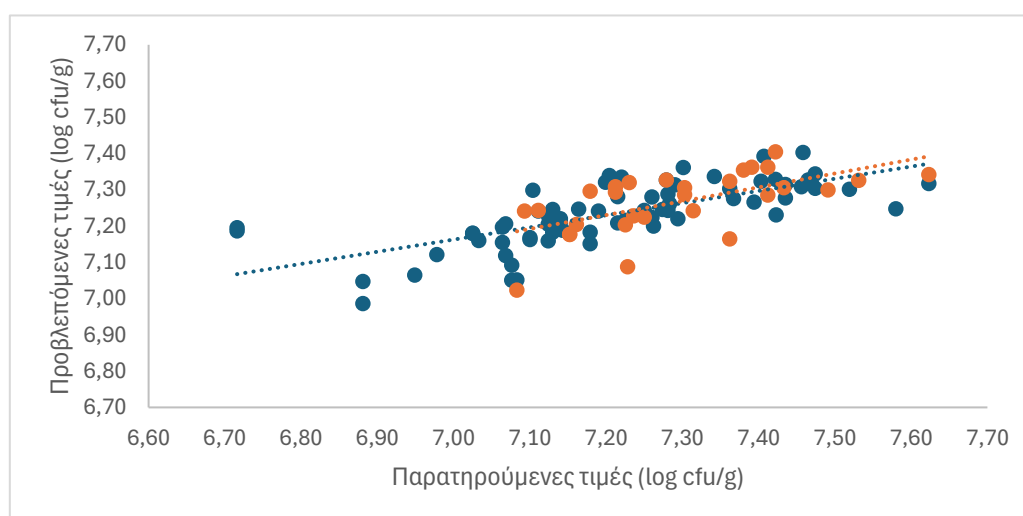
Πίνακας 3.6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του VideometerLab στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C.

Όργανο	Συνθήκες Συντήρησης	Δεδομένα	Slope	Offset	R ²	RMSE
VideometerLab	ΑΛΜΗ 4°C-10°C	Ανάπτυξη (n=132)	0,37	4,57	0,44	0,14
		Επικύρωση	0,38	4,48	0,37	0,12
		Πρόβλεψη (n=69)	0,34	4,81	0,32	0,11
	ΚΕΝΟ 4°C-10°C	Ανάπτυξη (n=128)	0,42	4,26	0,23	0,15
		Επικύρωση	0,28	5,30	0,42	0,14
		Πρόβλεψη (n=69)	0,26	5,42	0,33	0,17

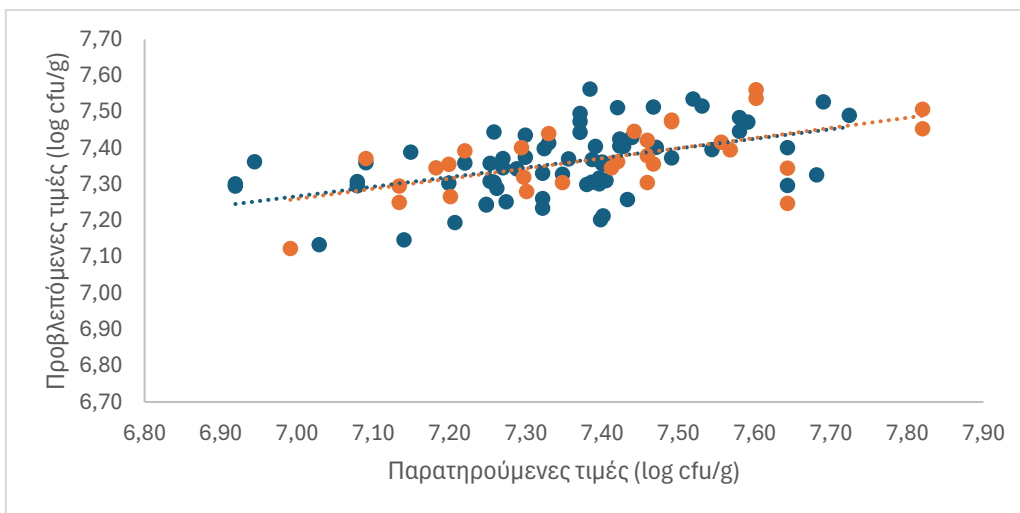
Πίνακας 3.7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του VideometerLite στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C.

Όργανο	Συνθήκες Συντήρησης	Δεδομένα	Slope	Offset	R ²	RMSE
VideometerLite	ΑΛΜΗ 4°C-10°C	Ανάπτυξη (n=93)	0,04	7,02	0,01	0,12
		Επικύρωση	-0,06	7,72	0,04	0,14
		Πρόβλεψη (n=47)	0,06	6,89	-0,20	0,15
	ΚΕΝΟ 4°C-10°C	Ανάπτυξη (n=122)	0,38	4,56	0,08	0,16
		Επικύρωση	0,49	3,78	0,38	0,13
		Πρόβλεψη (n=59)	0,28	5,29	0,33	0,13

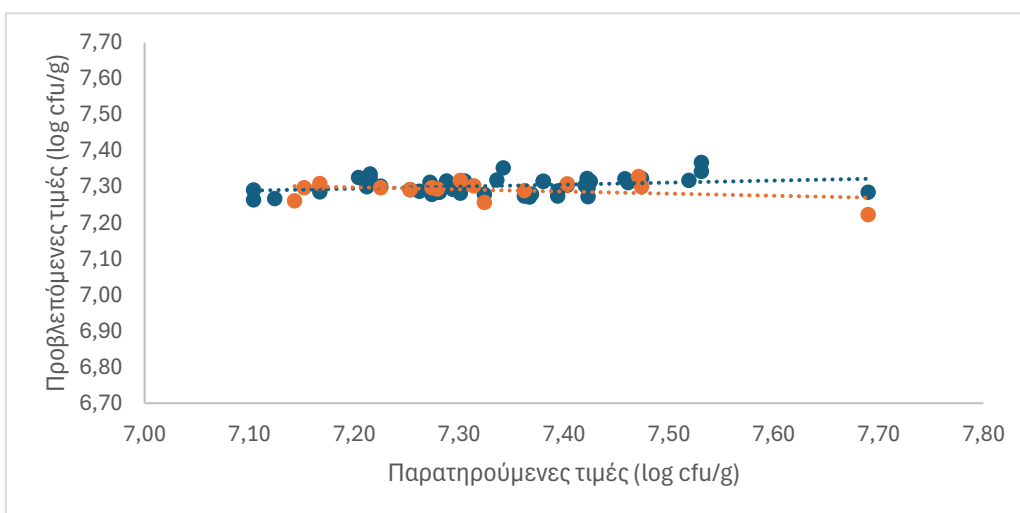
Για τα δεδομένα των δειγμάτων φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος (Πίν. 3.6) του VideometerLab φαίνεται να μην συσχετίζονται συγκριτικά τόσο καλά με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX. Αναλυτικότερα, όσον αφορά τα εντός άλμης δείγματα τα R² και RMSE για την πρόβλεψη είναι 0,32 και 0,11 αντίστοιχα, ενώ σχετικά με τα υπό κενό αέρος δείγματα τα R² και RMSE για την πρόβλεψη είναι 0,33 και 0,17 αντίστοιχως. Ακόμη, συγκρίνοντας τα δεδομένα από το VideometerLite για τα δείγματα που η συντήρησή τους πραγματοποιήθηκε εντός άλμης και υπό κενό αέρος (Πίν. 3.7) παρατηρείται πως δεν συσχετίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX. Συγκεκριμένα, αναφορικά με τα εντός άλμης δείγματα τα R² και RMSE για την πρόβλεψη είναι -0,20 και 0,15 αντίστοιχα, ενώ σε σχέση με τα υπό κενό αέρος δείγματα τα R² και RMSE για την πρόβλεψη είναι 0,33 και 0,13 αντίστοιχως. Στα ακόλουθα διαγράμματα συσχέτισης των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών (Διαγράμματα 3.15-3.18) εμφανίζονται τα ανωτέρω αποτελέσματα σε σχέση με την ευθεία $y = ax + \beta$, όπου a = κλίση και β = σταθερός όρος.



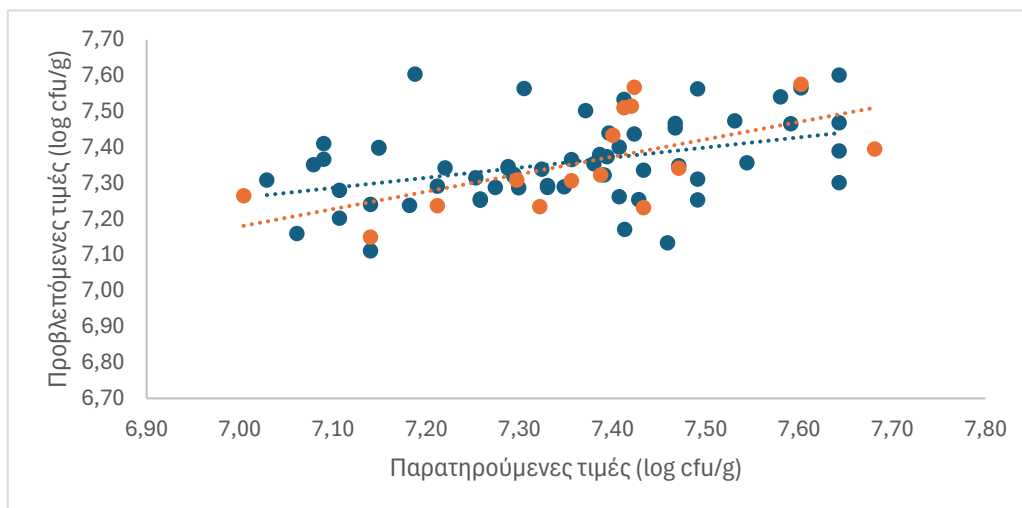
Διάγραμμα 3.15: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το VideometerLab για τα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C.



Διάγραμμα 3.16: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το VideometerLab για τα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C.



Διάγραμμα 3.17: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το VideometerLite για τα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C.



Διάγραμμα 3.18: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το VideometerLite για τα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C.

Συνολικά, φαίνεται πως για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C τα μοντέλα που προέκυψαν από τα δεδομένα του VideometerLab (0,11) έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα (με βάση τις τιμές RMSE) από εκείνα για τα δείγματα που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος στις ίδιες θερμοκρασίες (0,17). Επιπλέον, για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C τα μοντέλα που προέκυψαν από τα δεδομένα του VideometerLite (0,15) έδωσαν λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα από εκείνα για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν υπό κενό αέρος στις ίδιες θερμοκρασίες (0,13). Επιστημονική βιβλιογραφία για την εκτίμηση της διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων με τη χρήση της μεθόδου PLS-R σε δεδομένα MSI δεν υπάρχει. Ωστόσο, σε έρευνα των Panagou et al. (2014) σε δείγματα φιλέτων μοσχαριού, που η μέθοδος PLS-R εφαρμόστηκε σε δεδομένα MSI για την εκτίμηση της OMX, η τιμή RMSE για την πρόβλεψη ήταν 1,29. Επιπλέον, σε μελέτη των Spyrelli et al. (2021) σε δείγματα φιλέτων στήθους κοτόπουλου, η τιμή RMSE για την πρόβλεψη ήταν 1,36. Τέλος, σύμφωνα με τους Fengou et al. (2019) σε δείγματα δέρματος τσιπούρας, η τιμή RMSE για την πρόβλεψη ήταν 0,71. Συνεπώς, υφίστανται σημαντικά στοιχεία πως οι συγκεκριμένες μέθοδοι εμφανίζουν μεγάλες δυνατότητες για την ταχεία εκτίμηση της μικροβιακής χλωρίδας, αποτέλεσμα που δεν επιβεβαιώθηκε από την παρούσα εργασία.

3.5.4 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)

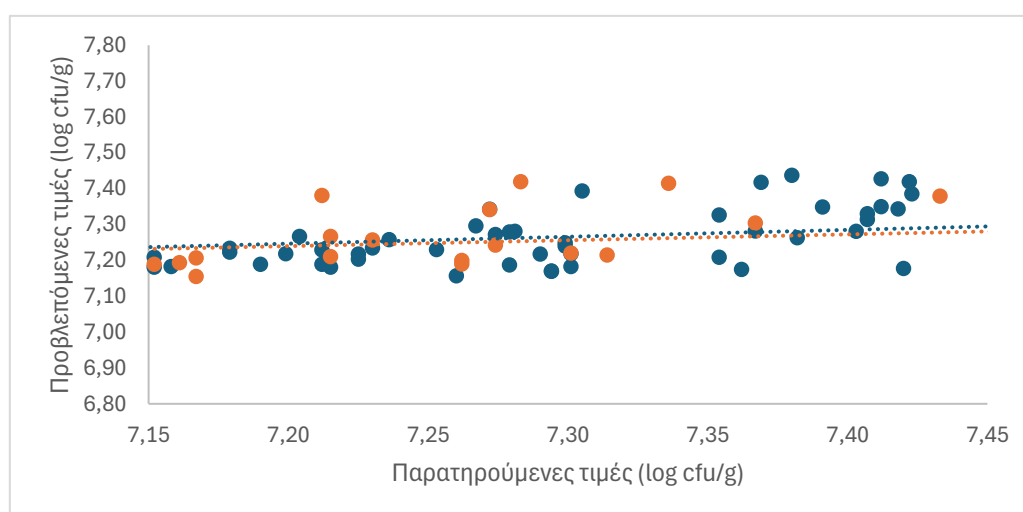
Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός της OMX κατά τη συντήρηση της φέτας αναπτύχθηκαν με τα δεδομένα της φασματοσκοπίας FTIR δύο διαφορετικά μοντέλα. Για τα δείγματα τα οποία

συντηρήθηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C δημιουργήθηκαν δύο μοντέλα με τα δεδομένα από το FTIR-6200 JASCO. Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.8) αναφέρονται οι δείκτες απόδοσης για την αξιολόγηση των μοντέλων σε σχέση με την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη τους. Η παράθεση των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν γίνεται στην Ενότητα 2.11.1.

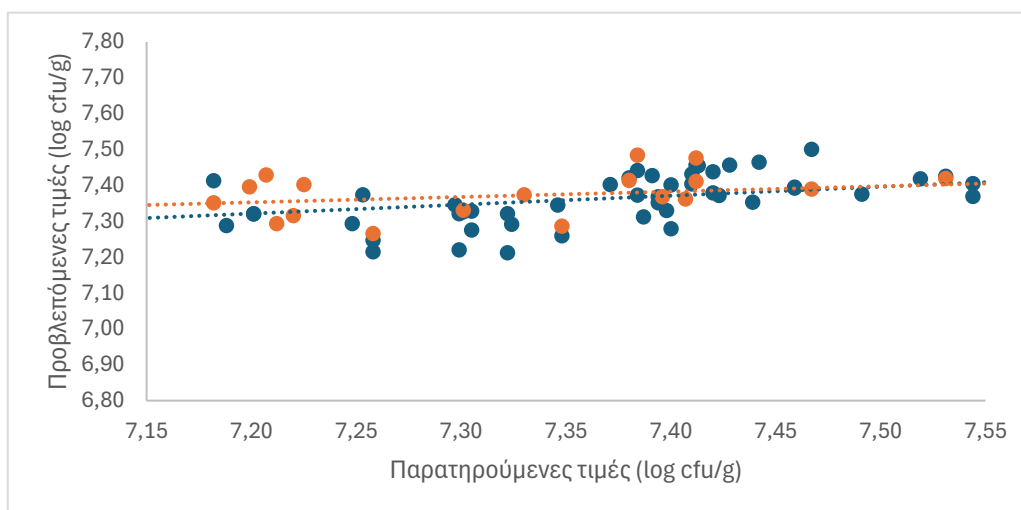
Πίνακας 3.8: Συγκενρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του FTIR-6200 JASCO στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C.

Όργανο	Συνθήκες Συντήρησης	Δεδομένα	Slope	Offset	R ²	RMSE
FTIR-6200 JASCO	ΑΛΜΗ 4°C-10°C	Ανάπτυξη (n=131)	0,22	5,70	0,16	0,14
		Επικύρωση	0,16	6,06	0,22	0,15
		Πρόβλεψη (n=70)	0,19	5,86	0,07	0,14
	ΚΕΝΟ 4°C-10°C	Ανάπτυξη (n=129)	0,31	5,11	0,35	0,16
		Επικύρωση	0,15	6,27	0,31	0,13
		Πρόβλεψη (n=69)	0,25	5,52	0,21	0,19

Αναφορικά με τα δεδομένα των δειγμάτων φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος (Πίν. 3.8) του FTIR-6200 JASCO παρατηρείται να μην συσχετίζονται σε ικανοποιητικό επίπεδο με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX. Ειδικότερα, όσον αφορά τα εντός άλμης δείγματα τα R² και RMSE για την πρόβλεψη είναι 0,07 και 0,14 αντίστοιχα. Παράλληλα, σχετικά με τα υπό κενό αέρος δείγματα τα R² και RMSE για την πρόβλεψη είναι 0,21 και 0,19 αντιστοίχως. Στα παρακάτω διαγράμματα συσχέτισης των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών (Διαγράμματα 3.19-3.20) παρουσιάζονται τα ανωτέρω αποτελέσματα σε σχέση με την ευθεία $y = ax + \beta$, όπου $a =$ κλίση και $\beta =$ σταθερός όρος.



Διάγραμμα 3.19: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το FTIR-6200 JASCO για τα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C.



Διάγραμμα 3.20: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το FTIR-6200 JASCO για τα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C.

Γενικά, παρατηρείται πως για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C τα μοντέλα που προέκυψαν από τα δεδομένα του FTIR-6200 JASCO (0,14) έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα (με βάση τις τιμές RMSE) από εκείνα για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν υπό κενό αέρος στις ίδιες θερμοκρασίες (0,19). Η επιστημονική βιβλιογραφία για την εκτίμηση της διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων με τη χρήση της μεθόδου PLS-R σε δεδομένα FTIR είναι αρκετά περιορισμένη. Σε αντίστοιχες έρευνες που η μέθοδος PLS-R εφαρμόστηκε σε δεδομένα FTIR για την εκτίμηση της OMX, όπως στην έρευνα των Papadopoulou et al. (2018) σε δείγματα φέτας, η τιμή RMSE για την πρόβλεψη βρέθηκε να είναι 0,39. Επιπλέον, στη μελέτη των Papadopoulou et al. (2021) σε δείγματα γιαουρτιού, η τιμή RMSE για την πρόβλεψη ήταν 0,16. Επομένως, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι συγκεκριμένες μέθοδοι παρουσιάζουν μεγάλες προοπτικές για την ταχεία εκτίμηση της μικροβιακής χλωρίδας, αποτέλεσμα που δεν επιβεβαιώθηκε από την τρέχουσα εργασία.

3.5.5 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για την πολυφασματική απεικόνιση (MSI)

Στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 3.9-3.12) παρατίθενται αριθμητικά (% ευαισθησία, % ακρίβεια, % συνολική ακρίβεια) τα αποτελέσματα. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για τα confusion matrices των PLS-DA μοντέλων προήλθαν από τα δεδομένα των οργάνων VideometerLab και VideometerLite για δείγματα που αποθηκεύτηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C, με το 70% του συνόλου των δεδομένων να αξιοποιείται για την ανάπτυξη και επικύρωση, ενώ το υπόλοιπο 30% για την πρόβλεψη. Όσον αφορά τα δεδομένα από το VideometerLab για τα δείγματα που συντηρήθηκαν εντός άλμης, το μοντέλο ταξινόμησης τους, τα αποτελέσματα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9, έχει μικρή ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την

κατηγοριοποίηση των κλάσεων της φέτας σε σχέση με την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα, εμφανίζει ευαισθησία 66,22% (απουσία *L. monocytogenes*) και 42,11% (παρουσία *L. monocytogenes*) κατά την ανάπτυξη, 50,00% (απουσία) και 38,88% (παρουσία) κατά την επικύρωση, καθώς και 66,66% (απουσία) και 30,00% (παρουσία) κατά την πρόβλεψη. Η συνολική ακρίβεια είναι 55,73% για την ανάπτυξη, 43,33% για την επικύρωση και 45,71% για την πρόβλεψη. Επομένως, το μοντέλο που κατασκευάστηκε δεν μπορούσε σε μεγάλο βαθμό να διαχωρίσει και στη συνέχεια να ταξινομήσει σωστά τα δείγματα σχετικά με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Αναφορικά με τα δεδομένα για τα δείγματα που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος, το μοντέλο ταξινόμησής τους, τα αποτελέσματα του οποίου παρατίθενται στον Πίνακα 3.10, χαρακτηρίζεται, εκτός μίας εξαίρεσης, από μικρή ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την ταξινόμηση των κλάσεων της φέτας αναφορικά με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Ειδικότερα, παρουσιάζει ευαισθησία 67,16% (απουσία) και 68,85% (παρουσία) κατά την ανάπτυξη, 85,71% (απουσία) και 56,25% (παρουσία) κατά την επικύρωση, καθώς και 63,64% (απουσία) και 50,00% (παρουσία) κατά την πρόβλεψη. Η συνολική ακρίβεια είναι 67,97% για την ανάπτυξη, 70,00% για την επικύρωση και 56,52% για την πρόβλεψη. Κατά συνέπεια, το μοντέλο που αναπτύχθηκε δεν είχε τη δυνατότητα σε ικανοποιητικό βαθμό να διαχωρίσει και ακολούθως να κατηγοριοποιήσει σωστά τα δείγματα σε σχέση με την παρουσία του *L. monocytogenes*.

Σχετικά με τα δεδομένα από το VideometerLite για τα δείγματα που συντηρήθηκαν εντός άλμης, το μοντέλο ταξινόμησής τους, τα αποτελέσματα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.11, έχει μικρή ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των κλάσεων της φέτας αναφορικά με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Πιο αναλυτικά, εμφανίζει ευαισθησία 70,83% (απουσία) και 55,56% (παρουσία) κατά την ανάπτυξη, 71,43% (απουσία) και 37,50% (παρουσία) κατά την επικύρωση, καθώς και 79,17% (απουσία) και 52,17% (παρουσία) κατά την πρόβλεψη. Η συνολική ακρίβεια είναι 63,44% για την ανάπτυξη, 53,33% για την επικύρωση και 65,96% για την πρόβλεψη. Άρα, το μοντέλο που κατασκευάστηκε δεν μπορούσε σε μεγάλο βαθμό να διαχωρίσει και εν συνεχεία να ταξινομήσει σωστά τα δείγματα σε σχέση με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Σε σχέση με τα δεδομένα για τα δείγματα που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος, το μοντέλο ταξινόμησής τους, τα αποτελέσματα του οποίου παρατίθενται στον Πίνακα 3.12, χαρακτηρίζεται, με μερικές εξαιρέσεις, από μικρή ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την ταξινόμηση των κλάσεων της φέτας σύμφωνα με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Αναλυτικότερα, παρουσιάζει ευαισθησία 87,50% (απουσία) και 68,00% (παρουσία) κατά την ανάπτυξη, 100,00% (απουσία) και 70,00% (παρουσία) κατά την επικύρωση, καθώς και 76,19% (απουσία) και 57,89% (παρουσία) κατά την πρόβλεψη. Η συνολική ακρίβεια είναι 79,51% για την ανάπτυξη, 80,00% για την επικύρωση και 64,41% για την πρόβλεψη.

Συνεπώς, το μοντέλο που αναπτύχθηκε δεν είχε τη δυνατότητα σε ικανοποιητικό βαθμό να διαχωρίσει και ακολούθως να κατηγοριοποιήσει σωστά τα δείγματα σχετικά με την παρουσία του *L. monocytogenes*.

Πίνακας 3.9: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C για τις δύο κλάσεις με τα δεδομένα από το VideometerLab.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)	
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	49	25	74	66,22
		Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	33	24	57	42,11
		Συνολικά δείγματα ανά στήλη	82	49		
		Ακρίβεια (%)	59,76	48,98		
		Συνολική Ακρίβεια (%)				
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	6	6	12	50,00
		Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	11	7	18	38,88
		Συνολικά δείγματα ανά στήλη	17	13		
		Ακρίβεια (%)	35,29	53,85		
Συνολική Ακρίβεια (%)					43,33	
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	20	10	30	66,66
		Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	28	12	40	30,00
		Συνολικά δείγματα ανά στήλη	48	22		
		Ακρίβεια (%)	41,66	54,55		
Συνολική Ακρίβεια (%)					45,71	

Πίνακας 3.10: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C για τις δύο κλάσεις με τα δεδομένα από το VideometerLab.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	45	22	67
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	19	42	61	68,85	
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		64	64		
Ακρίβεια (%)		70,31	65,63		
Συνολική Ακρίβεια (%)					67,97
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	12	2	14
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	7	9	16	56,25	
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		19	11		
Ακρίβεια (%)		63,16	81,82		
Συνολική Ακρίβεια (%)					70,00
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	21	12	33
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	18	18	36	50,00	
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		39	30		
Ακρίβεια (%)		53,85	60,00		
Συνολική Ακρίβεια (%)					56,52

Πίνακας 3.11: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C για τις δύο κλάσεις με τα δεδομένα από το VideometerLite.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	34	14	48
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	20	25	45	55,56	
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		54	39		
Ακρίβεια (%)		62,96	64,10		
Συνολική Ακρίβεια (%)					63,44
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	5	2	7
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	5	3	8	37,50	
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		10	5		
Ακρίβεια (%)		50,00	60,00		
Συνολική Ακρίβεια (%)					53,33
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	19	5	24
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	11	12	23	52,17	
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		30	17		
Ακρίβεια (%)		63,33	70,59		
Συνολική Ακρίβεια (%)					65,96

Πίνακας 3.12: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C για τις δύο κλάσεις με τα δεδομένα από το VideometerLite.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ				
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	63	9	72	87,50
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	16	34	50	68,00		
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		79	43			
Ακρίβεια (%)		79,75	79,07			
Συνολική Ακρίβεια (%)					79,51	
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ				
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	5	0	5	100,00
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	3	7	10	70,00		
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		8	7			
Ακρίβεια (%)		62,50	100,00			
Συνολική Ακρίβεια (%)					80,00	
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ				
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	16	5	21	76,19
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	16	22	38	57,89		
Συνολικά δείγματα ανά στήλη		32	27			
Ακρίβεια (%)		50,00	81,48			
Συνολική Ακρίβεια (%)					64,41	

Παρόμοιες μελέτες που αξιοποιούν τη μέθοδο PLS-DA χρησιμοποιώντας δεδομένα από πολυφασματική απεικόνιση για διαχωρισμό δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων με βάση την απουσία ή παρουσία παθογόνων δεν έχουν υλοποιηθεί. Εντούτοις, οι Ropodi et al. (2015)

εφαρμόζοντας τη μέθοδο PLS-DA σε δεδομένα MSI ανέπτυξαν μοντέλο για τον διαχωρισμό νοθευμένων/άνοθευτων μοσχαρίσιων και χοιρινών δειγμάτων και πέτυχαν 98,48% σωστή κατηγοριοποίηση. Επιπλέον, οι Ropodí et al. (2018) για διαχωρισμό αποψυγμένων/φρέσκων δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά πέτυχαν 100% σωστή κατηγοριοποίηση. Οι προηγούμενες μελέτες επαληθεύουν ότι η προγνωστική ικανότητα των αναπτυγμένων μοντέλων ταξινόμησης είναι πολύ μεγάλη. Επομένως, ο συνδυασμός της πολυφασματικής απεικόνισης με χημειομετρικές τεχνικές, όπως η PLS-DA, παρουσιάζει πολλές προοπτικές στον διαχωρισμό και την ταξινόμηση των δειγμάτων τροφίμων, αποτέλεσμα που δεν επιβεβαιώθηκε στην τρέχουσα εργασία.

3.5.6 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για τη φασματοσκοπία υπεράυρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR)

Στους ακόλουθους πίνακες (Πίνακες 3.13-3.14) παρατίθενται αριθμητικά (% ευαισθησία, % ακρίβεια, % συνολική ακρίβεια) τα αποτελέσματα. Τα δεδομένα που αξιοποιήθηκαν για τα confusion matrices των PLS-DA μοντέλων προήλθαν από τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οργάνου FTIR-6200 JASCO για δείγματα που βρίσκονταν εντός άλμης και υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C, με το 70% του συνόλου των δεδομένων να αξιοποιείται για την ανάπτυξη και επικύρωση, ενώ το υπόλοιπο 30% για την πρόβλεψη. Όσον αφορά τα δεδομένα για τα δείγματα που συντηρήθηκαν εντός άλμης, το μοντέλο ταξινόμησης τους, τα αποτελέσματα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.13, έχει, εκτός μιας εξαίρεσης, μικρή ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των κλάσεων της φέτας σχετικά με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα, εμφανίζει ευαισθησία 77,14% (απουσία) και 39,34% (παρουσία) κατά την ανάπτυξη, 68,75% (απουσία) και 28,57% (παρουσία) κατά την επικύρωση, καθώς και 86,21% (απουσία) και 36,59% (παρουσία) κατά την πρόβλεψη. Η συνολική ακρίβεια είναι 59,54% για την ανάπτυξη, 50,00% για την επικύρωση και 57,14% για την πρόβλεψη. Επομένως, το μοντέλο που κατασκευάστηκε δεν μπορούσε σε μεγάλο βαθμό να διαχωρίσει και στη συνέχεια να ταξινομήσει σωστά τα δείγματα σχετικά με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Αναφορικά με τα δεδομένα για τα δείγματα που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος, το μοντέλο ταξινόμησης τους, τα αποτελέσματα του οποίου παρατίθενται στον Πίνακα 3.14, χαρακτηρίζεται, με μερικές εξαιρέσεις, από μικρή ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την ταξινόμηση των κλάσεων της φέτας σε σχέση με την παρουσία του *L. monocytogenes*. Ειδικότερα, παρουσιάζει ευαισθησία 96,61% (απουσία) και 94,29% (παρουσία) κατά την ανάπτυξη, 58,82% (απουσία) και 53,85% (παρουσία) κατά την επικύρωση, καθώς και 78,95% (απουσία) και 80,65% (παρουσία) κατά την πρόβλεψη. Η συνολική ακρίβεια είναι 95,35% για την ανάπτυξη, 56,66% για την επικύρωση και 79,71% για την πρόβλεψη. Κατά συνέπεια, το μοντέλο που αναπτύχθηκε δεν είχε τη δυνατότητα σε ικανοποιητικό βαθμό να διαχωρίσει και έπειτα να κατηγοριοποιήσει σωστά τα δείγματα αναφορικά με την παρουσία του *L. monocytogenes*.

Πίνακας 3.13: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C για τις δύο κλάσεις με τα δεδομένα από το FTIR-6200 JASCO.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	54		
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>		37	24	61	39,34
	Συνολικά δείγματα ανά στήλη	91	40		
	Ακρίβεια (%)	59,34	60,00		
Συνολική Ακρίβεια (%)					59,54
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	11		
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>		10	4	14	28,57
	Συνολικά δείγματα ανά στήλη	21	9		
	Ακρίβεια (%)	52,38	44,44		
Συνολική Ακρίβεια (%)					50,00
		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	25		
Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>		26	15	41	36,59
	Συνολικά δείγματα ανά στήλη	51	19		
	Ακρίβεια (%)	49,02	78,95		
Συνολική Ακρίβεια (%)					57,14

Πίνακας 3.14: Συγκενρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος στους 4°C και 10°C για τις δύο κλάσεις με τα δεδομένα από το FTIR-6200 JASCO.

ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)	
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	57	2	59	69,61
		Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	4	66	70	94,29
		Συνολικά δείγματα ανά στήλη	61	68		
		Ακρίβεια (%)	93,44	97,06		
Συνολική Ακρίβεια (%)					95,35	
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)	
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	10	7	17	58,82
		Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	6	7	13	53,85
		Συνολικά δείγματα ανά στήλη	16	14		
		Ακρίβεια (%)	62,50	50,00		
Συνολική Ακρίβεια (%)					56,66	
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Συνολικά δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία (%)	
		Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>			
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ	Απουσία <i>L. monocytogenes</i>	30	8	38	78,95
		Παρουσία <i>L. monocytogenes</i>	6	25	31	80,65
		Συνολικά δείγματα ανά στήλη	36	33		
		Ακρίβεια (%)	83,33	75,76		
Συνολική Ακρίβεια (%)					79,71	

Αντίστοιχες έρευνες που χρησιμοποιούν τη μέθοδο PLS-DA λαμβάνοντας δεδομένα από φασματοσκοπία FTIR για διαχωρισμό δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων ανάλογα την παρουσία ή απουσία παθογόνων δεν έχουν πραγματοποιηθεί. Ωστόσο, οι Bassbasi et al. (2014) με την εφαρμογή της μεθόδου PLS-DA σε δεδομένα FTIR ανέπτυξαν μοντέλο για τον διαχωρισμό δειγμάτων βουτύρου με βάση γεωγραφικές περιοχές και πέτυχαν 100% σωστή κατηγοριοποίηση. Οι Du et al. (2019) για διαχωρισμό νοπών/ανασυσταμένων δειγμάτων γάλακτος πέτυχαν 98% σωστή κατηγοριοποίηση. Τέλος, οι Sen et al. (2021) δημιούργησαν μοντέλο για διαχωρισμό μιγμάτων κατσικίσιου-αγελαδινού και βουβαλίσιου-αγελαδινού γάλακτος και πέτυχαν 93% και 91% σωστή κατηγοριοποίηση αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των ανωτέρω μελετών επιβεβαιώνουν ότι η προγνωστική ικανότητα των αναπτυγμένων μοντέλων ταξινόμησης είναι πολύ καλή. Ως εκ τούτου, ο συνδυασμός της φασματοσκοπίας FTIR με χημειομετρικές τεχνικές, όπως η PLS-DA, εμφανίζει μεγάλες δυνατότητες στον διαχωρισμό και την ταξινόμηση των δειγμάτων τροφίμων, αποτέλεσμα που δεν επιβεβαιώθηκε στην τρέχουσα εργασία.

4. Συμπεράσματα

Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν πως η πορεία του πληθυσμού των LAB κατά τη αποθήκευση του τυριού ήταν παρόμοια και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης. Ο πληθυσμός των μεσόφιλων LAB εμφανίστηκε σταθερός, ενώ εκείνος των γαλακτικών στρεπτόκοκκων μειώθηκε ελαφρώς σε κάθε περίπτωση. Επιπροσθέτως, τα LAB και οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι χαρακτηρίζονται ως η κυρίαρχη μικροχλωρίδα, όπως συμπεραίνεται από τον υψηλό πληθυσμό της φέτας κατά την αποθήκευση. Το πληθυσμιακό επίπεδο των ζυμών/μυκήτων αυξήθηκε προσεγγιστικά κατά 2 log στο σύνολο των περιπτώσεων, με την αύξηση να είναι μεγαλύτερη στους 10°C σε σχέση με τους 4°C, όπως και στα control δείγματα συγκριτικά με τα δείγματα που περιείχαν τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως η αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης αυξάνει τον πληθυσμό των ζυμών/μυκήτων, ενώ η παρουσία των στελεχών LAB περιορίζει την ανάπτυξη τους. Στα δείγματα φέτας που περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια και εμβολιάστηκαν με τα δύο στελέχη *L. monocytogenes* υπήρξε μια ελαφριά αναστολή του παθογόνου σε σύγκριση με τα control, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο μια πιθανή περιοριστική δράση των στελεχών LAB έναντι του *L. monocytogenes*.

Όσον αφορά το pH των δειγμάτων, φαίνεται να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη συντήρηση εντός άλμης και υπό κενό αέρος στις δύο θερμοκρασίες, καθώς συγκρίνοντας τις τιμές δεν υφίστανται σημαντικές διαφορές για την αρχή και το τέλος της αποθήκευσης. Επιπροσθέτως, η εισαγωγή των στελεχών LAB στα δείγματα επέφερε μεγαλύτερη μείωση του pH σε σύγκριση με τα control, ενισχύοντας το συμπέρασμα πως τα LAB είτε ως συμπληρωματικές καλλιέργειες είτε ως απλή προσθήκη μειώνουν το pH κατά την αποθήκευση της φέτας.

Παρομοίως με το pH, η μεταβολή της a_w των δειγμάτων δεν καθίσταται σημαντική με την αποθήκευση εντός άλμης και υπό κενό αέρος στις δύο θερμοκρασίες, αφού αντιπαραβάλλοντας τις τιμές δεν υπάρχουν ιδιαίτερες μεταβολές για την εκκίνηση και ολοκλήρωση της συντήρησης. Επομένως, οι μελετώμενες συνθήκες συντήρησης, όπως και τα τεχνολογικά βακτήρια, παρατηρείται να μην επιδρούν ουσιωδώς στην a_w της φέτας.

Η παρουσία των στελεχών LAB στα δείγματα που συντηρήθηκαν εντός άλμης στους 4°C και 10°C λειτούργησε θετικά ως προς την οργανοληπτική αξιολόγηση, καθώς οι συνολικές βαθμολογίες ήταν καλύτερες σε σχέση με τα control. Βέβαια, για τα δείγματα που συντηρήθηκαν υπό κενό αέρος και στις δύο θερμοκρασίες δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές ανάμεσα σε εκείνα με προσθήκη των στελεχών LAB και των control. Κατά την τέλεση του πειράματος δεν υπήρξε οργανοληπτική απόρριψη κάποιου δείγματος, αποδεικνύοντας πως οι ανωτέρω συνθήκες συντήρησης,

αλλά και τα *L. pentosus* L33 και *L. plantarum* L125 διατηρούν σε ικανοποιητικό επίπεδο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας, γεγονός με πολλαπλά οφέλη για το προϊόν.

Τα μοντέλα εκτίμησης της OMX στη φέτα που αποθηκεύτηκαν εντός άλμης και υπό κενό αέρος σύμφωνα με τα δεδομένα της MSI που χρησιμοποιήθηκαν από τη μέθοδο PLS-R δεν μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικά. Ειδικότερα, όσον αφορά το VideometerLab, οι δείκτες απόδοσης για την πρόβλεψη μετρήθηκαν $R^2 = 0,32$, $RMSE = 0,11$ για τα εντός άλμης και $R^2 = 0,33$, $RMSE = 0,17$ για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Σχετικά με το VideometerLite, οι δείκτες για την πρόβλεψη υπολογίστηκαν $R^2 = -0,20$, $RMSE = 0,15$ για τα εντός άλμης και $R^2 = 0,33$, $RMSE = 0,13$ για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της FTIR δεν έδωσαν ικανοποιητικούς συντελεστές απόδοσης για τα μοντέλα εκτίμησης του πληθυσμού της OMX στη φέτα. Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με το FTIR-6200 JASCO, οι δείκτες απόδοσης για την πρόβλεψη μετρήθηκαν $R^2 = 0,07$, $RMSE = 0,14$ για τα εντός άλμης και $R^2 = 0,21$, $RMSE = 0,19$ για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Οι συνολικά μη ικανοποιητικοί συντελεστές απόδοσης πιθανώς οφείλονται στον τρόπο που τοποθετούνταν τα δείγματα στα όργανα ή στην ανόμοια σύσταση και υγρασία των δειγμάτων. Άρα, συμπεραίνεται πως οι συγκεκριμένες μέθοδοι δεν παρουσιάζουν υψηλές προοπτικές σχετικά με την ταχεία εκτίμηση της μικροβιακής χλωρίδας και δεν μπορούν να εφαρμοστούν επιτυχώς στη φέτα.

Οι σπουδαιότερες κορυφές που προέκυψαν από τα φάσματα για την ανάπτυξη του κάθε μοντέλου παρατηρούνται στους κυματαριθμούς 965, 1105, 1170, 1245, 1385, 1425, 1465, 1650 και 1745 cm^{-1} . Υψηλότερη απορρόφηση συναντάται στα 1170 cm^{-1} που σχετίζεται με το λίπος, τους εστέρες και τους υδατάνθρακες, τα 1650 cm^{-1} που αποδίδεται στην παρουσία νερού και αντιστοιχεί στο αμίδιο I και τα 1745 cm^{-1} που ερμηνεύεται λόγω των εστέρων και των οργανικών οξέων. Οι μικρές κορυφές στα 965 και 1425 cm^{-1} δεν εμφανίζονται στα φάσματα των δειγμάτων φέτας που συντηρήθηκαν εντός άλμης, αλλά μόνο σε εκείνα που αποθηκεύτηκαν υπό κενό αέρος. Η συγκεκριμένη διαφορά πιθανόν οφείλεται στον τρόπο συντήρησης (άλμη – κενό αέρος).

Ο διαχωρισμός και η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων φέτας σε δύο κλάσεις ανάλογα την παρουσία του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* δεν παρουσίασαν ικανοποιητικά αποτελέσματα με βάση τα δεδομένα της MSI που αξιοποιήθηκαν από τη μέθοδο PLS-DA. Όσον αφορά το VideometerLab, το μοντέλο ταξινόμησης επέδειξε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 45,71% για τα εντός άλμης και 56,52% για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Για το VideometerLite, το μοντέλο ταξινόμησης εμφάνισε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 65,96% για τα εντός άλμης και 64,41% για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Παρομοίως, ο διαχωρισμός και η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων φέτας

δεν εμφάνισαν ικανοποιητικά αποτελέσματα με βάση τα δεδομένα του FTIR-6200 JASCO. Το μοντέλο ταξινόμησης επέδειξε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 57,14% για τα εντός άλμης και 79,71% για τα υπό κενό αέρος δείγματα. Η προγνωστική ικανότητα των αναπτυγμένων μοντέλων ταξινόμησης αξιολογείται ως μικρή. Κατά συνέπεια, ο συνδυασμός της MSI και της FTIR με τη PLS-DA εμφανίζει χαμηλές δυνατότητες ως προς τον διαχωρισμό και την ταξινόμηση των δειγμάτων φέτας σύμφωνα με την παρουσία του *L. monocytogenes*.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης καταδεικνύουν πως η MSI και η FTIR σε συνδυασμό με τη PLS-R δεν δύνανται να εντοπίσουν τις βιοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη συντήρηση της φέτας και ως εκ τούτου δεν αποτελούν αποτελεσματικές μεθόδους που μπορούν εν δυνάμει να ανιχνεύσουν την αλλοίωση του προϊόντος. Επίσης, συνδυαστικά με τη PLS-DA δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστες μέθοδοι για την ανίχνευση ενδεχόμενης παρουσίας ενός παθογόνου στο τρόφιμο, όπως για παράδειγμα ύπαρξη του *L. monocytogenes* στη φέτα. Εντούτοις, να τονιστεί πως για τη βελτίωση των συγκεκριμένων μαθηματικών μοντέλων απαιτούνται περισσότερες μελέτες και συλλογή δεδομένων από δείγματα σε ποικίλες συνθήκες συντήρησης, χρήση διάφορων στελεχών LAB και εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης και αλγορίθμων, ούτως ώστε οι βιοχημικές μεταβολές ή/και η εμφάνιση παθογόνων στη φέτα (και άλλα τυροκομικά προϊόντα) να γίνονται ταχύτερα και ευκολότερα αντιληπτές και να αντιμετωπίζονται έγκαιρα.

5. Βιβλιογραφία

- Abd El-Salam, M., & Alichanidis, E. (2004). Cheese varieties ripened in brine. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2, 227–249. [https://doi.org/10.1016/s1874-558x\(04\)80046-0](https://doi.org/10.1016/s1874-558x(04)80046-0)
- Abd El-Salam, M., Alichanidis, E., & Zerfiridis, G. K. (1993). Domiati and Feta Type Cheeses. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 301–335. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2648-3_11
- Abdel-Fatah, A. A., Gouda, A., El-Zayat, A. I., Mehanna, N. S., & Yassien, M. M. (1998). Microbiological quality of raw materials in relation to quality of Feta cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 26(2), 309–318.
- Abdi, H. (2003). Partial least squares (PLS) regression. In: Lews-Beck M, Bryman A, Futing T (eds). *Encyclopedia of Social Sciences Research Methods*, 792–795.
- Abriouel, H., Pérez Montoro, B., Casimiro-Soriguer, C. S., Pérez Pulido, A. J., Knapp, C. W., Caballero Gómez, N., Castillo-Gutiérrez, S., Estudillo-Martínez, M. D., Gálvez, A., & Benomar, N. (2017). Insight into Potential Probiotic Markers Predicted in *Lactobacillus pentosus* MP-10 Genome Sequence. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00891>
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2018). Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 33–47. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. *Microorganisms*, 8(6), 952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
- Ahmed, M. E., Rathnakumar, K., Awasti, N., Elfaruk, M. S., & Hammam, A. R. A. (2021). Influence of probiotic adjunct cultures on the characteristics of low-fat Feta cheese. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1512–1520. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2121>
- Ajesh Kumar, V., Pravitha, M., Srivastav, P. P., Mangaraj, S., Pandiselvam, R., & Hasan, M. (2021). Development of soy-based nanocomposite film: Modeling for barrier and mechanical properties and its application as cheese slice separator. *Journal of Texture Studies*, 53(6), 809–819. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12636>
- Akman, P. K., Bozkurt, F., Dogan, K., Tornuk, F., & Tamturk, F. (2020). Fabrication and characterization of probiotic *Lactobacillus plantarum* loaded sodium alginate edible films. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 84–92. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00619-6>
- Alexopoulos, V., Kyratsis, P., & Efkolidis, N. (2011). Feta Cheese Packaging Designs Using Advanced CAD/CAM Systems. *The Cyprus Journal of Sciences*, 9, 49–57.
- Alichanidis, E. (2007). Cheeses ripened in brine. *Elsevier EBooks*, 330–342. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.330>
- Alichanidis, E., Anifantakis, E. M., Polychroniadou, A., & Nanou, M. (1984). Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*, 51(1), 141–147. <https://doi.org/10.1017/s0022029900023402>

- Alichanidis, E., & Polychroniadou, A. (2008). Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology*, 88(4-5), 495–510. <https://doi.org/10.1051/dst:2008023>
- Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., Hogg, T., & Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.006>
- Ammor, M. S., Argyri, A., & Nychas, G.-J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81(3), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.10.015>
- Anelli, P., Haidukowski, M., Epifani, F., Cimmarusti, M. T., Moretti, A., Logrieco, A., & Susca, A. (2019). Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology*, 78, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.014>
- Angelidis, A. S., Smith, L. T., & Smith, G. M. (2002). Elevated carnitine accumulation by *Listeria monocytogenes* impaired in glycine betaine transport is insufficient to restore wild-type cryotolerance in milk whey. *International Journal of Food Microbiology*, 75(1-2), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00005-3)
- Angiolillo, L., Conte, A., Zambrini, A. V., & Del Nobile, M. A. (2014). Biopreservation of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5345–5355. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8022>
- Anifantakis, E. M. (1991). *Traditional Feta cheese*. In: *Feta and Related Cheeses* (R. K. Robinson & A. Y. Tamime, Eds.; 1st ed., pp. 49–69). Ellis Horwood Limited.
- Anifantakis, E. M., & Moatsou, G. (2006). *Feta and Other Balkan Cheeses*. In: *Brined Cheeses* (A. Y. Tamime, Ed.; 1st ed., pp. 43–76). Blackwell Science Limited. <https://doi.org/10.1002/9780470995860>
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2014). Monitoring Microbial Spoilage of Foods by Vibrational Spectroscopy (FT-IR & Raman). In *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16758>
- Argyri, A. A., Doulgeraki, A. I., Blana, V. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2011). Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.010>
- Argyri, A. A., Jarvis, R. M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E. Z., Goodacre, R., & Nychas, G.-J. E. (2013). A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, 29(2), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.040>
- Argyri, A. A., Lyra, E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* during storage of fermented green table olives in brine. *Food Microbiology*, 36(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.001>

- Asare, P. T., Greppi, A., Stettler, M., Schwab, C., Stevens, M. J. A., & Lacroix, C. (2018). Decontamination of Minimally-Processed Fresh Lettuce Using Reuterin Produced by *Lactobacillus reuteri*. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01421>
- Atanassova, M. R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I. C., Garabal, J. I., & Centeno, J. A. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiology*, *53*, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.012>
- Ayyash, M. M., & Shah, N. P. (2011). Effect of Partial Substitution of NaCl with KCl on Proteolysis of Halloumi Cheese. *Journal of Food Science*, *76*(1), C31–C37. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01901.x>
- Bagci, U., Ozmen Togay, S., Temiz, A., & Ay, M. (2019). Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiologica*, *64*(6), 735–750. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00687-2>
- Ballabio, D., & Todeschini, R. (2009). Multivariate Classification for Qualitative Analysis. *Elsevier EBooks*, 83–104. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374136-3.00004-3>
- Bancalari, E., Montanari, C., Levante, A., Alinovi, M., Neviani, E., Gardini, F., & Gatti, M. (2020). *Lactobacillus paracasei* 4341 as adjunct culture to enhance flavor in short ripened Caciotta-type cheese. *Food Research International*, *135*, 109284. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109284>
- Bassbasi, M., De Luca, M., Ioele, G., Oussama, A., & Ragno, G. (2014). Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data. *Journal of Food Composition and Analysis*, *33*(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.010>
- Benech, R.-O., Kheadr, E. E., Laridi, R., Lacroix, C., & Fliss, I. (2002). Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar Cheese by Addition of Nisin Z in Liposomes or by In Situ Production in Mixed Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(8), 3683–3690. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3683-3690.2002>
- Benoit, P. W., & Donahue, D. W. (2003). Methods for Rapid Separation and Concentration of Bacteria in Food that Bypass Time-Consuming Cultural Enrichment. *Journal of Food Protection*, *66*(10), 1935–1948. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.10.1935>
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, *11*(4), 259–274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- Berti, S., Ollé Resa, C. P., Basanta, F., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2019). Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. *Food Bioscience*, *31*, 100447. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100447>
- Bintsis, T. (2006). *Quality of the Brine* (pp. 264–301). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995860.ch9>
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., Davies, R., & Robinson, R. K. (2000). Microbiology of brines used to mature feta cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *53*(3), 106–112. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2000.tb02671.x>

- Bintsis, T., & Papademas, P. (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 113–120. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00054.x>
- Bintsis, T., & Robinson, R. K. (2004). A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 88(3), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.057>
- Böcker, U., Ofstad, R., Wu, Z., Bertram, H. C., Sockalingum, G. D., Manfait, M., Egelandsdal, B., & Köhler, A. (2007). Revealing Covariance Structures in Fourier Transform Infrared and Raman Microspectroscopy Spectra: A Study on Pork Muscle Fiber Tissue Subjected to Different Processing Parameters. *Applied Spectroscopy*, 61(10), 1032–1039. <https://doi.org/10.1366/000370207782217707>
- Böhme, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Fernández No, I. C., Barros-Velázquez, J., Castiglioni, B., Brasca, M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *ELECTROPHORESIS*, 33(15), 2355–2364. <https://doi.org/10.1002/elps.201100480>
- Boraston, Alisdair B., Bolam, David N., Gilbert, Harry J., & Davies, Gideon J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382(Pt 3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Bozoudi, D., Kotzamanidis, C., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N., Menexes, G., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2015). A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.008>
- Bozoudi, D., Torriani, S., Zdragas, A., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2016). Assessment of microbial diversity of the dominant microbiota in fresh and mature PDO Feta cheese made at three mountainous areas of Greece. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.039>
- Brereton, R. G. (2006). Consequences of sample size, variable selection, and model validation and optimisation, for predicting classification ability from analytical data. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(11), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.10.005>
- Brereton, R. G., & Lloyd, G. R. (2014). Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, 28(4), 213–225. <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- Buchanan, R. L., Lindqvist, R., Ross, T., Smith, M., Todd, E., & Whiting, R. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods - Technical Report. In *figshare.utas.edu.au*. University of Tasmania. <https://hdl.handle.net/102.100.100/538967>
- Burns, P., Cuffia, F., Milesi, M. M., Vinderola, G., Meinardi, C. A., Sabbag, N., & Hynes, E. R. (2012). Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiology*, 30(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.015>

- Cadavez, V. A. P., Campagnollo, F. B., Silva, R. A., Duffner, C. M., Schaffner, D. W., Sant'Ana, A. S., & Gonzales-Barron, U. (2019). A comparison of dynamic tertiary and competition models for describing the fate of *Listeria monocytogenes* in Minas fresh cheese during refrigerated storage. *Food Microbiology*, *79*, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.004>
- Cai, L., Wang, H., Liang, L., Wang, G., Xu, X., & Wang, H. (2018). Response of Formed-Biofilm of *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Citrobacter freundii* to Chlorite-Based Disinfectants. *Journal of Food Science*, *83*(5), 1326–1332. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14149>
- Campagnollo, F. B., Gonzales-Barron, U., Pilão Cadavez, V. A., Sant'Ana, A. S., & Schaffner, D. W. (2018). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. *Food Control*, *92*, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.019>
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>
- Cardoso, V. M., Borelli, B. M., Lara, C. A., Soares, M. A., Pataro, C., Bodevan, E. C., & Rosa, C. A. (2015). The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International*, *69*, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
- Carstensen, J. M., Panagou, S., & Nychas, G. (2009). *Quantitative analysis of meat spoilage using VIS/NIR spectral imaging*. Abstract from 14th International Conference on Near Infrared Spectroscopy (NIR 2009), Bangkok, Thailand.
- Cenci-Goga, B., Cruciani, D., Crotti, S., Karama, M., Yıldırım, G., Bulut, M., Marino, C., & Grisoldi, L. (2021). Diversity of yeasts and moulds in dairy products from Umbria, central Italy. *Journal of Dairy Research*, *88*(2), 217–220. <https://doi.org/10.1017/S002202992100042X>
- Chen, C.-C., Lai, C.-C., Huang, H.-L., Huang, W.-Y., Toh, H.-S., Weng, T.-C., Chuang, Y.-C., Lu, Y.-C., & Tang, H.-J. (2019). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00789>
- Chen, M., Irudayaraj, J., & McMahon, D. J. (1998). Examination of Full Fat and Reduced Fat Cheddar Cheese During Ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, *81*(11), 2791–2797. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75837-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75837-0)
- Cheng, J.-H., Sun, D.-W., Qu, J.-H., Pu, H., Zhang, X., Song, Z., Chen, X., & Zou, H. (2016). Developing a multispectral imaging for simultaneous prediction of freshness indicators during chemical spoilage of grass carp fish fillet. *Journal of Food Engineering*, *182*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.004>
- Christensen, I. B., Vedel, C., Clausen, M.-L., Kjærulff, S., Agner, T., & Nielsen, D. S. (2021). Targeted Screening of Lactic Acid Bacteria With Antibacterial Activity Toward *Staphylococcus aureus* Clonal Complex Type 1 Associated With Atopic Dermatitis. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.733847>

- Codex Alimentarius. (1998). *National Printing Office* (pp. 615–618). Athens, Greece.
- Corbaci, C., Ucar, F. B., & Yalcin, H. T. (2012). Isolation and characterization of yeasts associated with Turkish-style homemade dairy products and their potential as starter cultures. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(3), 534–542. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.895>
- Costa, M. J., Maciel, L. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*, *107*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>
- Costa, M. J., Marques, A. M., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Sillankorva, S. M., & Cerqueira, M. A. (2018). Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. *Food Hydrocolloids*, *81*, 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.014>
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. de S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, *64*, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>
- 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*(5), 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.09.007>
- De Filippis, F., Parente, E., & Ercolini, D. (2017). Metagenomics insights into food fermentations. *Microbial Biotechnology*, *10*(1), 91–102. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12421>
- De Marchi, M., Penasa, M., Zidi, A., & Manuelian, C. L. (2018). Invited review: Use of infrared technologies for the assessment of dairy products—Applications and perspectives. *Journal of Dairy Science*, *101*(12), 10589–10604. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15202>
- Dimitrellou, D., Kandyli, P., Sidira, M., Koutinas, A. A., & Kourkoutas, Y. (2014). Free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393 on whey protein as starter cultures for probiotic Feta-type cheese production. *Journal of Dairy Science*, *97*(8), 4675–4685. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7597>
- Dissing, B. S., Papadopoulou, O. S., Tassou, C., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. (2013). Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(9), 2268–2279. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0886-6>
- Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. A., Nychas, G.-J. E., Tassou, C. C., & Panagou, E. Z. (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 353–356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.003>
- Du, L., Lu, W., Gao, B., Wang, J., & Yu, L. (Lucy). (2019). Authenticating Raw from Reconstituted Milk Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Food Quality*, *2019*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/5487890>
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M., & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(Supp_1), S27–S48. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux030>

- Duffy, G., Whiting, R. C., & Sheridan, J. J. (1999). The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, *16*(3), 299–307. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0242>
- Dufour, É. (2009). Principles of Infrared Spectroscopy. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, 1–27. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374136-3.00001-8>
- Ebbing, D. D., & Gammon, S. D. (2011). *Γενική Χημεία* (6th ed.). Τραύλος.
- El-Sayed, H. S., El-Sayed, S. M., Mabrouk, A. M. M., Nawwar, G. A., & Youssef, A. M. (2021). Development of Eco-friendly Probiotic Edible Coatings Based on Chitosan, Alginate and Carboxymethyl Cellulose for Improving the Shelf Life of UF Soft Cheese. *Journal of Polymers and the Environment*, *29*, 1941–1953. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02003-3>
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Clarke, S. J., & Goodacre, R. (2005). Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *The Analyst*, *130*(12), 1648. <https://doi.org/10.1039/b511484e>
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., & Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, *514*(2), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.060>
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., & Goodacre, R. (2002). Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(6), 2822–2828. <https://doi.org/10.1128/aem.68.6.2822-2828.2002>
- Elmasry, G., Barbin, D. F., Sun, D.-W., & Allen, P. (2012). Meat Quality Evaluation by Hyperspectral Imaging Technique: An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(8), 689–711. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507908>
- Erkmen, O. (1996). Survival of virulent *Yersinia enterocolitica* during the manufacture and storage of Turkish Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(2-3), 285–292. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01156-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01156-7)
- Erkmen, O. (2000). Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in Turkish White cheese during the ripening period. *Journal of Food Engineering*, *46*(2), 127–131. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(00\)00076-5](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(00)00076-5)
- Erkmen, O., & Bozoğlu, T. F. (1995). Behaviour of *Salmonella typhimurium* in feta cheese during its manufacture and ripening. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(3), 259–263. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)94082-0](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)94082-0)
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, *57*, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004>
- European Commission. (2002). *Commission Regulation (EC) No 1829/2002 of 14 October 2002 amending the Annex to Regulation (EC) No 1107/96 with regard to the name “Feta”*. *Off. J. Eur. Commun.*

European Commission. (2005). *Commission regulation (EC) no 2073/ 2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs*. *Off. J. Eur. Union L338*:1–26.

Fadda, M. E., Cosentino, S., Deplano, M., & Palmas, F. (2001). Yeast populations in Sardinian feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *69*(1-2), 153–156. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00586-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00586-4)

Faix, O. (1991). Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. *Holzforschung*, *45*(s1), 21–28. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1991.45.s1.21>

FAO/WHO. (2002). *Report of a Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* . https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

Feng, C., Makino, Y., Oshita, S., & García Martín, J. F. (2018). Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. *Food Control*, *84*, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.013>

Fengou, L.-C., Lianou, A., Gkana, E. N., & Panagou, E. Z. (2019). Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy and multispectral imaging as means of estimating the microbiological spoilage of farmed sea bream. *Food Microbiology*, *79*, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.020>

Fernández-Álvarez, C., Torres-Corral, Y., & Santos, Y. (2018). Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, *170*, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.09.007>

Folm-Hansen, J. (1999). *On Chromatic and Geometrical Calibration* [Doctoral dissertation, Technical University of Denmark, Department of Mathematical Modelling].

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Microbiology of Cheese Ripening. *Fundamentals of Cheese Science*, 333–390. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_11

Frediansyah, A., Romadhoni, F., Suryani, Nurhayati, R., & Wibowo, A. (2021). *Fermentation of Jamaican Cherries Juice Using Lactobacillus plantarum Elevates Antioxidant Potential and Inhibitory Activity against Type II Diabetes-Related Enzymes*. *26*(10), 2868. <https://doi.org/10.3390/molecules26102868>

Galus, S., Arik Kibar, E. A., Gniewosz, M., & Kraśniewska, K. (2020). Novel Materials in the Preparation of Edible Films and Coatings—A Review. *Coatings*, *10*(7), 674. <https://doi.org/10.3390/coatings10070674>

Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>

- Gantzias, C., Lappa, I. K., Aerts, M., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Papadimitriou, K., De Brandt, E., Tsakalidou, E., & Vandamme, P. (2020). MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. *International Journal of Food Microbiology*, 323, 108586. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108586>
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms*, 5(3), 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
- Georgala, A. K., Kaminarides, S. E., & Anifantakis, E. M. (2006). Free fatty acid content of some traditional Greek cheese varieties. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61(1), 26–31.
- Georgala, A., Moschopoulou, E., Aktypis, A., Massouras, T., Zoidou, E., Kandarakis, I., & Anifantakis, E. (2005). Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Food Chemistry*, 93(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.007>
- Geronikou, A., Larsen, N., Lillevang, S. K., & Jespersen, L. (2022). Occurrence and Identification of Yeasts in Production of White-Brined Cheese. *Microorganisms*, 10(6), 1079. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061079>
- Geronikou, A., Srimahaeak, T., Rantsiou, K., Triantafillidis, G., Larsen, N., & Jespersen, L. (2020). Occurrence of Yeasts in White-Brined Cheeses: Methodologies for Identification, Spoilage Potential and Good Manufacturing Practices. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582778>
- Gheorghita (Puscaselu), R., Gutt, G., & Amariei, S. (2020). The Use of Edible Films Based on Sodium Alginate in Meat Product Packaging: An Eco-Friendly Alternative to Conventional Plastic Materials. *Coatings*, 10(2), 166. <https://doi.org/10.3390/coatings10020166>
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215–222. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00183-1)
- Goepfert, J. M., Olson, N. F., & Marth, E. H. (1968). Behavior of *Salmonella typhimurium* During Manufacture and Curing of Cheddar Cheese. *Applied Microbiology*, 16(6), 862–866. <https://doi.org/10.1128/am.16.6.862-866.1968>
- Gohil, V. S., Ahmed, M. A., Davies, R., & Robinson, R. K. (1995). Incidence of *Listeria* spp. in Retail Foods in the United Arab Emirates. *Journal of Food Protection*, 58(1), 102–104. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-58.1.102>
- Gonçalves Dos Santos, M. T. P., Benito, M. J., Córdoba, M. de G., Alvarenga, N., & Ruiz-Moyano Seco de Herrera, S. (2017). Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and -independent DNA approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013>
- Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., & Chatzopoulou, P. S. (2011). Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta

cheese packaged under modified atmosphere. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1240–1244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.022>

Govaris, A., Papageorgiou, D. K., & Papatheodorou, K. (2002). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the Manufacture and Ripening of Feta and Telemes Cheeses. *Journal of Food Protection*, 65(4), 609–615. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.4.609>

Gowen, A. A., Feng, Y., Gaston, E., & Valdramidis, V. (2015). Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, 137, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.012>

Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>

Guimarães, A., Venancio, A., & Abrunhosa, L. (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(9), 1803–1818. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1500718>

Guitián, M. V., Ibaruren, C., Soria, M. C., Hovanyecz, P., Banchio, C., & Audisio, M. C. (2019). Anti-*Listeria monocytogenes* effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. *International Dairy Journal*, 97, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.016>

Guo, H., Pan, L., Li, L., Lu, J., Kwok, L., Menghe, B., Zhang, H., & Zhang, W. (2017). Characterization of Antibiotic Resistance Genes from *Lactobacillus* Isolated from Traditional Dairy Products. *Journal of Food Science*, 82(3), 724–730. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13645>

Haastrup, M. K., Johansen, P., Malskær, A. H., Castro-Mejía, J. L., Kot, W., Krych, L., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2018). Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 173–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.015>

Hamed, H., Kargozari, M., Shotorbani, P. M., Mogadam, N. B., & Fahimdanesh, M. (2017). A novel bioactive edible coating based on sodium alginate and galbanum gum incorporated with essential oil of *Ziziphora persica*: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food model. *Food Hydrocolloids*, 72, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.014>

Harahap, I. A., Mariyatun, M., Hasan, P. N., Pamungkaningtyas, F. H., Widada, J., Utami, T., Cahyanto, M. N., Juffrie, M., Dinoto, A., Nurfiani, S., Zulaichah, E., Sujaya, I. N., & Rahayu, E. S. (2021). Recovery of Indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* Mut-7 on healthy Indonesian adults after consumption of fermented milk containing these bacteria. *Journal of Food Science and Technology*, 58(9), 3525–3532. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05046-z>

Hargrove, R. E., McDonough, F. E., & Mattingly, W. A. (1969). Factors Affecting Survival of *Salmonella* in Cheddar and Colby Cheese. *Journal of Milk and Food Technology*, 32(12), 480–484. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-32.12.480>

Hart, P. J., Wey, E., McHugh, T. D., Balakrishnan, I., & Belgacem, O. (2015). A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of *Escherichia coli* using MALDI mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 111, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.020>

- Hayaloglu, A. A. (2017). Cheese Varieties Ripened Under Brine. *Cheese*, 997–1040. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417012-4.00039-9>
- Hayaloglu, A. A., Bansal, N., & McSweeney, P. L. H. (2012). Influence of brine immersion and vacuum packaging on the chemistry, biochemistry, and microstructure of Mihalic cheese made using sheep's milk during ripening. *Dairy Science & Technology*, 92(6), 671–689. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0083-4>
- Hocking, A. D., & Faedo, M. (1992). Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged Cheddar cheese during maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 16(2), 123–130. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90005-n](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90005-n)
- Huang, W., Li, J., Wang, Q., & Chen, L. (2015). Development of a multispectral imaging system for online detection of bruises on apples. *Journal of Food Engineering*, 146, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.002>
- Hummel, J., Selbig, J., Walther, D., & Kopka, J. (2007). The Golm Metabolome Database: a database for GC-MS based metabolite profiling. *Topics in Current Genetics*, 75–95. https://doi.org/10.1007/4735_2007_0229
- ICAP. (2019). *ICAP Sector Study: Cheese products in Greece*. ICAP CRIF CY. <https://www.icapcrif.com/cy/2019/04/13/the-total-domestic-consumption-of-cheese-products-in-greece-rose-in-the-period-2017-2018-according-to-the-latest-sector-study-of-icap/>
- Inglin, R. C., Meile, L., & Stevens, M. J. A. (2018). Clustering of Pan- and Core-genome of *Lactobacillus* provides Novel Evolutionary Insights for Differentiation. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4601-5>
- Irmeler, S., Bavan, T., Oberli, A., Roetschi, A., Badertscher, R., Guggenbühl, B., & Berthoud, H. (2013). Catabolism of Serine by *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1309–1315. <https://doi.org/10.1128/aem.03085-12>
- Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Sabia, C., Manicardi, G., Anacarso, I., & Bondi, M. (2008). Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.015>
- Jadhav, S., Gulati, V., Fox, E. M., Karpe, A., Beale, D. J., Seviour, D., Bhawe, M., & Palombo, E. A. (2015). Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 202, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023>
- Jafarzadeh, S., Salehabadi, A., Mohammadi Nafchi, A., Oladzadabbasabadi, N., & Jafari, S. M. (2021). Cheese packaging by edible coatings and biodegradable nanocomposites; improvement in shelf life, physicochemical and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.021>
- Jalili, M. (2016). Chemical composition and sensory characteristics of Feta cheese fortified with iron and ascorbic acid. *Dairy Science & Technology*, 96(4), 579–589. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0280-7>
- Jay, M. J. (1978). *Modern Food Microbiology* (2nd ed.). D. Van Nostrand Reinhold Publishing Co.

- Jeevahan, J. J., Chandrasekaran, M., Venkatesan, S. P., Sriram, V., Britto Joseph, G., Mageshwaran, G., & Durairaj, R. B. (2020). Scaling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *100*, 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014>
- Jesus, A. L. T., Fernandes, M. S., Kamimura, B. A., Prado-Silva, L., Silva, R., Esmerino, E. A., Cruz, A. G., & Sant'Ana, A. S. (2016). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in probiotic cottage cheese formulations with reduced sodium content. *Food Research International*, *81*, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.030>
- Jozala, A. F., de Lencastre Novaes, L. C., Cholewa, O., & Penna, T. C. V. (2005). Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African Journal of Biotechnology*, *4*(3), 262–265.
- Kagkli, D.-M., Iliopoulos, V., Stergiou, V., Lazaridou, A., & Nychas, G.-J. . (2009). Differential *Listeria monocytogenes* Strain Survival and Growth in Katiki, a Traditional Greek Soft Cheese, at Different Storage Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(11), 3621–3626. <https://doi.org/10.1128/aem.01571-08>
- Kamarinou, C. S., Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Tassou, C. C., Galanis, A., Chorianopoulos, N. G., & Argyri, A. A. (2022). Mapping the Key Technological and Functional Characteristics of Indigenous Lactic Acid Bacteria Isolated from Greek Traditional Dairy Products. *Microorganisms*, *10*(2), 246. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020246>
- Kamarinou, C. S., Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Tassou, C. C., Galanis, A., Chorianopoulos, N., & Argyri, A. A. (2023). Application of multi-functional lactic acid bacteria strains in a pilot scale feta cheese production. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254598>
- Kamilari, E., Tomazou, M., Antoniadis, A., & Tsaltas, D. (2019). High Throughput Sequencing Technologies as a New Toolbox for Deep Analysis, Characterization and Potentially Authentication of Protection Designation of Origin Cheeses? *International Journal of Food Science*, *2019*, e5837301. <https://doi.org/10.1155/2019/5837301>
- Kaminarides, S. E., & Laskos, N. S. (1992). Yeasts in factory brine of Feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, *47*(1), 68–71.
- Kapetanakou, A. E., Gkerekou, M. A., Vitzilaiou, E. S., & Skandamis, P. N. (2017). Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion. *International Journal of Food Microbiology*, *246*, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.015>
- Karaioannoglou, P., Koidis, P., Papageorgiou, D., & Mantis, A. (1985). Survival of *Yersinia enterocolitica* during the manufacture and storage of Feta cheese. *Milchwissenschaft*, *40*(4), 204–206.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. *Journal of Food Protection*, *65*(11), 1811–1829. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.11.1811>
- Katsiari, M. C., Alichanidis, E., Voutsinas, L. P., & Roussis, I. G. (2000). Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, *10*(9), 635–646. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(00\)00097-2](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(00)00097-2)

- Katsouri, E., Magriplis, E., Zampelas, A., Nychas, G.-J., & H. Drosinos, E. (2020). Nutritional Characteristics of Prepacked Feta PDO Cheese Products in Greece: Assessment of Dietary Intakes and Nutritional Profiles. *Foods*, 9(3), 253. <https://doi.org/10.3390/foods9030253>
- Kergourlay, G., Taminau, B., Daube, G., & Champomier Vergès, M.-C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010>
- Kesenkaş, H., & Akbulut, N. (2008). Yeasts as Ripening Adjunct Cultures in Turkish White Brined Cheese Production. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 32(5), 327–333.
- Ketney, O., Tita, M., Tita, O., Bretan, L., & Boltea, F. (2008). Reserches regarding viability of probiotic level of some lactic bacterium and bifidobacterium colonies in the feta cheese. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 14(2), 446–454.
- Khalil, I. I., Aldabbagh, S. Y. A., & Shareef, A. M. (2018). Isolation, identification and detection of some virulence factors in yeasts from local cheese in Mosul city. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 32(1), 81–85. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2018.153802>
- Khodabakhshian, R., Emadi, B., Khojastehpour, M., & Golzarian, M. R. (2017). Determining quality and maturity of pomegranates using multispectral imaging. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(4), 322–331. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.10.004>
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. (2014). Άρθρο 83 Τυροκομικά προϊόντα . <https://www.aade.gr/sites/default/files/2020-03/83-iss3.pdf>
- Kok, C. R., & Hutkins, R. (2018). Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutrition Reviews*, 76(Supplement_1), 4–15. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy056>
- Kourkoutas, Y., Bosnea, L., Taboukos, S., Baras, C., Lambrou, D., & Kanellaki, M. (2006). Probiotic Cheese Production Using *Lactobacillus casei* Cells Immobilized on Fruit Pieces. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1439–1451. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72212-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72212-3)
- Kraggerud, H., Næs, T., & Abrahamsen, R. K. (2014). Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. *International Dairy Journal*, 34(1), 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.008>
- Lanciotti, R., Vannini, L., Lopez, C. C., Gobbetti, M., & Guerzoni, M. E. (2005). Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *International Journal of Dairy Technology*, 58(2), 89–99. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00197.x>
- Lasch, P., Jacob, D., Grunow, R., Schwecke, T., & Doellinger, J. (2016). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.013>
- Laslo, É., & György, É. (2018). Evaluation of the microbiological quality of some dairy products. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 11(1), 27–44. <https://doi.org/10.2478/ausal-2018-0002>

- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, *5*(770). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
- Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007). A Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *Journal of Food Protection*, *70*(9), 2172–2198. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2172>
- Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2014). The Microfloras of Traditional Greek Cheeses. *ASM Press EBooks*, 177–218. <https://doi.org/10.1128/9781555818593.ch9>
- Løkke, M. M., Seefeldt, H. F., Skov, T., & Edelenbos, M. (2013). Color and textural quality of packaged wild rocket measured by multispectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, *75*, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.018>
- Lund, F., Filtenborg, O., & Frisvad, J. C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, *12*, 173–180. [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(95\)80094-8](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(95)80094-8)
- Ma, F., Yao, J., Xie, T., Liu, C., Chen, W., Chen, C., & Zheng, L. (2014). Multispectral imaging for rapid and non-destructive determination of aerobic plate count (APC) in cooked pork sausages. *Food Research International*, *62*, 902–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.010>
- Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Almeida, G., & Teixeira, P. (2014). Genetic and Phenotypic Characterization of *Listeria monocytogenes* from Human Clinical Cases That Occurred in Portugal Between 2008 and 2012. *Foodborne Pathogens and Disease*, *11*(11), 907–916. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1806>
- Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padrós, H., & Ruiz-Barba, J. L. (2011). Genome Sequence of *Lactobacillus pentosus* IG1, a Strain Isolated from Spanish-Style Green Olive Fermentations. *Journal of Bacteriology*, *193*(19), 5605–5605. <https://doi.org/10.1128/jb.05736-11>
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., & Pal, U. K. (2011). Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *American Journal of Food Technology*, *6*(2), 87–102. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.87.102>
- Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2018). Biopreservatives as Agents to Prevent Food Spoilage. *Microbial Contamination and Food Degradation*, 235–270. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811515-2.00008-1>
- Manolaki, P., Katsiari, M. C., & Alichanidis, E. (2006). Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chemistry*, *98*(4), 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.031>
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., & Anifantakis, E. M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, *82*(2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00258-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00258-1)
- Mantis, A. (1973). *Production of staphylococcal enterotoxins in white-brined cheese Feta*.
- Mantis, A. I. (1993). *Hygiene and Technology of Milk and Dairy Products*. Kyriakidis Bros: Thessaloniki, Greece.

- Mantis, A., & Papageorgiou, D. (2003). Conditions of staphylococcal enterotoxin production in milk and milk products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 54(3), 242–252. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15267>
- Mantzourani, I., Terpou, A., Alexopoulos, A., Chondrou, P., Galanis, A., Bekatorou, A., Bezirtzoglou, E., Koutinas, A., & Plessas, S. (2018). Application of A Novel Potential Probiotic *Lactobacillus paracasei* Strain Isolated from Kefir Grains in the Production of Feta-Type Cheese. *Microorganisms*, 6(4), 121. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040121>
- Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2015). Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology*, 68(4), 565–572. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12208>
- Martín-del-Campo, S. T., Picque, D., Cosío-Ramírez, R., & Corrieu, G. (2007). Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. *International Dairy Journal*, 17(7), 835–845. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.003>
- Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S. A. F. T., & Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4974–4989. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13455>
- Mastromatteo, M., Conte, A., Faccia, M., Del Nobile, M. A., & Zambrini, A. V. (2014). Combined effect of active coating and modified atmosphere packaging on prolonging the shelf life of low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 36–45. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6999>
- Masuda, Y., Ono, H., Kitagawa, H., Ito, H., Mu, F., Sawa, N., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2011). Identification and Characterization of Leucocyclicin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8164–8170. <https://doi.org/10.1128/aem.06348-11>
- Mauropoulos, A. A., & Arvanitoyannis, I. S. (1999). Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines. *Food Control*, 10(3), 213–219. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(99\)00021-3](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(99)00021-3)
- McMahon, D. J., Fife, R. L., & Oberg, C. J. (1999). Water Partitioning in Mozzarella Cheese and Its Relationship to Cheese Meltability. *Journal of Dairy Science*, 82(7), 1361–1369. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75361-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75361-0)
- McMahon, D. J., Motawee, M. M., & McManus, W. R. (2009). Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure, and yield of feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4169–4179. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2183>
- McMeekin, T. A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S., & Zwietering, M. H. (2006). Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 181–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.048>
- McMeekin, T. A., Mellefont, L. A., & Ross, T. (2007). *Predictive microbiology: past, present and future* (1st ed., pp. 7–21). Woodhead Publishing Limited. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978184569006950002X>

- Mei, L. X., Nafchi, A. M., Ghasemipour, F., Easa, A. M., Jafarzadeh, S., & Al-Hassan, A. A. (2020). Characterization of pH sensitive sago starch films enriched with anthocyanin-rich torch ginger extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 4603–4612. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.082>
- Michaelidou, A. M., Alichanidis, E., Polychroniadou, A., & Zerfiridis, G. (2005). Migration of water-soluble nitrogenous compounds of Feta cheese from the cheese blocks into the brine. *International Dairy Journal*, *15*(6-9), 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.013>
- Michaelidou, A., Katsiari, M. C., Kondyli, E., Voutsinas, L. P., & Alichanidis, E. (2003). Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *International Dairy Journal*, *13*(2-3), 179–189. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(02\)00148-6](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(02)00148-6)
- Milesi, M. M., Vinderola, G., Sabbag, N., Meinardi, C. A., & Hynes, E. (2009). Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Research International*, *42*(8), 1186–1196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.005>
- Mirdamadi, S., & Agha Ghazvini, S. (2015). A comparative study between inhibitory effect of *L. lactis* and nisin on important pathogenic bacteria in Iranian UF Feta cheese. *Journal of Microbial Biology*, *3*(12), 79–92.
- Moatsou, G., & Govaris, A. (2011). White brined cheeses: A diachronic exploitation of small ruminants milk in Greece. *Small Ruminant Research*, *101*(1-3), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.031>
- Moatsou, G., Massouras, T., Kandarakis, I., & Anifantakis, E. (2002). Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Le Lait*, *82*(5), 601–611. <https://doi.org/10.1051/lait:2002036>
- Moatsou, G., Moschopoulou, E., Georgala, A., Zoidou, E., Kandarakis, I., Kaminarides, S., & Anifantakis, E. (2004). Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. *Food Chemistry*, *88*(4), 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.066>
- Monk, I. R., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2008). Tools for Functional Postgenomic Analysis of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(13), 3921–3934. <https://doi.org/10.1128/aem.00314-08>
- Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M., & Le Frileux, Y. (2007). Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, *68*(1-2), 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.019>
- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M-P., & Perrin, G. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, *64*(1-2), 217–221. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00452-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00452-9)
- Moros, J., Iñón, F. A., Khanmohammadi, M., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2006). Evaluation of the application of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectrometry (ATR–FTIR) and chemometrics to the determination of nutritional parameters of yogurt samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *385*(4), 708–715. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0418-1>

- Moubasher, A.-A. H., Abdel-Sater, M. A., & Soliman, Z. S. M. (2018). Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(1), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.003>
- Muller, T., Ulrich, A., Ott, E.-M., & Muller, M. (2001). Identification of plant-associated enterococci. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 268–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x>
- Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R., & Chikindas, M. L. (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3), 255–261. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.02076.x>
- NACMSF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods). (2005). Considerations for Establishing Safety-Based Consume-By Date Labels for Refrigerated Ready-to-Eat Foods†. *Journal of Food Protection*, 68(8), 1761–1775. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.8.1761>
- Nega, A., & Moatsou, G. (2011). Proteolysis and related enzymatic activities in ten Greek cheese varieties. *Dairy Science & Technology*, 92(1), 57–73. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0043-4>
- Nieto, M. B. (2009). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. *Springer eBooks*, 57–112. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_3
- Nisar, T., Alim, A., Iqbal, T., Iqbal, M., Tehseen, S., Zi-Chao, W., & Guo, Y. (2022). Functionality of different probiotic strains embedded in citrus pectin based edible films. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(2), 1005–1015. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15460>
- Nixon, G., & Burns, M. (2017). *Final report: Application of multispectral imaging (MSI) to food and feed sampling and analysis*. LGC Limited.
- Nugen, S. R., & Baeumner, A. J. (2008). Trends and opportunities in food pathogen detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(2), 451–454. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1886-2>
- Nussinovitch, A., Rosen, B., & Firstenberg-Eden, R. (1987). Effects of Yeasts on Survival of *Staphylococcus aureus* in Pickled Cheese Brine. *Journal of Food Protection*, 50(12), 1023–1025. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.12.1023>
- Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Mohareb, F. (2016). Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, 12, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.06.005>
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1-2), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>
- Nychas, G.-J., Tsakanikas, P., & Lytou, A. (2022). *Traceability and Quality Monitoring throughout the Fish Value Chain. D2.3 Pilot Design and Piloting plan (v1.0)*. TraceMyFish.
- Ojima-Kato, T., Yamamoto, N., Suzuki, M., Fukunaga, T., & Tamura, H. (2014). Discrimination of *Escherichia coli* O157, O26 and O111 from Other Serovars by MALDI-TOF MS Based on the S10-GERMS Method. *PLOS ONE*, 9(11), e113458–e113458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113458>

- Omar, N. B., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M. K., Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., Rubén, P.-P., Martínez-Canámero, M., & Gálvez, A. (2004). Functional and Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. *Systematic and Applied Microbiology*, *27*(1), 118–130. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00248>
- Panagou, E. Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J. M., & Nychas, G.-J. E. (2014). Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.026>
- Papadakis, P., Konteles, S., Batrinou, A., Ouzounis, S., Tsironi, T., Halvatsiotis, P., Tsakali, E., Van Impe, J. F. M., Vougiouklaki, D., Strati, I. F., & Houhoula, D. (2021). Characterization of Bacterial Microbiota of P.D.O. Feta Cheese by 16S Metagenomic Analysis. *Microorganisms*, *9*(11), 2377. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112377>
- Papademas, P., & Robinson, R. K. (2000). A comparison of the chemical, microbiological and sensory characteristics of bovine and ovine Halloumi cheese. *International Dairy Journal*, *10*(11), 761–768. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(00\)00110-2](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(00)00110-2)
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Georgalaki, M., Bounenni, R., Paximadaki, A., Charmpi, C., Alexandraki, V., Kazou, M., & Tsakalidou, E. (2022). Comparison of the Microbiome of Artisanal Homemade and Industrial Feta Cheese through Amplicon Sequencing and Shotgun Metagenomics. *Microorganisms*, *10*(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051073>
- Papadopoulou, C., Maipa, V., Dimitriou, D., Pappas, C., Voutsinas, L., & Malatou, H. (1993). Behavior of Salmonella enteritidis During the Manufacture, Ripening, and Storage of Feta Cheese Made from Unpasteurized Ewe's Milk. *Journal of Food Protection*, *56*(1), 25–28. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-56.1.25>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Bikouli, V. C., Lambrinea, E., & Chorianopoulos, N. (2022). Evaluating the Quality of Cheese Slices Packaged with Na-Alginate Edible Films Supplemented with Functional Lactic Acid Bacteria Cultures after High-Pressure Processing. *Foods*, *11*(18), 2855. <https://doi.org/10.3390/foods11182855>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Kounani, V., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. (2021). Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring the Shelf Life and Safety of Yogurts Supplemented With a Lactobacillus plantarum Strain With Probiotic Potential. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678356>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Varzakis, E. E., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. G. (2018). Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a Lactobacillus plantarum strain with probiotic potential. *Food Microbiology*, *74*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.005>
- Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G.-J. E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, *44*(10), 3264–3271. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.012>
- Papageorgiou, D. K., & Marth, E. H. (1989). Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. *Journal of Food Protection*, *52*, 82–87.

- Pappas, C. S., Tarantilis, P. A., Moschopoulou, E., Moatsou, G., Kandarakis, I., & Polissiou, M. G. (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry*, *106*(3), 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.034>
- Park, H. S., Marth, E. H., & Olson, N. F. (1970). Survival of Salmonella Typhimurium in Cold-pack-cheese Food During Refrigerated Storage. *Journal of Milk and Food Technology*, *33*(9), 383–388. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-33.12.383>
- Pato, U., Riftyan, E., Ayu, D. F., Jonnaidi, N. N., Wahyuni, M. S., Feruni, J. A., & Abdel-Wahhab, M. A. (2022). Antibacterial efficacy of lactic acid bacteria and bacteriocin isolated from Dadih's against Staphylococcus aureus. *Food Science and Technology*, *42*, e27121. <https://doi.org/10.1590/fst.27121>
- Păucean, A., Vodnar, D., Socaciu, C., & Man, S. (2014). Monitoring the Evolution of Major Chemical Compound in Dairy Products During Shelf-Life by FTIR. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, *71*(2). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:10777>
- Pavli, F. G., Argyri, A. A., Chorianopoulos, N. G., Nychas, G.-J. E., & Tassou, C. C. (2020). Effect of Lactobacillus plantarum L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages. *LWT*, *118*, 108810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108810>
- Pavli, F. G., Argyri, A. A., Papadopoulou, O. S., Nychas, G.-J. E., Chorianopoulos, N. G., & Tassou, C. C. (2016). Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Dairy and Meat Products: Assessment by In Vitro Tests and Molecular Characterization. *Journal of Probiotics & Health*, *04*(03). <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000157>
- Pavli, F., Kovaïou, I., Apostolakopoulou, G., Kapetanakou, A., Skandamis, P., Nychas, G.-J., Tassou, C., & Chorianopoulos, N. (2017). Alginate-Based Edible Films Delivering Probiotic Bacteria to Sliced Ham Pretreated with High Pressure Processing. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), 1867. <https://doi.org/10.3390/ijms18091867>
- Pinto, A., Barbosa, J., Albano, H., Isidro, J., & Teixeira, P. (2020). Screening of Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria and Their Characterization as Potential Probiotics. *Microorganisms*, *8*(3), 393. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030393>
- Pisano, M. B., Fadda, M. E., Viale, S., Deplano, M., Mereu, F., Blažić, M., & Cosentino, S. (2022). Inhibitory Effect of Lactiplantibacillus plantarum and Lactococcus lactis Autochthonous Strains against Listeria monocytogenes in a Laboratory Cheese Model. *Foods*, *11*(5), 715. <https://doi.org/10.3390/foods11050715>
- Pistorius, A. M. A. (1995). *Biochemical applications of FT-IR spectroscopy* (Vol. 7, pp. 8–15). Spectrosc. Eur.
- Prezzi, L. E., Lee, S. H. I., Nunes, V. M. R., Corassin, C. H., Pimentel, T. C., Rocha, R. S., Ramos, G. L. P. A., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Duarte, M. C. K. H., Freitas, M. Q., Esmerino, E. A., Silva, M. C., Cruz, A. G., & Oliveira, C. A. F. (2020). Effect of Lactobacillus rhamnosus on growth of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in a probiotic Minas Frescal cheese. *Food Microbiology*, *92*, 103557. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103557>

Principles of infrared spectroscopy (4) Advantages of FTIR spectroscopy | JASCO Global. (n.d.). JASCO Inc. Retrieved July 4, 2024, from <https://www.jasco-global.com/principle/principles-of-infrared-spectroscopy-4-advantages-of-ftir-spectroscopy/>

Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A., & Tzanetakis, N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *69*(1-2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00580-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00580-3)

Psoni, L., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006). Characteristics of Batzos cheese made from raw, pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Food Control*, *17*(7), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.03.001>

Quintana, Á. R., Perea, J. M., García-Béjar, B., Jiménez, L., Garzón, A., & Arias, R. (2020). Dominant Yeast Community in Raw Sheep's Milk and Potential Transfers of Yeast Species in Relation to Farming Practices. *Animals*, *10*(5), 906. <https://doi.org/10.3390/ani10050906>

Rai, P., Mehrotra, S., Priya, S., Gnansounou, E., & Sharma, S. K. (2021). Recent advances in the sustainable design and applications of biodegradable polymers. *Bioresource Technology*, *325*, 124739. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124739>

Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., & Griffiths, M. W. (1998). Survival of Bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in Soft Cheeses. *Journal of Dairy Science*, *81*(7), 1810–1817. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75750-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75750-9)

Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2008). Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*, *126*(1-2), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.031>

RASFF. (2022). *The rapid alert system for food and feed*. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/582129>

Reddy, S. G. (2021). Alginates - a seaweed product: Its properties and applications. Properties and applications of alginates. In *Properties and Applications of Alginates* (pp. 19–38). IntechOpen.

Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., & Wahlström, H. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, *16*(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>

Rippon, J. W. (1988). *Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. (3rd ed.). W.B. Saunders Company.

Robertson, G. L. (2013). *Food packaging: principles and practice* (2nd ed.). Taylor & Francis/Crc Press.

Romía, M. B., & Bernàrdez, M. A. (2009). Multivariate Calibration for Quantitative Analysis. *Elsevier EBooks*, 51–82. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374136-3.00003-1>

Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(3), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>

- 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*, *50*, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.011>
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2017). Multispectral imaging (MSI): A promising method for the detection of minced beef adulteration with horsemeat. *Food Control*, *73*, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.048>
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2018). Rapid detection of frozen-then-thawed minced beef using multispectral imaging and Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat Science*, *135*, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.09.016>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.032>
- Salvucci, E., Rossi, M., Colombo, A., Pérez, G., Borneo, R., & Aguirre, A. (2019). Triticale flour films added with bacteriocin-like substance (BLIS) for active food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, *19*, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.05.007>
- Sen, S., Dundar, Z., Uncu, O., & Ozen, B. (2021). Potential of Fourier-transform infrared spectroscopy in adulteration detection and quality assessment in buffalo and goat milks. *Microchemical Journal*, *166*, 106207. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106207>
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*, *2013*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/237921>
- Senturk Parreidt, T., Müller, K., & Schmid, M. (2018). Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods*, *7*(10), 170. <https://doi.org/10.3390/foods7100170>
- Sharaf, O. M., Ibrahim, G. A., Tawfek, N. F., Effat, B. A. M., El Shafei, K., El-Din, H. M. F., & Salem, M. M. A. (2014). Prevalence of some pathogenic microorganisms in factories Domiati, Feta cheeses and UHT milk in relation to public health sold under market conditions in Cairo. *International Journal of ChemTech Research*, *6*(5), 2807–2814.
- Sharma, K., Babaei, A., Oberoi, K., Aayush, K., Sharma, R., & Sharma, S. (2022). Essential Oil Nanoemulsion Edible Coating in Food Industry: a Review. *Food and Bioprocess Technology*, *15*, 2375–2395. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02811-6>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Silva, R., Vieira, A. H., Costa, R. G. B., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2018). Sodium reduction and flavor enhancer addition in probiotic prato cheese: Contributions of quantitative descriptive analysis and temporal dominance of sensations for sensory profiling. *Journal of Dairy Science*, *101*(10), 8837–8846. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14819>

- Silva, S. P. M., Teixeira, J. A., & Silva, C. C. G. (2023a). Application of enterocin-whey films to reduce *Listeria monocytogenes* contamination on ripened cheese. *Food Microbiology*, *109*, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104134>
- Silva, S. P. M., Teixeira, J. A., & Silva, C. C. G. (2023b). Prevention of Fungal Contamination in Semi-Hard Cheeses by Whey–Gelatin Film Incorporated with *Levilactobacillus brevis* SJC120. *Foods*, *12*(7), 1396. <https://doi.org/10.3390/foods12071396>
- Silva, S. P. M., Teixeira, J. A., & Silva, C. C. G. (2023c). Recent advances in the use of edible films and coatings with probiotic and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, *56*, 103196–103196. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103196>
- Sinelli, N., Barzaghi, S., Giardina, C., & Cattaneo, T. M. P. (2005). A Preliminary Study Using Fourier Transform near Infrared Spectroscopy to Monitor the Shelf-Life of Packed Industrial Ricotta Cheese. *Journal of near Infrared Spectroscopy*, *13*(5), 293–300. <https://doi.org/10.1255/jnirs.560>
- Singh, P., Wani, A. A., Karim, A. A., & Langowski, H-C. (2012). The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: A review. *International Journal of Dairy Technology*, *65*(2), 161–177. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00744.x>
- Smaoui, S., Ben Hlima, H., Tavares, L., Ben Braïek, O., Ennouri, K., Abdelkafi, S., Mellouli, L., & Mousavi Khaneghah, A. (2022). Application of eco-friendly active films and coatings based on natural antioxidant in meat products: A review. *Progress in Organic Coatings*, *166*, 106780. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.106780>
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts* (3rd ed.). John Wiley & Sons Ltd.
- Sogut, E., Filiz, B. E., & Seydim, A. C. (2022). Whey protein isolate- and carrageenan-based edible films as carriers of different probiotic bacteria. *Journal of Dairy Science*, *105*(6), 4829–4842. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21245>
- Sokolova, M., & Lapalme, G. (2009). A systematic analysis of performance measures for classification tasks. *Information Processing & Management*, *45*(4), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.ipm.2009.03.002>
- Speck, M. L. (1972). Control of Food-Borne Pathogens by Starter Cultures. *Journal of Dairy Science*, *55*(7), 1019–1022. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(72\)85614-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(72)85614-5)
- Spyrelli, E. D., Doulgeraki, A. I., Argyri, A. A., Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2020). Implementation of Multispectral Imaging (MSI) for Microbiological Quality Assessment of Poultry Products. *Microorganisms*, *8*(4), 552. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040552>
- Spyrelli, E. D., Ozcan, O., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G. - J. E. (2021). Spoilage assessment of chicken breast fillets by means of fourier transform infrared spectroscopy and multispectral image analysis. *Current Research in Food Science*, *4*, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.02.007>
- Stergiou, O. S., Tegopoulos, K., Kiouisi, D. E., Tsifintaris, M., Papageorgiou, A. C., Tassou, C. C., Chorianopoulos, N., Kolovos, P., & Galanis, A. (2021). Whole-Genome Sequencing, Phylogenetic and Genomic Analysis of *Lactiplantibacillus pentosus* L33, a Potential Probiotic Strain Isolated From Fermented Sausages. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746659>

- Subramanian, A., Alvarez, V. B., Harper, W. J., & Rodriguez-Saona, L. E. (2011). Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 21(6), 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.012>
- Sun, D. W. (2009). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control* (1st ed.). Academic Press, Elsevier.
- Sun, J., Leng, X., Zang, J., & Zhao, G. (2022). Bio-based antibacterial food packaging films and coatings containing cinnamaldehyde: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(1), 140–152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2105300>
- Ταραντίλης, Π. Α., & Παππάς, Χ. Σ. (2015). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση Πανεπιστημιακές Σημειώσεις* (pp. 65–86). Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Tegopoulos, K., Stergiou, O. S., Kiouisi, D. E., Tsifintaris, M., Koletsou, E., Papageorgiou, A. C., Argyri, A. A., Chorianopoulos, N., Galanis, A., & Kolovos, P. (2021). Genomic and Phylogenetic Analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* L125, and Evaluation of Its Anti-Proliferative and Cytotoxic Activity in Cancer Cells. *Biomedicines*, 9(11), 1718. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111718>
- Terpou, A., Mantzourani, I., Galanis, A., Kanellaki, M., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A., Koutinas, A., & Plessas, S. (2018). Employment of *L. paracasei* K5 as a Novel Potentially Probiotic Freeze-Dried Starter for Feta-Type Cheese Production. *Microorganisms*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010003>
- The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. (2009). *EFSA Journal*, 7(1), 223r. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.223r>
- Tokak, S., Kilic, İ. H., Yalcin, H. T., & Duran, T. (2020). Gaziantep İline Ait Bazı Süt Ürünlerinde Bozulmaya Neden Olan Mayalardan Ekstraselüler Lipaz Enzimi Aranması ve Lipaz Aktivitesine Sahip Suşların Genotipik İdentifikasyonu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.a.vi.555727>
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., & Lozo, J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.009>
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., & Nychas, G.-J. E. (2015). High Throughput Multispectral Image Processing with Applications in Food Science. *PLoS ONE*, 10(10), e0140122–e0140122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140122>
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Panagou, E., & Nychas, G.-J. (2016). Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*, 161, 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.019>
- Tzanetakis, N., Hatzikamari, M., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (1996). Yeasts of the surface microflora of Feta cheese. In yeasts in the dairy industry: positive and negative aspects. *Proceedings of the Symposium Organised by Group F47-IDF*, 34–43.

- Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (1992). Changes in Numbers and Kinds of Lactic Acid Bacteria in Feta and Teleme, Two Greek Cheeses from Ewes' Milk. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1389–1393. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77891-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77891-6)
- Tzora, A., Nelli, A., Voidarou, C., Fthenakis, G., Rozos, G., Theodorides, G., Bonos, E., & Skoufos, I. (2021). Microbiota “Fingerprint” of Greek Feta Cheese through Ripening. *Applied Sciences*, 11(12), 5631. <https://doi.org/10.3390/app11125631>
- Vafopoulou, A., Alichanidis, E., & Zerfiridis, G. K. (1989). Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases. *Journal of Dairy Research*, 56(2), 285–296. <https://doi.org/10.1017/s0022029900026492>
- Valsamaki, K., Michaelidou, A., & Polychroniadou, A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 71(2), 259–266. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(00\)00168-0](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00168-0)
- Vassiliadis, A., Psoni, L., Nikolaou, S., Arvanitis, L., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2009). Changes in microbial populations, kinds of lactic acid bacteria and biochemical characteristics of Greek traditional feta cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62(1), 39–47. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00453.x>
- Verbeke, W., Pérez-Cueto, F. J. A., Barcellos, M. D. de, Krystallis, A., & Grunert, K. G. (2010). European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science*, 84(2), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.001>
- Verma, J., Saxena, S., & Babu, S. G. (2012). ELISA-Based Identification and Detection of Microbes. *Springer Protocols Handbooks*, 169–186. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34410-7_13
- Vivier, D., Rivemale, M., Reverbel, J. P., Ratomahenina, R., & Galzy, P. (1994). Study of the growth of yeasts from feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 22(2-3), 207–215. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90143-0)
- Wai, S. N., How, Y. H., Saleena, L. A. K., Degraeve, P., Oulahal, N., & Pui, L. P. (2022). Chitosan–Sodium Caseinate Composite Edible Film Incorporated with Probiotic *Limosilactobacillus fermentum*: Physical Properties, Viability, and Antibacterial Properties. *Foods*, 11(22), 3583. <https://doi.org/10.3390/foods11223583>
- Westall, S., & Filtenborg, O. (1998). Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, 15(2), 215–222. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0161>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/s0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/s0169-7439(01)00155-1)
- Wu, Z., Bertram, H. C., Kohler, A., Böcker, U., Ofstad, R., & Andersen, H. J. (2006). Influence of Aging and Salting on Protein Secondary Structures and Water Distribution in Uncooked and Cooked Pork. A Combined FT-IR Microspectroscopy and ¹H NMR Relaxometry Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8589–8597. <https://doi.org/10.1021/jf061576w>
- Yan, M. R., Hsieh, S., & Ricacho, N. (2022). Innovative Food Packaging, Food Quality and Safety, and Consumer Perspectives. *Processes*, 10(4), 747. <https://doi.org/10.3390/pr10040747>

- Ye, K., Li, P., & Gu, Q. (2020). Complete genome sequence analysis of a strain *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its probiotic characteristics. *Genomics*, *112*(5), 3142–3149. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.05.015>
- Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>
- Yu, H., Chen, Y. F., Yang, H., Yang, J., Xue, J. G., Li, C. K., Kwok, L. Y., Zhang, H. P., & Sun, T. S. (2014). Screening for *Lactobacillus plantarum* with potential inhibitory activity against enteric pathogens. *Annals of Microbiology*, *65*(3), 1257–1265. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0963-3>
- Yu, X. L., Li, X. B., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2008). Coating With Sodium Alginate And Its Effects On The Functional Properties And Structure Of Frozen Pork. *Journal of Muscle Foods*, *19*(4), 333–351. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2008.00113.x>
- Zhao, M., Downey, G., & O'Donnell, C. P. (2014). Detection of adulteration in fresh and frozen beefburger products by beef offal using mid-infrared ATR spectroscopy and multivariate data analysis. *Meat Science*, *96*(2), 1003–1011. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.015>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>