



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

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συνεισφορά των βιοπροστατευτικών καλλιεργειών
καθώς και των τεχνολογικών-omics στη βιοσυντήρηση της φέτας
υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Μαρίνα Χ. Σιάπκα

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χωριανόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2024

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συνεισφορά των βιοπροστατευτικών καλλιεργειών
καθώς και των τεχνολογικών-omics στη βιοσυντήρηση της φέτας
υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

“Contribution of bioprotective cultures as well as techno-omics
to the biopreservation of feta under aerobic and anaerobic conditions”

Μαρίνα Χ. Σιάπκα

Εξεταστική Επιτροπή:

Χωριανόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)
Κωνσταντίνος Παπαδημητρίου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ
Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η φέτα αποτελεί τον πυλώνα των γαλακτοκομικών προϊόντων σημειώνοντας τη μεγαλύτερη κατανάλωση τόσο στην Ελλάδα όσο και στο εξωτερικό. Η φέτα ανήκει στην κατηγορία των ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) τυριών και κατέχει εξέχουσα θέση ανάμεσα στα υπόλοιπα 24 ΠΟΠ τυριά της Ελλάδας όχι μόνο γιατί παραδοσιακά αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ελληνικής διατροφής αλλά πρωτίστως επειδή αποτελεί ένα εθνικό προϊόν-έμβλημα, σημειώνοντας τεράστιες εξαγωγικές επιτυχίες. Συνεπώς η ανάπτυξη ασφαλών και σταθερών προϊόντων κρίνεται απαραίτητη. Το γεγονός αυτό γέννησε την ανάγκη τα τελευταία χρόνια για την εύρεση σύγχρονων και μη-επεμβατικών μεθοδολογιών που θα εξασφαλίσουν την ύψιστη ασφάλεια και ποιότητα στα προϊόντα αλλά και θα προσφέρουν παράταση στην διάρκεια ζωής και διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τελικών προϊόντων. Βασικός στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι η εκτίμηση της συνεισφοράς των τεχνολογιών-omics και των βιοπροστατευτικών καλλιεργειών στην βιοσυντήρηση της φέτας υπό αερόβιες και υπό κενό συνθήκες καθώς και η εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) και της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).

Για τον λόγο αυτό στην πειραματική αυτή μελέτη έγινε χρήση δύο διαφορετικών θερμοκρασιών, 4°C και 10°C, και δύο διαφορετικές συσκευασίες, κενού και αέρα. Η φέτα χαμηλής αλατότητας που χρησιμοποιήθηκε, τεμαχίστηκε σε δείγματα 30 γραμμαρίων και διαχωρίστηκε σε περιπτώσεις δειγμάτων που περιλάμβανε δείγματα που εμβολιάστηκαν με *Listeria monocytogenes*, με ή χωρίς την επικάλυψη με εδώδιμες αλγινικές μεμβράνες που περιείχαν υπερκείμενο των *Lactiplantibacillus pentosus* (L 33) και *Lactiplantibacillus plantarum* (L 125), ή σε δείγματα που ψεκάστηκαν με υπερκείμενο των *Lactiplantibacillus pentosus* (L 33) και *Lactiplantibacillus plantarum* (L 125) ή με σκέτο UHT γάλα εμπορίου (control δείγματα περίπτωσης). Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν στα δείγματα ήταν η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), η *Listeria monocytogenes* και οι ζύμες και μύκητες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνοντας δείγματα και από τις δύο θερμοκρασίες, τα οποία στην συνέχεια υποβάλλονταν σε μικροβιολογική και φυσικοχημική ανάλυση καθώς και στην λήψη δεδομένων μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) και μέσω της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) με τη χρήση δύο οργάνων (VideometerLab, VideometerLite).

Όσον αφορά τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, ήταν φανερό πως η θερμοκρασία αλλά και οι συνθήκες συντήρησης επηρέασαν αισθητά την αλλοίωση της φέτας. Μεγαλύτερη αλλοίωση παρατηρήθηκε στα δείγματα φέτας που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 10°C. Τα δείγματα αυτά χρειάστηκαν διάστημα μόλις 31 ημερών για να αλλοιωθούν συγκριτικά με τις αναερόβιες συνθήκες που χρειάστηκαν περίπου τις διπλάσιες ημέρες (76 ημέρες).

Στην συνέχεια κατασκευάστηκαν μοντέλα συσχέτισης και ταξινόμησης των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων με τα συνολικά φασματοσκοπικά δεδομένα των 76 ημερών δειγματοληψίας. Για τα δεδομένα FTIR, περιοχή ενδιαφέροντος ήταν τα 1900-800 cm⁻¹. Εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την εκτίμηση της OMX. Για την ανάπτυξη και επικύρωση των μοντέλων χρησιμοποιήθηκε το 70% των δεδομένων ενώ για την πρόβλεψη το υπόλοιπο 30%. Ανεξάρτητες μεταβλητές αποτέλεσαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα ενώ εξαρτημένες μεταβλητές τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX. Για τον ποιοτικό διαχωρισμό των δειγμάτων φέτας σε δείγματα που περιείχαν το παθογόνο και σε αυτά που δεν το περιείχαν, εφαρμόστηκε η μέθοδο της διακριτής ανάλυσης των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Ορίστηκαν δύο κλάσεις: «κλάση 1» για τα δείγματα χωρίς *Listeria monocytogenes* και «κλάση 2» για τα δείγματα με *Listeria monocytogenes* ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα και ως εξαρτημένες μεταβλητές ορίστηκαν οι δύο κλάσεις, 1 και 2. Τέλος, τα αποτελέσματα των μοντέλων (PLS-R, PLS-DA) για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των δεδομένων δεν είχαν τη επιθυμητή επιτυχία καθώς παρουσίασαν χαμηλή απόδοση και κρίθηκαν ως μη αποτελεσματικά για την εφαρμογή τους στην συγκεκριμένη πειραματική μελέτη.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία

Λέξεις κλειδιά: Φέτα, βιοσυντήρηση, *Listeria monocytogenes*

Contribution of bioprotective cultures as well as techno-omics to the biopreservation of feta under aerobic and anaerobic conditions

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

ABSTRACT

In recent decades, feta is the leader of Greek dairy products, recording the highest consumption for both Greece and abroad. Feta belongs to the category of PDO (Protected Designation of Origin) cheeses and occupies a prominent position among the remaining 24 PDO cheeses of Greece, not only because it is traditionally an important part of the Greek diet, but primarily because it is a national emblem product, achieving huge export successes. Therefore, the development of safe and stable products is considered essential. This fact gave rise to the need in recent years to find modern, but also non-invasive methodologies that will increase safety and quality of Feta but also to offer an extension in the shelf life and maintenance of the organoleptic characteristics of the final products. The main objective of this study is to assess the contribution of bioprotective cultures and -omics technologies to the biopreservation of feta under aerobic and anaerobic conditions and the microbial assessment of feta cheese spoilage using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and multispectral imaging (MSI).

In this respect, two different temperatures, 4°C and 10°C, and two different packaging conditions, vacuum and air, were used in this experimentation. The low salt Feta was cut into 30 g slices and separated into the following sample cases with or without the inoculation of *Listeria monocytogenes*, with or without edible alginate films containing supernatant of *Lactiplantibacillus pentosus* (L 33) and *Lactiplantibacillus plantarum* (L 125), or sprayed with supernatant of *Lactiplantibacillus pentosus* (L 33) and *Lactiplantibacillus plantarum* (L 125) or with commercial UHT milk (corresponding control samples). The microorganisms assessed were total viable counts (TVC), lactic acid bacteria (LAB), *Listeria monocytogenes* and yeasts-molds. Sampling was carried out at regular intervals, taking samples from both temperatures, which were then subjected to microbiological and physicochemical analysis, as well as to spectroscopic imaging via Fourier transform spectroscopy (FTIR) and multispectral imaging (MSI) using two different instruments (VideometerLab and VideometerLite).

Regarding the microbiological results, the temperature, as well as the storage conditions, significantly affected the spoilage of the feta cheese samples. Earlier spoilage was observed in the feta samples

preserved under aerobic conditions at 10°C. These samples spoiled after 31 days of preservation compared to anaerobic conditions which get spoiled after 76 days.

Subsequently, correlation and classification models of the microbiological results were constructed with the total spectroscopic data of the 76 days of sampling. The region of interest was 1900-800 cm⁻¹. For the development and validation of these models, 70% of this data was used, while 30% of them was used for prediction. For this analysis, the independent variables were the spectroscopic data, while the dependent variables were the microbiological results of TVC. Partial least squares regression (PLS-R) was applied for the estimation of TVC. To qualitatively separate the feta samples into samples that contained the pathogen and those that did not, two classes were constructed. "Class 1" is the samples without *Listeria monocytogenes* and "class 2" the samples with *Listeria monocytogenes*. The method of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was applied to these samples. In this case, the spectroscopic data were defined as independent variables and the two classes, 1 and 2, were defined as dependent variables.

Finally, the results of the two algorithms (PLS-R, PLS-DA) for the qualitative and quantitative assessment of the data did not have the desired results as both models presented a low performance and were considered as unsuitable for their application in this particular experimental study.

Scientific area: Microbiology

Keywords: Feta, biopreservation, *Listeria monocytogenes*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νίκο Χωριανόπουλο, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου παρείχε απόλυτη στήριξη κατά την εκπόνηση της μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Παπαδημητρίου του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών που δέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής και αφιέρωσαν χρόνο για την μελέτη της εργασίας μου.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την ερευνήτρια Όλγα Παπαδοπούλου που με βοήθησε σε κάθε βήμα της μελέτης μου. Συγκεκριμένα την ευχαριστώ για οποιαδήποτε καθοδήγηση και συμβουλή σε όλη την διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αγγελική Δουκάκη για όλη την καθοδήγηση και υπομονή που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής πορείας, ανάλυσης των δεδομένων και συγγραφής αυτής της μελέτης, καθώς μου παρείχε πολύτιμες συμβουλές και στήριξη.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την συνεργασία και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια όλων, για τις συμβουλές και οδηγίες τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για κάθε είδους στήριξη που μου προσέφεραν σε κάθε στάδιο της ακαδημαϊκής μου πορείας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	10
1.1 Παραγωγή Φέτας	10
1.2 Φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά φέτας	11
1.3 Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης Φέτας	12
1.4 Η μικροβιακή χλωρίδα της φέτας.....	12
1.5 Γαλακτικά Βακτήρια (LAB)	14
1.6 Ζύμες και μύκητες στην φέτα	15
1.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση της φέτας.....	16
1.7.1 Οξύτητα (pH).....	16
1.7.2 Ενεργότητα νερού (a_w).....	16
1.7.3 Θερμοκρασία	17
1.7.4 Συσκευασία	18
1.8 Αλλοιώσεις και ποιοτικά προβλήματα φέτας.....	21
1.9 Προσβολές παθογόνων μικροοργανισμών στη φέτα.....	22
1.9.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.10 Χρήση εδώδιμων μεμβρανών Αλγινικού Νατρίου (Sodium-Alginate edible film).....	25
1.11 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier.....	26
1.12 Φασματοσκοπία με τη μέθοδο πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).....	28
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	32
2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός	32
2.2 Επιλογή μικροοργανισμών	32
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων	33
2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις	34
2.5 Μέτρηση pH	37
2.6 Μέτρηση ενεργότητας νερού (a_w)	37

2.7 Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου	38
2.8 Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων φέτας.....	39
2.9 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)	39
2.10 Εφαρμογή φασματοσκοπίας με την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).....	40
2.11 Ανάλυση δεδομένων	42
2.11.1 Μοντέλο για την εκτίμηση της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression – PLS-R).....	42
2.11.2 Μοντέλο για τον διαχωρισμό δειγμάτων φέτας με και χωρίς <i>Listeria monocytogenes</i> με διακριτή ανάλυση με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis - PLS-DA)	44
3. Αποτελέσματα	45
3.1 Εκτίμηση της μικροβιολογικών αποτελεσμάτων.....	45
3.1.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων	45
3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH	53
3.3 Αποτελέσματα μέτρησης ενεργότητας νερού (aw).....	54
3.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου	54
3.5 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων	56
3.5.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR) και της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).....	56
3.5.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square-Regression, PLS-R).....	61
3.5.3 Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).....	68
4. Συμπεράσματα.....	76
5. Βιβλιογραφία.....	78

1. Εισαγωγή

1.1 Παραγωγή Φέτας

Η φέτα ανήκει στην κατηγορία των μαλακών λευκών τυριών ωριμασμένη μέσα σε άλμη. Η γεύση της είναι αλμυρή, ελαφρώς όξινη με ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που την κάνουν επιθυμητή από το μεγαλύτερο ποσοστό των καταναλωτών (Sarantinopoulos et al., 2001). Η φέτα, ως ένα από τα δημοφιλέστερα ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) προϊόντα της Ελλάδας, παράγεται από πρόβριο γάλα ή μείγμα πρόβριου και κατσικίσιου γάλακτος (Rantsiou et al., 2008, Angelopoulou et al., 2017) .

Η παραγωγή της φέτας είναι μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία. Πρωταρχικά, το γάλα υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία (παστερίωση), προκειμένου να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή ασφάλεια του τελικού προϊόντος. Στη συνέχεια, μετά την πήξη του γάλακτος (εντός 24 ωρών από την άμελξή του) μέσω του εμβολιασμού του με οξυγαλακτικά βακτήρια συγκεκριμένου είδους και γένους, το τυρόπηγμα το οποίο δημιουργήθηκε τοποθετείται σε κατάλληλα καλούπια προκειμένου να επιτευχθεί φυσική στράγγιση χωρίς την εφαρμογή πίεσης. Κατά την διάρκεια της φυσικής στράγγισης και όταν στερεοποιηθεί το πήγμα, εφαρμόζεται επιφανειακά αλάτι προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιθυμητή αλατότητα της φέτας. Είναι καίριο να τονιστεί ότι το στάδιο αυτό είναι καθοριστικό για την ανάπτυξη της επιθυμητής μικροβιακής χλωρίδας της φέτας καθώς και των ιδιαίτερων και ξεχωριστών οργανοληπτικών της χαρακτηριστικών. Στην συνέχεια το τυρόπηγμα τοποθετείται σε ειδικά καλούπια-υποδοχείς στα οποία και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα άλμης ώστε να είναι εφικτή η ωρίμανση του τυριού (Φράγκου, 2013, Χαβαλέ Ε. 2010, Ζερφυρίδης Γ., 2001).

Το στάδιο της ωρίμανσης πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο διαρκεί περίπου 15 ημέρες. Στο στάδιο αυτό το τυρί είναι αναγκαίο να διατηρηθεί σε σταθερές συνθήκες, τέτοιες όπου δεν θα ξεπερνούν τους 18°C και ελάχιστη σχετική υγρασία 85% (Φράγκου, 2013, Χαβαλέ Ε. 2010). Στο στάδιο αυτό, η λιπολυτική και πρωτεολυτική δραστηριότητα της επιφανειακής μικροβιακής χλωρίδας της φέτας είναι αρκετά έντονη γεγονός που συμβάλει στην ανάπτυξη των πτητικών χαρακτηριστικών οσμών της φέτας. Χάρη στο στάδιο της αλάτισης και της πτώσης του pH, διαμορφώνονται όλα σχεδόν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας (Υ.Η.Ηuί, 2012). Το δεύτερο

στάδιο είναι και το μεγαλύτερο καθώς διαρκεί έως και 2 μήνες. Στο στάδιο αυτό το τυρί ωριμάζει σε ψυκτικούς θαλάμους σε θερμοκρασία 2-4°C, ενώ η ελάχιστη σχετική υγρασία διατηρείται στα ίδια επίπεδα, αυτά των 85%. Τέλος η ωρίμανση πρέπει να γίνεται αποκλειστικά σε εγκαταστάσεις εντός της επιθυμητής γεωγραφικής ζώνης (Χαβαλέ Ε. 2010).

Μετά την ωρίμανση, η φέτα καθαρίζεται επιφανειακά με καθαρό νερό και ακολουθεί η συσκευασία και η αποθήκευση σε κατάλληλους περιέκτες για περεταίρω αποθήκευση και μεταφορά ή σε ξύλινα βαρέλια για αποθήκευση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η φέτα διατηρείται και αποθηκεύεται σε άλμη (Υ.Η.Ηυί, 2012).

1.2 Φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά φέτας

Είναι γνωστό ότι η φέτα ανήκει στην κατηγορία των λευκών μαλακών τυριών. Αξιοσημείωτο είναι ότι είναι αναγκαίο να έχει σταθερά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως μέγιστη υγρασία 56% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43%. Έχει σχήμα σφινοειδές ή ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο, με ή χωρίς οπές, συμπαγή σύσταση χωρίς επιδερμίδα. Επίσης απαγορεύεται αυστηρά η οποιαδήποτε προσθήκη συντηρητικών στο τυρί ή στην άλμη (Paravasiliou et al., 2019, Χαβαλέ Ε. 2010, Sarantinopoulos et al., 2001). Όσον αφορά τα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά, έχει λευκό χρώμα που οφείλεται στην προέλευση του γάλακτος αλλά και στο γεγονός ότι τα αιγοπρόβατα μεταφέρουν ελάχιστα καροτενοειδή στο γάλα, γεγονός που αποτρέπει την εμφάνιση υποκίτρινου χρώματος. Η υφή της είναι μαλακή και κρεμώδης και εύκολα γίνεται ο διαχωρισμός σε κομμάτια (Υ.Η.Ηυί, 2012).

Η γεύση είναι ελαφρώς όξινη και αλμυρή ενώ το άρωμα της είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με το υψηλό ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων. Παλαιότερα, καθώς η παραγωγή της φέτας λάμβανε μέρος με μικρά και τοπικά γαλακτοκομεία, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας δεν ήταν σταθερά αλλά επηρεάζονταν άμεσα από την γεωγραφική περιοχή, τις συνθήκες παραγωγής, τις καλλιέργειες εκκίνησης και την μικροβιακή χλωρίδα του κάθε γάλακτος. Στην σήμερον εποχή, η εκβιομηχάνιση της παραγωγής αλλά και η ανάγκη για κάλυψη όλο ένα και μεγαλύτερο ποσοστό καταναλωτών γέννησε την ανάγκη σταθερότερων αλλά και περισσότερο ελεγχόμενων συνθηκών παραγωγής γεγονός που οδήγησε σε σταθερότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη ομοιομορφία στο προϊόν (Υ.Η.Ηυί, 2012, Χαβαλέ Ε. 2010, Χασάπη Σ., 2006).

1.3 Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης Φέτας

Το όλο ένα και αυξανόμενο εύρος αγροτικών προϊόντων, δικτύων πώλησης και εξαγωγών, γέννησε την ανάγκη σήμανσης ορισμένων προϊόντων, ξεχωρίζοντας τα από άλλα προϊόντα μαζικής παραγωγής. Με τον όρο Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) νοείται το προϊόν εκείνο που προέρχεται από μια συγκεκριμένη περιοχή, τόπο ή χώρα, η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά του οποίου οφείλονται στα ουσιαστικά ή αποκλειστικά στα ιδιαίτερα γεωγραφικά και περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά της περιοχής αυτής, του τόπου ή της χώρας του οποίου όλες οι διεργασίες παραγωγής, μεταποίησης και επεξεργασίας βρίσκονται στην γεωγραφική εμβέλεια που ορίζεται από τον νόμο (Φωτεινιάς Ν. Ι., 2016, Χαβαλέ Ε. 2010, Χασάπη Σ., 2006). Στην Ελλάδα έχουν καταχωρηθεί συνολικά 104 ΠΟΠ προϊόντα εκ των οποίων τα 24 είναι τυριά. Αναφορικά παρακάτω διατυπώνονται τα τυριά που κέρδισαν τον τίτλο ΠΟΠ στην Ελλάδα (ΥΠΑΑΤ, 2024).

Στο πλαίσιο αυτό, τα προϊόντα ΠΟΠ κερδίζουν όλο ένα και μεγαλύτερο έδαφος στις αντίστοιχες αγορές, αυξάνοντας συνεχώς την εκτίμηση των καταναλωτών ως προς αυτά αλλά παράλληλα συνεισφέροντας στη δημιουργία μιας ισχυρής τοπικής οικονομίας ξεχωρίζοντας τόσο στην ελληνική αλλά τόσο και στην παγκόσμια αγορά (Ζαρκάδα Χ., 2020).

Πίνακας 1.1: Τα ΠΟΠ τυριά της Ελλάδας (Χαβαλέ Ε., 2010)

ΠΟΠ τυριά της Ελλάδας	
Ανεβατό	Μανούρι
Γαλοτύρι	Μετσοβόνε
Γραβιέρα Αγράφων	Μπάτζος
Γραβιέρα Κρήτης	Ξύγαλο Σητείας
Γραβιέρα Νάξου	Ξινομυζήθρα Κρήτης
Καλαθάκι Λήμνου	Πηχτόγαλο Χανίων
Κασέρι	Σαν Μιχάλη
Κατίκι Δομοκού	Σφέλα
Κεφαλογραβιέρα	Φέτα
Κοπανιστή	Φορμαέλα Αράχοβας-Παρνασσού
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	Κρασοτύρι Κω/ Τυρί της Πόσιας
ΑΡΣΕΝΙΚΟ ΝΑΞΟΥ	Κασκαβάλι Πίνδου / Kashkavali Pindou

1.4 Η μικροβιακή χλωρίδα της φέτας

Η ολική μικροβιακή χλωρίδα είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του κάθε τυριού το οποίο δεν παραμένει σταθερό αλλά μεταβάλλεται ποιοτικά και ποσοτικά (Tzora et al.,

2021). Εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το είδος του τυριού, την διάρκεια, το περιβάλλον και τις συνθήκες ωρίμανσης καθώς και από πολλούς άλλους παράγοντες. Στη φέτα συγκεκριμένα η ολική μικροβιακή χλωρίδα απαρτίζεται από την αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα του γάλακτος, τα γαλακτικά βακτήρια εκκίνησης (starter lactic acid bacteria) και την δευτερεύουσα μικροβιακή χλωρίδα (non-starter lactic acid bacteria) (Tzora et al., 2021, Y.H.Hui, 2012, Sarantinopoulos et al., 2001).

Οι καλλιέργειες εκκίνησης (SLAB) είναι γαλακτικά βακτήρια του γένους *Lactobacillus spp* και *Enterococcus spp* τα οποία είναι αρκετά ανθεκτικά σε αντίξοες συνθήκες αλατότητας και όξινου περιβάλλοντος. Εισάγονται κατά την έναρξη της παραγωγής της φέτας και συμβάλλουν στο μεταβολισμό της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ και οδηγούν στην ωρίμανση της φέτας (Rantsiou et al., 2008, Sarantinopoulos et al., 2001). Οι καλλιέργειες εκκίνησης εισάγονται κατά το ξεκίνημα της παραγωγής ή υπάρχουν φυσικά στην πρώτη ύλη, δηλαδή στο γάλα (Robertson G. L., 2010) Το γένος *Enterococcus spp* είναι το κυρίαρχο γένος μικροοργανισμών κατά το στάδιο της ωρίμανσης καθώς ο πληθυσμός τους είναι αρκετά υψηλός σε σχέση με τα υπόλοιπα γένη. Αξιοσημείωτη είναι η συμβολή τους στην βελτιστοποίηση των οργανοληπτικών της χαρακτηριστικών και συγκεκριμένα του αρώματος, της γεύσης και της υφής. Παρόλα αυτά σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς τα enterococci μπορούν να οδηγήσουν στα αντίθετα αποτελέσματα και στην υποβάθμιση της εμφάνισης και των υπόλοιπων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της φέτας (Rantsiou et al., 2008, Ambadoyiannis et al., 2007).

Η δευτερεύουσα μικροβιακή χλωρίδα της φέτας περιλαμβάνει κυρίως τα γένη *Lactococcus spp*, *Pedococcus spp*, *Enterococcus spp* (Spyrelli et al., 2021). Τα NSLAB βακτήρια δεν μεταβολίζουν την λακτόζη σε γαλακτικό οξύ αλλά διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε άλλα στάδια, όπως αυτό της ωρίμανσης, λιπόλυσης και πρωτεόλυσης του τυριού. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η δευτερεύουσα μικροβιακή χλωρίδα αποτελείται από βακτήρια που δεν είναι βακτήρια εκκίνησης αλλά αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό κάθε τυριού. Τέλος η διαμόρφωση του τελικού προϊόντος τόσο στη περίπτωση της φέτας όσο και στα υπόλοιπα είδη τυριών, στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των γαλακτικών βακτηρίων εκκίνησης (SLAB) και δευτερεύουσας μικροβιακής χλωρίδας (NSLAB) (Tzora et al., 2021, Rantsiou et al., 2008).

1.5 Γαλακτικά Βακτήρια (LAB)

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι θετικά κατά Gram και προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά στην καταλάση και μη σπορογόνα. Το κοινό χαρακτηριστικό των γαλακτικών βακτηρίων είναι η ικανότητά τους να μεταβολίζουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ είτε μέσω ομοζυμωτικής είτε μέσω ετεροζυμωτικής ζύμωσης. Επίσης διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων και ιδιαίτερα στην παραγωγή τυριών όπως η φέτα. Ανάλογα με το στάδιο παραγωγής της φέτας επικρατεί διαφορετικό είδος γαλακτικών βακτηρίων καθώς σε κάθε στάδιο ποικίλουν οι συνθήκες, η διάρκεια, το περιβάλλον και πολλοί άλλοι σημαντικοί παράγοντες που ευνοούν ένα είδος και περιορίζουν κάποιο άλλο (König and Fröhlich, 2017, Axelsson and Ahrné, 2000).

Συγκεκριμένα υπάρχουν δύο κατηγορίες γαλακτικών βακτηρίων. Τα γαλακτικά βακτήρια εκκίνησης (SLAB) τα οποία συμμετέχουν στο στάδιο της ζύμωσης και είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα γαλακτικά βακτήρια που δεν έχουν την δυνατότητα εκκίνησης (NSLAB) τα οποία κυριαρχούν στο στάδιο της ωρίμανσης και στερούνται τη δυνατότητα ζύμωσης της λακτόζης (Settani and Moschetti, 2010).

Στην κατηγορία των SLAB ανήκουν τα γένη *Lactococcus spp*, *Leuconostoc spp*, *Streptococcus spp*, *Lactobacillus spp* ενώ στην κατηγορία των NSLAB κυριαρχούν στα ετεροζυμωτικά είδη ο *Lactobacillus fermentum* και ο *Lactobacillus brevis* ενώ στα ομοζυμωτικά είδη κυριαρχούν ο *Lactobacillus casei*, ο *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* και ο *Lactobacillus pentosus* (Settani and Moschetti, 2010, Mattila and Saarela, 2003).

Τέλος, τα SLAB κατά την έναρξη του σταδίου της ωρίμανσης είναι σε υψηλούς πληθυσμούς που αγγίζουν περίπου τους 10^8 - 10^9 cfu/g, αλλά μειώνονται κατά το τέλος αυτού του σταδίου. Στον αντίποδα, τα NSLAB ακολουθούν την αντίθετη πορεία καθώς στην αρχή ανιχνεύονται σε μικρούς πληθυσμούς ακολουθώντας όμως αυξητική τάξη και σημειώνοντας μεγάλους πληθυσμούς μετά την ολοκλήρωση των 3-4 μηνών. Τέλος δεν μπορεί να παραληφθεί το γεγονός ότι τα NSLAB είναι τελικά αυτά που καθορίζουν την ποιότητα και συνεπώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτα αλλά και όλων των τυριών (Settani and Moschetti, 2010).

1.6 Ζύμες και μύκητες στην φέτα

Τα τυροκομικά προϊόντα, όπως και η φέτα, αποτελούν οικοσυστήματα ευνοϊκά για την ανάπτυξη μυκήτων, ζυμών αλλά και πολλών βακτηρίων (Zheng et al., 2021). Είναι ευρέως γνωστό ότι οι ζύμες είναι αρκετά ανθεκτικές στα υψηλά επίπεδα οξέος και αλατιού καθώς επίσης έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τα SLAB βακτήρια και αμμωνία (NH_3) από τα αμινοξέα (Zheng et al., 2021, Hayaloglu, 2015). Το πλήθος αλλά και το είδος των ζυμών και μυκήτων που αναπτύσσονται στην επιφάνεια ενός τυριού εξαρτάται άμεσα από το μικροβιακό φορτίο του αρχικού γάλακτος (μη παστεριωμένου), την θερμική επεξεργασία που θα υποβληθεί το γάλα, την υγρασία κατά το στάδιο της ωρίμανσης, το ποσοστό αλατιού (NaCl) που θα προστεθεί είτε στο τυρί είτε στην άλμη του καθώς και από το επίπεδο επιμόλυνσης κατά το στάδιο της παραγωγής (Zheng et al., 2021, Hameed, 2016).

Οι ζύμες και οι μύκητες αναπτύσσονται στην επιφάνεια των λευκών μαλακών τυριών. Στην φέτα, από πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν, αποδείχθηκε ότι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* βρίσκεται σε αφθονία στην επιφάνειά της. Όμως, δεν είναι ο μοναδικός του οποίου η ανάπτυξη ευνοείται στο περιβάλλον της φέτας, καθώς η μικροβιακή της χλωρίδα αποτελείται επίσης και από τις ζύμες *Debaryomyces hansenii*, *Pichia farinosa*, *Candida versatilis* και *Kluyveromyces marxianus*. Τέλος οι ζύμες και οι μύκητες σε συνδυασμό με την υπόλοιπη μικροβιακή βακτηριακή χλωρίδα της φέτας συμβάλλουν στην διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης καθώς και στην πραγματοποίηση της πρωτεόλυσης, διαδικασία καίρια για την ανάπτυξη σημαντικών αμινοξέων και πεπτιδίων για το άρωμα του τυριού (Hayaloglu, 2015).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι εκτός της θετικής συμβολής των ζυμών και μυκήτων στα τυροκομικά προϊόντα όπως είναι και η φέτα η παρουσία τους σε μεγαλύτερους πληθυσμούς από τους επιτρεπόμενους μπορούν να προκαλέσουν δυσάρεστες συνέπειες στα προϊόντα. Τέτοια φαινόμενα είναι η ανάπτυξη δυσάρεστης οσμής και γεύσης, το μαλάκωμα της υφής, η αλλαγή του χρώματος της επιφάνειας καθώς και η παραγωγή αερίου που οδηγεί σε παραμόρφωση του περιέκτη (Hameed, 2016, Hayaloglu, 2015). Σε πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο ΠΟΠ τυρί φέτα βρέθηκαν πολλά μεταβολικά προϊόντα ακατάλληλα και επιζήμια για τον καταναλωτή μεταξύ αυτών και οι μυκοτοξίνες των οποίων η κατανάλωση μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα υγείας στον καταναλωτή (Hameed, 2016).

1.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση της φέτας

Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη μικροοργανισμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα και κατ' επέκταση στην φέτα, επηρεάζονται άμεσα και έμμεσα από πολλούς παράγοντες, είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς (Cenci-Coga, 2012, Fox and Cogan, 2004). Με τον όρο ενδογενείς παράγοντες εννοείται το σύνολο των φυσικών χαρακτηριστικών του τροφίμου λόγω χάρη τα θρεπτικά χαρακτηριστικά, η οξύτητα (pH), η ενεργότητα του νερού (a_w), οι αντιμικροβιακοί παράγοντες κ.α. ενώ στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνονται οι συνθήκες του περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία και η συσκευασία (Fox and Cogan, 2004).

1.7.1 Οξύτητα (pH)

Το pH είναι ένας από τους καταλυτικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ένα περιβάλλον και κατ' επέκταση στην φέτα (Kamarinou et al., 2023, James M. Jay et al., 2005). Είναι ευρέως γνωστό ότι το pH το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι περίπου το 6,6-7,5 (James M. Jay et al., 2005). Δεδομένου όμως ότι η φέτα είναι ένα όξινο τρόφιμο με pH που κυμαίνεται κοντά στο 4,4-4,9, ανάλογα με το στάδιο παραγωγής της, αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο και φυσική αυτοπροστασία αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών και παρατείνοντας την διάρκεια ζωής της φέτας (Kamarinou et al., 2023). Τέλος τα γαλακτικά βακτήρια τα οποία κυριαρχούν στην φέτα συμβάλουν στην παραγωγή οργανικών οξέων τα οποία μειώνουν τις τιμές του pH διαμορφώνοντας όμως έτσι τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της, όπως το άρωμα και η υφή (Kamarinou et al., 2023, Sarantinopoulos et al., 2001).

1.7.2 Ενεργότητα νερού (a_w)

Η ενεργότητα του νερού αντιπροσωπεύει γενικά το ποσοστό του μη δεσμευμένου από τα μόρια του τροφίμου νερού. Είναι ένας από τους κρίσιμότερους παράγοντες που συμβάλουν στην χημική, ενζυμική και μικροβιολογική σταθερότητα ενός τροφίμου. Γενικά με τον όρο ενεργότητα νερού ορίζεται ο λόγος της τάσης των ατμών του διαλύματος προς την τάση ατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία ($a_w = p/p_0$). Συνήθως η ενεργότητα νερού των περισσότερων τροφίμων κυμαίνεται περίπου στα 0,99, ποσοστό που επηρεάζεται άμεσα από πολλούς παράγοντες (James M. Jay et al., 2005). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα βακτήρια απαιτούν για την ανάπτυξή τους

μεγαλύτερα ποσοστά ενεργότητας νερού από ότι οι ζύμες και οι μύκητες και συγκεκριμένα τα Gram⁻ έχουν μεγαλύτερες απαιτήσεις από τα Gram⁺ (Νυχάς, 2018). Η φέτα όπως και όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι πλούσια σε υγρασία και σημειώνει υψηλά ποσοστά ενεργότητας νερού. Αξίζει να σημειωθεί ότι η φέτα είναι πιθανόν να παρουσιάζει αυξομειώσεις στα ποσοστά της ενεργότητας νερού κατά το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του οποίο οφείλεται κυρίως στην δημιουργία πεπτιδικών δεσμών και νέων ιονικών ομάδων εξαιτίας της αλληλεπίδρασης της φέτας με την περιβαλλόμενη άλμη (Sarantinopoulos et al., 2001).

1.7.3 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση και την ασφάλεια των ευπαθών προϊόντων (Koutsoumanis et al., 2006). Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών γεγονός το οποίο εγκυμονεί τον κίνδυνο επιτάχυνσης της μικροβιακής ανάπτυξης και αλλοίωσης (Ross and Nichols, 2014). Θερμοκρασίες συντήρησης πάνω από τις προβλεπόμενες καθίστανται επιζήμιες για την ποιότητα και την ασφάλεια του προϊόντος, καθώς οι θερμοκρασίες που αποθηκεύονται τα τρόφιμα επηρεάζουν όλες τις φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση το τελικό μικροβιολογικό φορτίο του τροφίμου (Turner, 2010). Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και ο κάθε μικροοργανισμός ξεχωριστά έχει μια συγκεκριμένη ελάχιστη, άριστη και μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης οι οποίες είναι αναγκαίο να είναι γνωστές σε περιπτώσεις που απαιτείται η παρεμπόδιση της ανάπτυξής του μικροοργανισμού στόχου (Ross and Nichols, 2014). με τις παραπάνω τρεις σημαντικές θερμοκρασίες οι μικροοργανισμοί κατατάσσονται σε θερμόφιλους, μεσόφιλους, ψυχρόφιλους και ψυχρότροφους (Doulgeraki et al., 2012).

Θερμόφιλοι είναι οι μικροοργανισμοί όπου η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 55-75°C (Πανεπιστημιακές σημειώσεις ΓΠΑ, Μικροβιολογία Τροφίμων Ι). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ο *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharoliticum* (Tyurin et al., 2006, Flint et al., 2001). Μεσόφιλοι είναι οι μικροοργανισμοί όπου έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C ενώ δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης (-1°C - 5°C) (Πανεπιστημιακές σημειώσεις ΓΠΑ, Μικροβιολογία Τροφίμων Ι). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι περισσότεροι παθογόνοι και αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί όπως είναι ο *Staphylococcus aureus* (Adam and Moss, 2008). Πρέπει να τονιστεί ότι οι τοξίνες των μεσόφιλων παθογόνων

μπορεί να παράγονται σε θερμοκρασίες διαφορετικές των άριστων θερμοκρασιών των αντίστοιχων μικροοργανισμών. Στη κατηγορία των ψυχρόφιλων ανήκουν οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες κάτω των 0°C με ελάχιστη θερμοκρασία τους -10°C. Τέλος η τελευταία κατηγορία μικροοργανισμών είναι οι ψυχρότροφοι με θερμοκρασίες ανάπτυξης -5°C έως 6°C με μέγιστη τιμή αυτή των 25°C. Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι και οι σημαντικότεροι καθώς έχουν την δυνατότητα να προκαλούν αλλοίωση ακόμη και υπό συνθήκες ψύξης (Πανεπιστημιακές σημειώσεις ΓΠΑ, Μικροβιολογία Τροφίμων Ι).

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ(°C)

ΕΙΔΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΗ	ΑΡΙΣΤΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ
ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ	40 - 45	55 - 75	60 - 90
ΜΕΣΟΦΙΛΟΙ	5 - 15	30 - 40	40 - 47
ΨΥΧΡΟΦΙΛΟΙ	-5 έως +5	12 - 15	15 - 20
ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΟΙ	-5 έως +5	25 - 30	30 - 35

Πίνακας 1.2 Κατηγορίες μικροοργανισμών ανάλογα με την θερμοκρασία ανάπτυξης (ICSF, 1980)

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την μικροβιολογία αποτελούν οι μεσόφιλοι και οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί (Adam and Moss, 2008). Τα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία είναι η κύρια αλλοιογόνος μικροχλωρίδα της φέτας, είναι κυρίως μεσόφιλοι με θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40°C (Settani and Moschetti, 2010). Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι εκτός από τα βακτήρια των οποίων η ανάπτυξη επηρεάζεται άμεσα από την θερμοκρασία συντήρησης, οι ζύμες και οι μύκητες εμφανίζουν τεράστιο τεχνολογικό ενδιαφέρον για τις αλλοιώσεις που μπορούν να προκαλέσουν στην φέτα αλλά και γενικά στα διάφορα προϊόντα δεδομένου ότι αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών αλλά απαιτούν κυρίως την ύπαρξη οξυγόνου για την ανάπτυξή τους. Ορισμένα σημαντικά γένη μυκήτων που μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση στα τρόφιμα είναι τα *Rhizopus*, *Mucor*, *Byssoschlamys* *Fusarium* (Silva et al., 2016).

1.7.4 Συσκευασία

Η συσκευασία του τροφίμου είναι ένας από τους εξωγενείς παράγοντες αλλοίωσης. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι αποτελεί μείζον παράγοντα στην προστασία του τροφίμου αλλά και στον έλεγχο της μικροβιολογικής του σταθερότητας επηρεάζοντας σε ύψιστο βαθμό την αποδοχή του προϊόντος από το καταναλωτικό κοινό (Robertson G. L., 2010).

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες συσκευασίας οι οποίες χρησιμοποιούνται προκειμένου να εξασφαλιστεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα και να διατηρηθεί η φρεσκότητα του τροφίμου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα είδη συσκευασιών που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι:

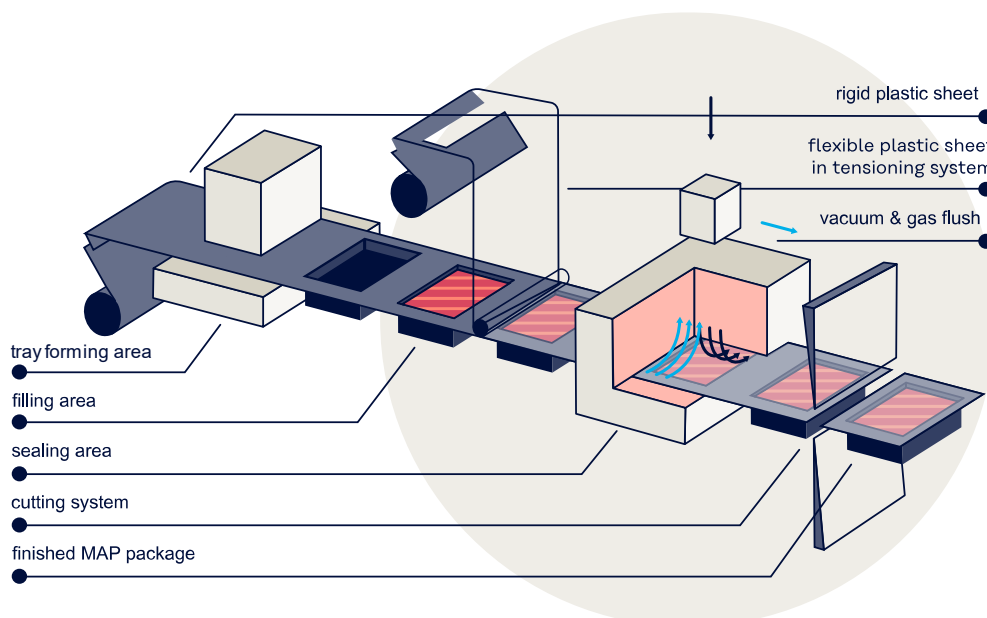
- Συσκευασία κενού (Vacuum packaging)
- Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified atmosphere packaging)
- Συσκευασία ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (Controlled Atmosphere packaging) (Νυχάς, 2018).

Συσκευασία κενού (vacuum pack) είναι η κατηγορία συσκευασίας κατά την οποία αφαιρείται ο αέρας από το εσωτερικό της συσκευασίας με την βοήθεια ειδικού κλειστικού μηχανήματος και ακολουθείται η συρραφή της. Με την μέθοδο αυτή μειώνεται η πίεση του αέρα στο εσωτερικό της συσκευασίας από 1 bar (σε κανονικές συνθήκες) σε 0,3-0,4 bar περίπου, συνεπάγοντας την απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του οξυγόνου (O_2) από το εσωτερικό. Η μέθοδος αυτή αποτρέπει την συρρίκνωση του τροφίμου, την οξείδωση των λιπών, τον αποχρωματισμό ή την δυσχρωμία και την εξάτμιση του απαραίτητου για το τρόφιμο νερού (Patil et al., 2019, Jay et al., 2005). Για τους λόγους αυτούς η πλαστική αεροστεγής συσκευασία vacuum pack χρησιμοποιείται ευρέως από της γαλακτοβιομηχανίες για την συσκευασία μικρών ποσοτήτων τυριού φέτας καθώς είναι εύχρηστες και ασφαλείς για το καταναλωτικό κοινό (Alexopoulos et al., 2011, Patil et al., 2019).



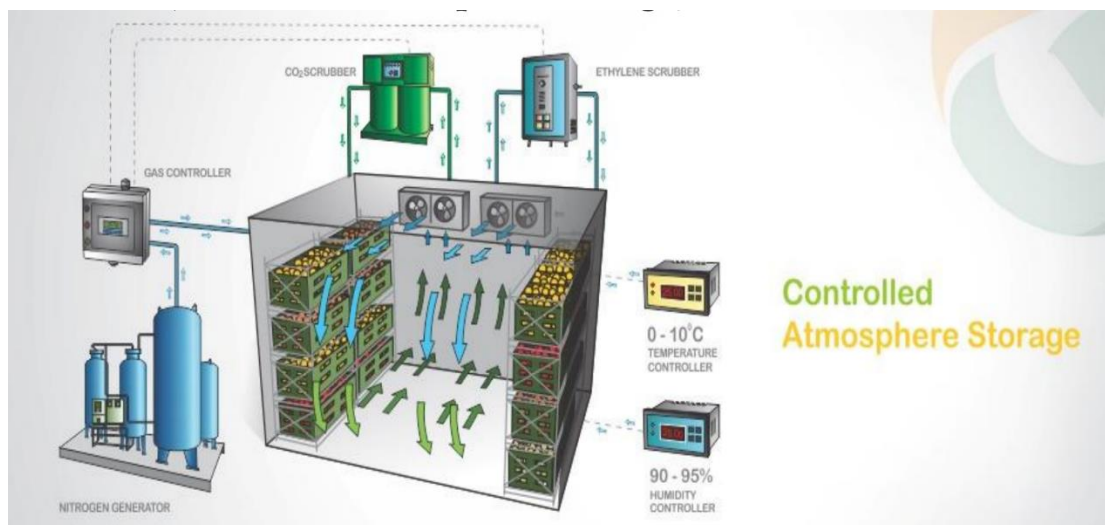
Εικόνα 1. Αεροστεγής πλαστική συσκευασία κενού φέτας (vacuum pack)
(https://www.362grocery.com/p/dodoni-feta-vacuum-200-gr_SK-001817)

Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) νοείται η υποκατάσταση του αέρα με ένα αέριο ή μείγμα αερίων. Προκειμένου να επιτευχθεί μία MAP συσκευασία αφαιρείται ο περιεχόμενος αέρας από την συσκευασία του τροφίμου και στην συνέχεια εισάγεται άλλου είδους αέριο ή μείγμα αερίων ανάλογα με το είδος του τροφίμου. Τα ενδεικτικά αέρια που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη αυτής της συσκευασίας είναι το οξυγόνο (O_2), το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), το άζωτο (N_2) καθώς και άλλα ευγενή αέρια όπως το αργό (Ar), το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και το διοξείδιο του θείου (SO_2) (Gorris and Peppelenbos, 1992). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι αλλαγές στην σύνθεση των αερίων εξαρτώνται από το ρυθμό αναπνοής του τροφίμου και την διαπερατότητα της μεμβράνης (Νυχάς, 2018, Jay et al., 2005). Η συσκευασία MAP μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία τεράστια ποικιλία προϊόντων, νωπών και μη, καθώς δεν λείπουν από τις κατηγορίες αυτές τα γαλακτοκομικά προϊόντα και συγκεκριμένα η φέτα (Νυχάς, 2018, Barukcic et al., 2020).



Εικόνα 2. Διαδικασία επίτευξης τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP)
(<https://www.packaging.kuraray.eu/blog/modified-atmosphere-packaging/>)

Η Συσκευασία ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (Controlled Atmosphere packaging) αποτελεί μια υποκατηγορία της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιράς με την με την διαφορά ότι η σύνθεση των αερίων της συσκευασίας παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια αποθήκευσης (Νυχάς, 2018, Jay et al., 2005). Η συσκευασία CAP απαιτεί διαφορετικά υλικά συσκευασίας από αυτά των υπόλοιπων συσκευασιών με τα φύλλα αλουμινίου, το γυαλί και το μέταλλο να κυριαρχούν ως οι καταλληλότεροι περιέκτες.



Εικόνα 3. Διαδικασία δημιουργίας συσκευασίας ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (CAP)
(<http://www.agroripe.com/controlled-atmosphere-storage/>)

1.8 Αλλοιώσεις και ποιοτικά προβλήματα φέτας

Είναι γνωστό ότι τα λευκά τυριά άλμης στα οποία ανήκει η φέτα ωριμάζουν και διατηρούνται μέσα στην άλμη γεγονός που χρίζει τεράστιας προσοχής για την διατήρηση των επιθυμητών χαρακτηριστικών και την αποφυγή προβλημάτων (Papavasiliou et al., 2019). Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα από τα πιο συχνά προβλήματα που εμφανίζονται στην φέτα η οποία αν και αρκετά σταθερό ποιοτικά προϊόν μπορεί να εμφανίσει ορισμένες αλλοιώσεις.

1) Σχοίνιασμα: είναι ένα συχνό πρόβλημα το οποίο επηρεάζει κυρίως την άλμη και όχι την φέτα και τα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το οργανοληπτικό αυτό πρόβλημα δεν αποτελεί κίνδυνο για την ασφάλεια των καταναλωτών. Κατά το σχοίνιασμα, λόγω της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών από μεσόφιλα ή θερμόφιλα γαλακτικά βακτήρια, αυξάνεται το ιώδες της άλμης χωρίς να αλλοιώνεται όμως το προϊόν (Papavasiliou et al., 2019).

2) Πρώιμο φούσκωμα ή ψύλλισμα: είναι το φαινόμενο κατά το οποίο η φέτα αποκτά πολύ μαλακή υφή σαν σφουγγαριού και η συσκευασία συχνά παρουσιάζει ένα φούσκωμα-εξόγκωμα από την παραγωγή αερίων. Συνήθεις αιτίες είναι η επιμόλυνση μετά την παστερίωση με ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια ικανά να παράξουν αέρια και να διογκώσουν την συσκευασία, η ελλιπής παστερίωση με

αντίκτυπο την διατήρηση στην φέτα μικροβιολογικό φορτίο ικανό να προκαλέσει αλλοίωση (Papavasiliou et al., 2019, Y. H. Hui, 2012).

3) Πίκρισμα ή πικρή μετάγευση: είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο το οποίο μπορεί να προκληθεί από έλλειψη αλατιού, προσθήκη μεγάλης ποσότητας χλωρίου και ασβεστίου στην πυτιά αλλά και στην μη αλλαγή άλμης τα οποία έχουν ως απότοκο την αλλοίωση της γεύσης της φέτας (Papavasiliou et al., 2019).

4) Εμφάνιση μούχλας: είναι ένα αρκετά σπάνιο φαινόμενο στην φέτα δεδομένου ότι η μούχλα εμφανίζεται επιφανειακά και προϋποθέτει το τυρί να βρίσκεται για αρκετό χρονικό διάστημα έξω από την άλμη. Εάν η φέτα είναι ολοκληρωτικά και συνεχόμενα στην άλμη μέσα στην συσκευασία το φαινόμενο αυτό είναι αδύνατον να προκληθεί. Το σημαντικότερο απότοκο αυτού του φαινομένου είναι η παραγωγή μυκοτοξινών, όχι αφλατοξίνης M₁, οι οποίες εγκυμονούν κινδύνους για την ασφάλεια και την υγεία των καταναλωτών (Y. H. Hui, 2012).

1.9 Προσβολές παθογόνων μικροοργανισμών στην φέτα

Από μικροβιολογικής άποψης, η ποιότητα της φέτας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την διαδικασία παραγωγής της αλλά και την ποιότητα των πρώτων υλών (Barbaros et al., 2014). Το γάλα, ως η κύρια πρώτη ύλη της φέτας, παίζει καθοριστικό ρόλο στην διαμόρφωση της τελικής ποιότητας και ασφάλειας του τυριού καθώς το αρχικό μικροβιολογικό φορτίο, οι επεξεργασίες που επιδέχεται, η αποτελεσματικότητα αυτών καθώς αλλά και η εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων υγιεινής συμβάλουν συνολικά στην διαμόρφωση της ποιότητάς του αλλά και στην παραγωγή προϊόντων με τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Zottola & Smith, 1993). Η χρήση πλέον παστεριωμένου γάλακτος έχει συνδράμει αρκετά στην εξάλειψη πολλών κινδύνων που θα μπορούσαν να προκληθούν από τους προαναφερόμενους παράγοντες αλλά και τροφιμογενών ασθενειών που θα μπορούσαν να κλονίσουν την υγεία των καταναλωτών (Barbaros et al., 2014).

Είναι σημαντικό να τονιστεί όμως ότι η ανεπαρκής θερμική επεξεργασία στο νωπό γάλα που θα χρησιμοποιηθεί μεταγενέστερα για την παραγωγή τυριού φέτας μπορεί να συνδράμει στην επιβίωση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών εγκυμονώντας μελλοντικά άλλους σημαντικούς κινδύνους (Mauropoulos and Arvanitoyannis, 1999). Οι τροφιμογενείς ασθένειες προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμου το οποίο έχει

επιμολυνθεί με βακτήρια, ιούς, τοξίνες, παράσιτα και οποιοδήποτε άλλο παράγοντα, εγκυμονώντας κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών (Zottola and Smith, 1991).

Τα βακτήρια που μπορούν να βρεθούν στην φέτα κυρίως προέρχονται από το γάλα το οποίο είτε μπορεί να ήταν κακής ποιότητας και υψηλού μικροβιολογικού φορτίου είτε λόγω επιβίωσης της θερμικής επεξεργασίας (Mauropoulos and Arvanitoyannis, 1999). Τα βακτήρια αυτά είναι ικανά να προκαλέσουν αλλοιώσεις όπως φούσκωμα της συσκευασίας κυρίως λόγω της παραγωγής αερίων ή να επηρεάσουν την υφή της φέτας προκαλώντας ανεπιθύμητο μαλάκωμα. Τα παθογόνα βακτήρια που μπορούν να επικρατήσουν στην φέτα είναι *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes* (Pexara et al., 2012, Bozkurt and Erkmen, 2001, Papageorgiou and Marth, 1989).

Η επικράτησή τους επηρεάζεται από διάφορους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες με κυριότερους την θερμοκρασία και το pH. Σημαντικές είναι και οι προσβολές από τις ζύμες και τους μύκητες στην φέτα οι οποίοι αν και δεν είναι η επικρατέστερη μικροβιακή χλωρίδα είναι ικανοί να προκαλέσουν σημαντικές αλλοιώσεις. Είναι γνωστό ότι οι μύκητες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στον σχηματισμό των επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της φέτας (Barbaros et al., 2014). Όμως η επικράτηση μη επιθυμητών μυκήτων σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες μπορούν να υποβαθμίσουν το προϊόν δίνοντάς του μια μη επιθυμητή μαλακή υφή, σχηματισμό κίτρινου χρώματος αλλά και αποβολή αερίων και διόγκωση της συσκευασίας (Hammed, 2016, Barbaros et al., 2014). Τέλος οι ζύμες και οι μύκητες έχουν την ικανότητα να αυξάνουν το pH της άλμης της φέτας και αυτό αποτελεί ευνοϊκή συνθήκη για την ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιογόνων βακτηρίων στην επιφάνεια της φέτας (Barbaros et al., 2014).

1.9.1 *Listeria monocytogenes*

Το γένος *Listeria*, ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae*, η οποία περιλαμβάνει 21 αναγνωρισμένα είδη και 6 υποείδη. Μεταξύ αυτών μόνο η *Listeria monocytogenes* είναι τροφιμογενές παθογόνο για τον άνθρωπο (Ricci et al., 2022). Είναι ευρέως γνωστό ότι η *Listeria monocytogenes* είναι ένα παθογόνο, μη σπορογόνο βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο και θετικό κατά Gram. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 1.1°C μέχρι και 45°C, σε ενεργότητα νερού (a_w) μεγαλύτερη από 0.97, σε τιμές pH 4.4 έως 9,40 καθώς επίσης είναι αρκετά ανθεκτική στα υψηλά

ποσοστά αλατότητας. Ιδανικά η άριστη ανάπτυξη του βακτηρίου γίνεται σε συνθήκες μέτριας αλατότητας (6,5%) ενώ μπορεί να αναπτυχθεί ακόμη και σε συγκέντρωση 10-12% χλωριούχου νατρίου (Engstrom et al., 2020, Montville and Matthews, 2005, Larson et al., 1999, Mitchell et al., 1996).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός η ψύξη δεν μειώνει το μέγεθός του βακτηριακού πληθυσμού αλλά θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50°C θα μπορούσαν να επιφέρουν θανάτωση του βακτηρίου (Montville and Matthews, 2005).

Τέλος πολλές πειραματικές μελέτες εστίασαν στην διάρκεια ζωής του βακτηρίου, από το στάδιο της παραγωγής έως και το στάδιο της κατανάλωσης ενός τροφίμου, υπό συνθήκες ψύξης. Οι έρευνες απέδειξαν ότι το βακτήριο επιβιώνει έως και 45 ημέρες ενώ άλλα πειράματα υπό διαφορετικές συνθήκες απέδειξαν διάστημα έως και 60 ημερών. Τα ευρήματα τονίζουν την αναγκαιότητα εφαρμογής σχολαστικών ελέγχων και αναλύσεων έως και την στιγμή της κατανάλωσης (Engstrom et al., 2020, A.E. Larson et al., 1999, Mitchell et al., 1996).

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν, η *Listeria monocytogenes* θεωρείται από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα με μεγάλη ικανότητα επιβίωσης στο ατμοσφαιρικό περιβάλλον και αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα της λιστερίωσης, μιας πολύ σοβαρής και συχνά απειλητικής για την ζωή του ανθρώπου ασθένειας. Η *Listeria monocytogenes* έχει μεγάλη ικανότητα προσαρμογής σε αντίξοες συνθήκες και το χαρακτηριστικό της αυτό εγκυμονεί αναρίθμητους κινδύνους ανάπτυξής της σε ένα τρόφιμο καθώς και επιμόλυνσης κάποιου άλλου (Angelidis et al., 2010).

Τέλος, η *Listeria monocytogenes* εξαιτίας του γεγονότος ότι αναπτύσσεται ταχύτατα σε περιβάλλοντα με υψηλή σχετική υγρασία και ενεργότητα νερού (a_w), ευνοείται η ανάπτυξή της σε εργοστάσια γαλακτοκομικών προϊόντων και κυρίως σε περιοχές όπως στο δάπεδο, στον εξοπλισμό, στα μηχανήματα, καθώς και σε οποιοδήποτε εξάρτημα έρχεται σε άμεση ή έμμεση επαφή με το τρόφιμο. Η ανάπτυξή της γίνεται σε μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (Larson et al., 1999). Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί απέδειξαν ότι η άλμη, μέσα στην οποία συντηρούνται πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα όπως και η φέτα, αποτελεί μεγάλη εστία μόλυνσης λόγω του γεγονότος ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της απαρτίζεται από νερό (Larson et al., 1999, Parageorgiou and

Marth, 1989). Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* υπό συνθήκες ψύξης γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξή της όχι μόνο σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως προαναφέρθηκε αλλά και σε ορισμένα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Ready To Eat) (Ricci et al., 2022, Angelidis et al., 2010).

1.10 Χρήση εδώδιμων μεμβρανών Αλγινικού Νατρίου (Sodium-Alginate edible film)

Το αλγινικό νάτριο είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που υπάρχει σε αφθονία στον πυθμένα της θάλασσας (Giannakas et al., 2023). Προέρχεται από καφέ φύκια, όπως *Macrocystis aeruginosa*, *pyrifer*, *Laminaria digitate*, *japonica* και *Sargassum*, και από αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όπως *Pseudomonas auroginosa* και *Azotobacter vinelandii* (Yan et al., 2023). Το αλγινικό νάτριο έχει ευρεία χρήση και εφαρμογές σε διαφορετικά πεδία λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων του. Από πειραματικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι το αλγινικό νάτριο αποτελεί:

- Παράγοντα αύξησης του ιξώδους
- Σταθεροποιητής
- Πηκτοματοποιητής
- Κύριο συστατικό για εδώδιμες μεμβράνες

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά του σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος και τοξικότητα συνέβαλλαν σταδιακά στην συμμετοχή του, όλο ένα και περισσότερο, στην συσκευασία τροφίμων (Yan et al., 2023, Parreidt et al., 2018). Η ανάγκη κάλυψης των όλο ένα και αυξανόμενων αναγκών του παγκόσμιου καταναλωτικού κοινού, σε συνδυασμό με την αναγκαιότητα εύρεσης υλικών συσκευασίας φιλικών προς το περιβάλλον, που η χρήση του να μειώνει το ενεργειακό και του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) αποτύπωμα, αποτέλεσε την κινητήρια δύναμη και την αιτία για την αναγκαία χρήση του αλγινικού νατρίου στην συσκευασία των τροφίμων (Yan et al., 2023, Giannakas et al., 2023, Dmitrenko et al., 2021). Οι εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου δίνουν την δυνατότητα ενσωμάτωσης επιπρόσθετων συστατικών που αυξάνουν τις τεχνολογικές τους ιδιότητες όπως, αντιμικροβιακούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες, συστατικά που επιβραδύνουν την οξειδωτική αμαύρωση και την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Parreidt et al., 2018).

Η παράταση της διάρκειας ζωής και η διατήρηση της φρεσκότητας των τροφίμων που επικαλύπτονται με τις μεμβράνες αλγινικού νατρίου έδωσε το έναυσμα για την εφαρμογή τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα και κυρίως σε τυριά όπου είναι αρκετά ευαλλοίωτα τρόφιμα (Giannakas et al., 2023, Costa et al., 2018). Το τυρί έχει πολυσύνθετη δομή και η διατήρηση της ποιότητάς του συνδέεται άρρηκτα με βιολογικές και βιοχημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν από το στάδιο της παραγωγής έως και την κατανάλωση. Το περιβάλλον των τυριών, όπως είναι και η φέτα, λόγω της υψηλής ενεργότητας νερού (a_w) ευνοεί την επιφανειακή ανάπτυξη ζυμομυκήτων, μούχλας και βακτηρίων που υποβαθμίζουν αρκετά την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου (Costa et al., 2018). Τέλος οι εδώδιμες μεμβράνες έχουν κερδίσει σημαντικό έδαφος στην επικάλυψη τυριών με αυτές λόγω του γεγονότος ότι διατηρούν επιθυμητά την φρεσκότητα, την θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά καθώς επίσης επειδή εύκολα αποσπώνται από το τυρί ή καταναλώνεται μαζί με αυτό αποφεύγοντας την δημιουργία απορριμμάτων (Giannakas et al., 2023, Costa et al., 2018).

1.11 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) είναι μια οπτική τεχνική ανάλυσης και ειδικότερα μια φασματοσκοπική τεχνική. Γενικά οι φασματοσκοπικές τεχνικές στηρίζονται στην ικανότητα διαφόρων ουσιών να εκπέμπουν ή να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων και στην μέτρηση φασμάτων (Πολυσίου και Ταραντίλης, 2008). Οι φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν εκτός του γεγονότος ότι είναι ταχείες και εξαιρετικά εύχρηστες χρησιμοποιούνται ευρέως στον προσδιορισμό τόσο της δομής αλλά και της καθαρότητας χημικών ενώσεων.

Το υπέρυθρο διακρίνεται σε τρεις περιοχές:

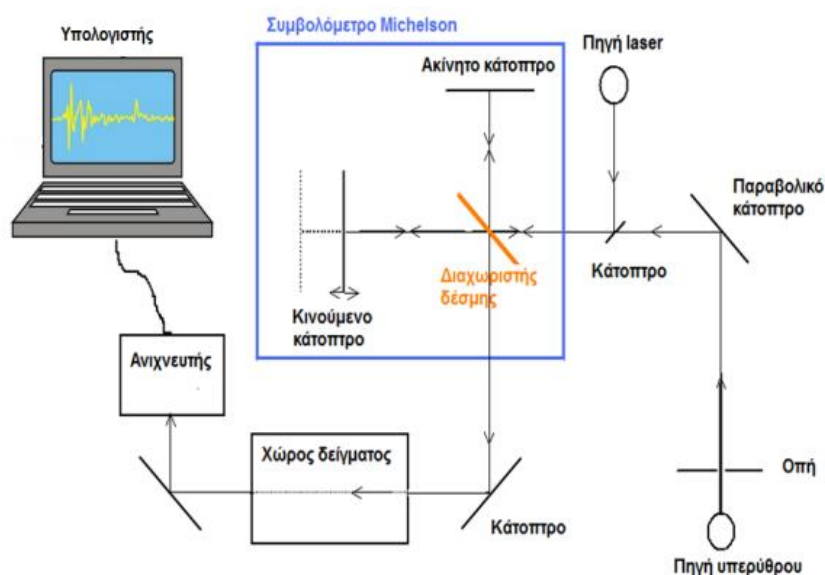
- Εγγύς υπέρυθρο: 0,8 μ m-2 μ m
- Κυρίως υπέρυθρο: 2 μ m-15 μ m
- Άπω υπέρυθρο: 15 μ m-400 μ m (Πολυσίου και Ταραντίλης, 2008)

Η αρχή λειτουργίας της φασματοσκοπίας υπερύθρου είναι η απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Ειδικότερα, το μόριο απορροφά ενέργεια $\Delta E = h\nu$ από πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR), που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I , σε κάθε δονητική μετάβαση. Η κάθε διέλευση συνήθως εκφράζεται με

ποσοστό επι τοις 100% και παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 100%. Ορισμένες χαρακτηριστικές ομάδες (καρβοξύλιο, αμινοομάδα, διπλοί και τριπλοί δεσμοί κ.α) δίνουν μοριακές ταλαντώσεις εξαιρετικά χαρακτηριστικές για αυτό και η φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιείται για των ομάδων αυτών σε ένα μόριο. Σε ένα φάσμα FT-IR διακρίνονται δύο περιοχές, η περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων και η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η πρώτη περιοχή περιλαμβάνει φάσματα $4000-1400\text{ cm}^{-1}$ και η απορρόφηση οφείλεται στη δόνηση των δεσμών των χαρακτηριστικών ομάδων. Η δεύτερη περιοχή περιλαμβάνει φάσματα $1400-1600\text{ cm}^{-1}$ και οι απορροφήσεις σχετίζονται με απορροφήσεις ολόκληρου του μορίου, όπου κάθε μόριο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και διαμορφώνει το τελικό <δακτυλικό αποτύπωμα> της κάθε ένωσης (Subramanian and Rodriguez, 2009, Πολυσίου και Ταραντίλης, 2008).

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο FT-IR περιλαμβάνει τα εξής μέρη:

- ο Την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας
- ο Την πηγή λέιζερ
- ο Το συμβολόμετρο Michelson
- ο Την υποδοχή του δείγματος
- ο Τον ανιχνευτή
- ο Τον υπολογιστή
- ο Τα κάτοπτρα



Εικόνα 4. Οργανολογία FT-IR (Πολυσίου και Ταραντίλης, 2008)

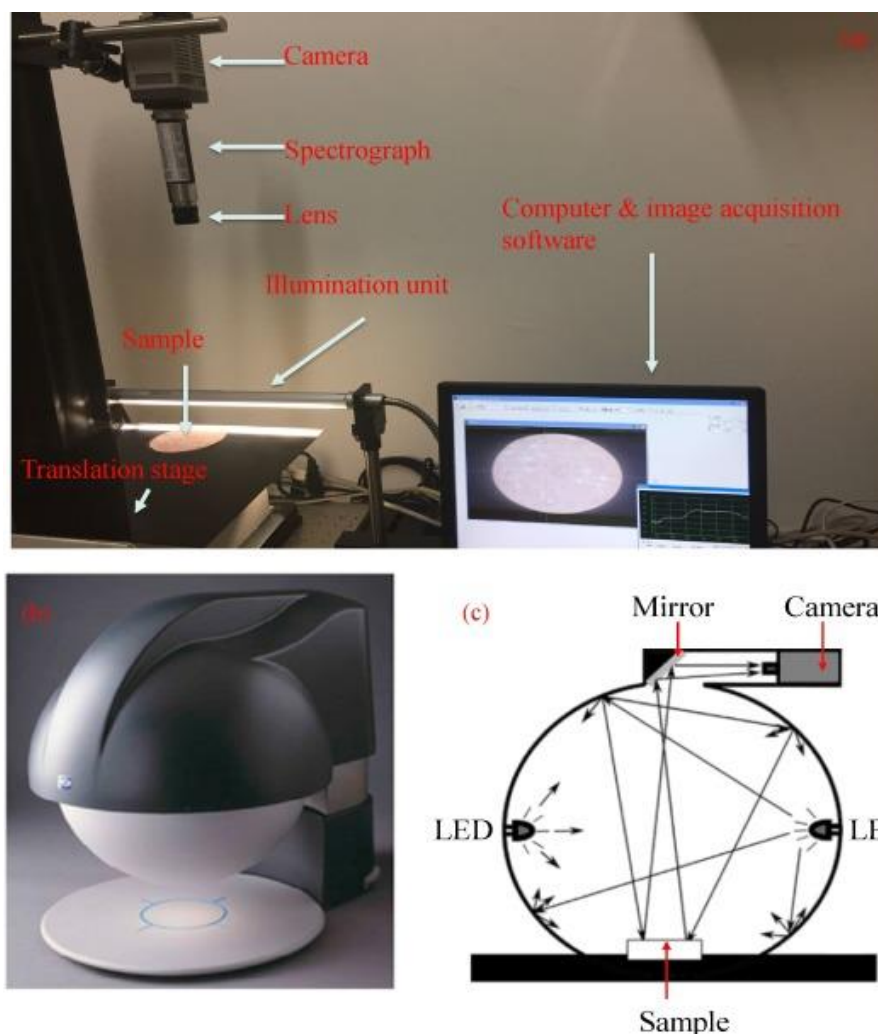
Τα φασματοφωτόμετρα έχουν συγκεκριμένη αρχή λειτουργίας. Αρχικά, η πηγή εκπέμπει την υπέρυθρη ακτινοβολία και μέσω του παραβολικού κατόπτρου προσπίπτει στον διαχωριστή δέσμης. Εκεί η ακτινοβολία διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, η μία εκ των οποίων τον διαπερνά και προσπίπτει στο κινούμενο κάτοπτρο και η άλλη δέσμη οδηγείται προς το ακίνητο κάτοπτρο. Και οι δύο οι δέσμες επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της συμβολής. Αποτέλεσμα του φαινομένου αυτό είναι η δημιουργία μιας τρίτης δέσμης (Subramanian and Rodriguez, 2009). Καθυστέρηση ονομάζεται το διπλάσιο της διαφοράς των δύο κατόπτρων και συμβολίζεται με το γράμμα δ . Ανάλογα με την τιμή που παίρνει το δ το σ παίρνει την μέγιστη ή την ελάχιστη τιμή. Οι δέσμες ακτινοβολίας που εκπέμπονται από την πηγή δημιουργούν ένα περίπλοκο σήμα (τρίτη δέσμη) και μέσω του κατόπτρου εισέρχονται στον χώρο που βρίσκεται το σήμα. Τότε το δείγμα, λόγω της αύξησης της ταλάντωσης των δεσμών του, απορροφά μόνο τις συχνότητες που οδηγούν σε αυξημένη ενεργειακή κατάσταση. Στην συνέχεια η τρίτη δέσμη εξέρχεται και κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή. Καθώς προσπίπτει στον ανιχνευτή, αυξάνει την θερμοκρασία του εξαιτίας της ενέργειας που μεταφέρει, η οποία αύξηση ονομάζεται διαφορά δυναμικού. Η μεταβολή αυτή μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό σήμα ώστε να μπορεί να αποτυπωθεί στην οθόνη. Τέλος ο μετασχηματισμός Fourier συμβάλει στην τελική απεικόνιση του φάσματος (Πολυσίου και Ταραντίλης, 2008).

1.12 Φασματοσκοπία με τη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)

Η φασματοσκοπία πολυφασματικής απεικόνισης ανήκει στις ταχείες τεχνικές και χρησιμοποιείται ευρέως για την παρακολούθηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων (Rorodi et al., 2014). Αποτελεί μία από τις λίγες φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους, που δεν καταστρέφει την ποιότητα και την ακεραιότητα του προϊόντος ενώ είναι μη τοξική για το ίδιο το προϊόν αλλά και για τον άνθρωπο (Nychas et al., 2016).

Η πολυφασματική απεικόνιση αποτελεί συνδυασμό της φασματοσκοπίας ορατού (Vis), της φασματοσκοπίας δονήσεων (NIR) και της υπολογιστικής όρασης (Computer Vision) (Rorodi et al., 2016). Κατά την εφαρμογή της φασματοσκοπίας ορατού, σημειώνονται μεταπτώσεις ηλεκτρονίων στα ενεργειακά επίπεδα του ατόμου ως αποτέλεσμα της ενέργειας της δέσμης φωτός που απορροφάται από την επιφάνεια του τροφίμου (Ebbing & Gammon, 2002). Ως αναφορά την φασματοσκοπία δονήσεων νοείται η μέθοδος κατά την οποία προσδιορίζεται η ενέργεια που απορροφάται από τα δονούμενα-περιστρεφόμενα μόρια κατά την εφαρμογή μιας δέσμης φωτός πάνω στο

υπό εξέταση δείγμα (Dufour, 2009). Το εύρος του φάσματος που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και ανάλυση των τροφίμων συνδέεται άρρηκτα με το είδος και την ποσότητα των δεσμών των μορίων που το αποτελούν. Δεδομένου ότι η πλειονότητα των δεσμών στα μόρια είναι του τύπου C-H (οργανικές ενώσεις), N-H (πρωτεΐνες, αμινοξέα), O-H (νερό, λίπος, υδατάνθρακες), το φάσμα που χρησιμοποιείται περισσότερο στις αναλύσεις είναι αυτό των 380-1000nm (Dufour, 2009, Gowen et al., 2015).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση ενός συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης (Videometer Lab) (Feng et al., 2017).

Σύμφωνα με την Εικόνα 5, ένα τυπικό σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης αποτελείται από την φωτεινή πηγή, τον αισθητήρα φωτός, τον φασματογράφο, την φωτογραφική μηχανή, τον μετατροπέα σήματος καθώς και τον υπολογιστή στον οποίο απεικονίζεται το αποτέλεσμα της εικόνας. (Feng et al., 2018). Προκειμένου να ληφθεί η τελική σωστή και επιθυμητή εικόνα του τροφίμου είναι αναγκαία η επεξεργασία της εικόνας έτσι ώστε να οριστεί η περιοχή ενδιαφέροντος (ROI), καθώς μπορεί να

περιλαμβάνει τον περιβάλλοντα χώρο, τμήμα του τρυβλίου καθώς και άλλα μη επιθυμητά μέρη και συστατικά (Ropodi et al., 2014, Daugaard et al., 2010).

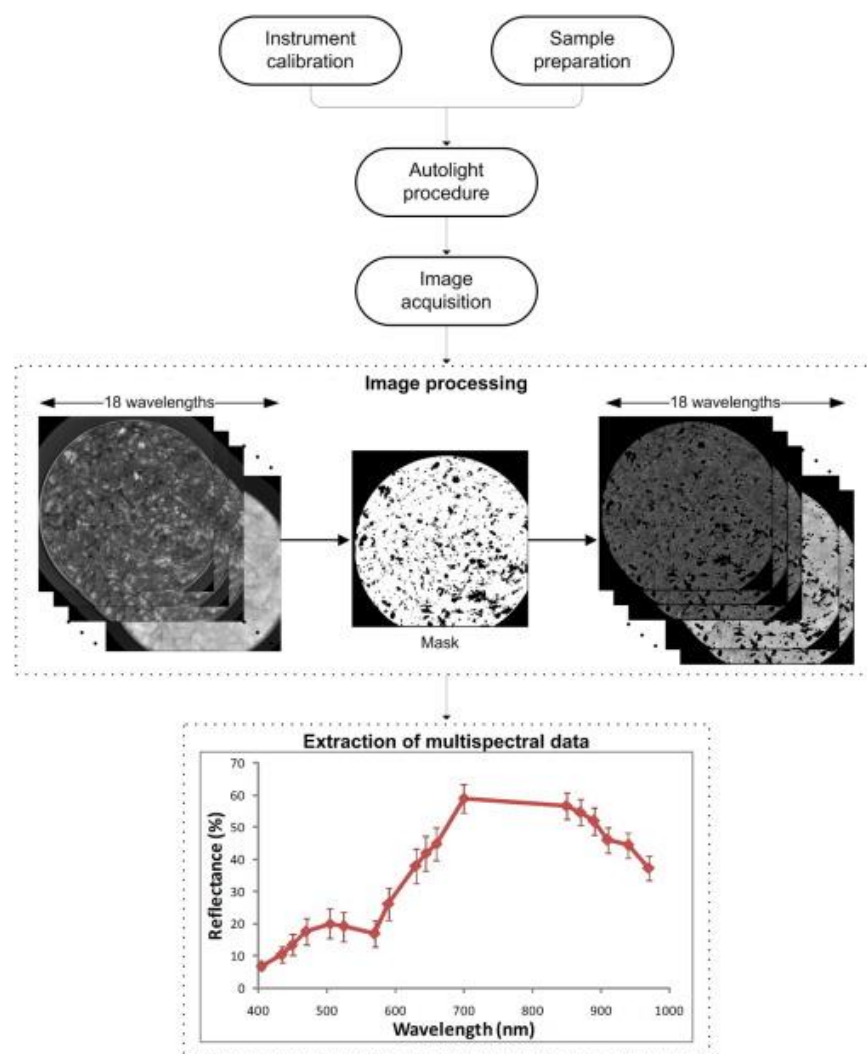
Τα τελικά αποτελέσματα περιέχουν πληροφορίες για κάθε φάσμα και αξιοποιούνται αντίστοιχα με άλλα δεδομένα φασματοσκοπίας δημιουργώντας μοντέλα επικύρωσης αλλοίωσης ή όχι τροφίμων. Όπως διαφαίνεται και στην εικόνα έχουν ανακαλυφθεί και φορητές συσκευές για την λήψη πολυφασματικών εικόνων όπως είναι το **Videometer Lab**, που απεικονίζεται στην Εικόνα 5 (Feng et al., 2018). Το Videometer Lab λαμβάνει εικόνες μέσω μιας συστοιχίας 18 μη ομοιόμορφων κατανεμημένων μηκών κύματος από τα 405nm (UV) έως τα 970nm (NIR βραχέων κυμάτων). Συγκεκριμένα, τα μήκη κύματος είναι 405, 430, 450, 470, 505, 565, 590, 630, 645, 660, 850, 870, 890, 910, 920, 940, 970nm (Ropodi et al., 2014). Το σύστημα καταγράφει τις αντανάκλασεις της επιφάνειας με ένα τυπικό μονόχρωμα τσιπ συσκευής συζευγμένης φόρτισης. Η σφαίρα του Videometer Lab διαθέτει περιμετρικά στο χείλος φως (LED), το οποίο κατά την λήψη εικόνων ανάβει διαδοχικά και η ανάκλαση από το συγκεκριμένο μήκος κύματος καταγράφεται από την επάνω κάμερα. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η λήψη μιας μονόχρωμης εικόνας με ακρίβεια κινητής υποδιαστολής 32 bit για κάθε τύπο LED, δίνοντας στο τέλος, έναν υπερφασματικό κύβο διαστάσεων 1280 × 960 × 18. Τέλος το σύστημα είναι αναγκαίο να βαθμονομείται ραδιομετρικά και γεωμετρικά πριν την χρήση του ώστε να εξασφαλισθεί το μέγιστο δυναμικό εύρος και να περιοριστούν οι σκιές και οτιδήποτε μπορεί να υποβαθμίσει την ποιότητα της τελικής εικόνας (Panagou et al., 2014).

Άλλη μία ευρέως χρησιμοποιούμενη φορητή συσκευή λήψης πολυφασματικών εικόνων είναι το **Videometer Lite** (Εικόνα 6). Είναι μια συσκευή που χρησιμοποιεί ένα σύστημα στροβοσκοπικών LED, και έχει την δυνατότητα να συνδυάζει τις μετρήσεις των 10 μηκών κύματος που αναγράφονται παρακάτω σε μια ενιαία εικόνα. Τα μήκη κύματος που μετράει είναι από τα 405nm (UV) έως τα 850nm. Πιο συγκεκριμένα τα μήκη κύματος που περιλαμβάνονται στο Videometer Lite είναι 405 nm (βιολετί), 460 nm (μπλε), 525 nm (κυανό), 590 nm (πορτοκαλί), 621nm (κόκκινο), 660 nm (κόκκινο), 850 nm (NIR). Το πλεονέκτημα της συσκευής αυτής είναι ότι η βαθμονόμηση είναι ευκολότερη και γρηγορότερη γεγονός που διευκολύνει την χρήση του. Τέλος είναι αναγκαίο να αναφερθεί το γεγονός ότι το Videometer Lite λαμβάνει την εικόνα μέσα σε 7-10 δευτερόλεπτα διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο μια πιο ταχεία και ακριβή ανάλυση (VIDEOMETER, Herlev, Denmark).



Εικόνα 6. Απεικόνιση του φορητού Videometer Lite (VIDEOMETER, Herlev, Denmark).

Τέλος στην Εικόνα 7, συνοψίζεται σχηματικά όλη η διαδικασία λήψης μιας πολυφασματικής εικόνας αλλά και εξαγωγής δεδομένων.



Εικόνα 7. Διαδικασία λήψης πολυφασματικής εικόνας (Ropodi et al., 2014)

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Δείγματα τριάντα γραμμαρίων (30gr) (256 δείγματα συνολικά) ΠΟΠ τυριού φέτας χαμηλής αλατότητας (4%) συντηρήθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (κενό) σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 4°C (σύνολο 128 δείγματα) και 10°C (σύνολο 128 δείγματα) . Τα μισά από τα δείγματα αυτά (128 δείγματα) είχαν εμβολιαστεί με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* ενώ στα υπόλοιπα μισά δείγματα (128 δείγματα) δεν είχε εμβολιαστεί το παθογόνο. Συνολικά 64 δείγματα είχαν επικαλυφθεί με εδωδιμές μεμβράνες αλγινικού νατρίου (Sodium alginate) και είχαν αποθηκευτεί σε συνθήκες κενού και αέρα αντίστοιχα και στις δύο θερμοκρασίες.

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 7 σημεία δειγματοληψίας σε κάθε περίπτωση (συνολικά 28 δειγματοληψίες). Εκτός των μικροβιολογικών αναλύσεων που πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν μετρήσεις pH και ενεργότητας νερού (a_w), καθώς και μετρήσεις με την μέθοδο υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FTIR) και λήψη πολυφασματικών εικόνων (MSI) με τη χρήση δύο μηχανημάτων, του Videometer Lab και Videometer Lite.

2.2 Επιλογή μικροοργανισμών

Οχτώ στελέχη βακτηρίων τεχνολογικής σημασίας, δύο στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών B135, B133 (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) και ένα στέλεχος ζύμης OZ4 (*Yarrowia lipolytica*) αναπτύχθηκαν σε σωληνάκια με MRS broth (De Man, Rogosa and Sharpe broth, Biolife, Italiana S.r.l,Milano, Italy), TSB (Trypto-Casein Soy Broth, Biolife, Italiana S.r.l,Milano, Italy), και YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar, Biolife, Italiana S.r.l,Milano, Italy) αντίστοιχα, για 24 ώρες στους 30°C. Μετά τις 24 ώρες επώασης, λήφθηκαν 100 μl από κάθε σωληνάκι παθογόνου βακτηρίου και της ζύμης και εξαπλώθηκε με την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία TSA (Trypto-Casein Soy Agar, Biolife, Italiana S.r.l,Milano, Italy). Παράλληλα 300 μl από κάθε σωληνάκι των οχτώ τεχνολογικών βακτηρίων μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια που περιείχαν 5 ml UHT γάλα. Συνολικά παρασκευάστηκαν 8 σωληνάκια με UHT γάλα. Τα 8 σωληνάκια (που περιείχαν τα τεχνολογικά βακτήρια) επωάστηκαν για 24 ώρες στους 30°C. Μετά τις 24 ώρες πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση (4000 rpm για 10 min στους 4°C) προκειμένου να διαχωριστεί το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα που περιείχε τον μικροοργανισμό.

Πραγματοποιήθηκαν 2 συνολικά φυγοκεντρίσεις (4000 rpm για 10 min στους 4°C). Από την πρώτη λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό, το οποίο και αποθηκεύτηκε σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως, και από την δεύτερη φυγοκέντριση με 5 ml αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K.) λήφθηκε η καθαρή ποσότητα του μικροοργανισμού. Η παραπάνω καθαρή ποσότητα μικροοργανισμού αραιώθηκε στην συνέχεια με 10 ml αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος Ringer και ύστερα από καλή ανάδευση με Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 1 min ήταν έτοιμο προς χρήση.

Μετά την φυγοκέντριση, 100 µl από το υπερκείμενο κάθε τεχνολογικού βακτηρίου και 100 µl από τον αραιωμένο αντίστοιχο μικροοργανισμό τοποθετήθηκαν με spot (απλή σταγόνα πάνω στο τρυβλίο) πάνω στα τρυβλία TSA στα οποία είχαν εξαπλωθεί προηγουμένως τα δύο παθογόνα βακτήρια αλλά και η ζύμη. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να γίνει έλεγχος της δράσης των βακτηριών τεχνολογικής σημασίας έναντι των δύο παθογόνων μικροοργανισμών και της ζύμης. Τα τεχνολογικά βακτήρια τα οποία ξεχώρισαν από την παραπάνω διαδικασία ήταν ο *Lactiplantibacillus plantarum* (L125) και ο *Lactiplantibacillus pentosus* (L33) τα οποία φάνηκαν να έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων αλλά και της ζύμης καθώς στα σημεία που είχαν πραγματοποιηθεί τα spot του υπερκείμενου υγρού αλλά και του καθαρού μικροοργανισμού περιορίζονταν η ανάπτυξη και η εξάπλωση των άλλων.

2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Περίπου 10 κιλά ΠΟΠ τυριού φέτας ελήφθησαν από Ελληνική κτηνοτροφική βιομηχανία στον Αλμυρό Βόλου (Greek farm) σε μεταλλικούς περιέκτες και μεταφέρθηκαν στο χώρο του εργαστηρίου όπου και πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία και η συσκευασία της.

Τα δείγματα (256 δείγματα) αφού τεμαχίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε ποσότητες των 30 gr, ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες (128 δείγματα η κάθε ομάδα) ανάλογα με την επεξεργασία που θα λάμβαναν. Τα μισά δείγματα (64 δείγματα) της πρώτης ομάδας επικαλήφθηκαν με εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου και αποθηκεύτηκαν αντίστοιχα σε συνθήκες κενού και αέρα στους 4°C και 10°C, ενώ στα άλλα μισά (64 δείγματα) της ίδιας ομάδας εμβολιάστηκε με ψεκασμό (spraying) το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* σε πληθυσμό 3 log CFU/gr και στην συνέχεια

ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία συσκευασίας και συντήρησης. Στα δείγματα της δεύτερης ομάδας, στα μισά από αυτά (64 δείγματα) έγινε ψεκασμός (spraying) UHT αγελαδινού γάλακτος (εμπορικής προέλευσης) και αποθηκεύτηκαν αντίστοιχα σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (κενό) στους 4°C και 10°C. Στα άλλα μισά δείγματα (64 δείγματα) εμβολιάστηκε με ψεκασμό (spraying) το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* σε πληθυσμό 3 log CFU/gr και στην συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία συσκευασίας και συντήρησης με τα control δείγματα.

2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών (Εικόνα 9), ανεξαιρέτως το είδος του δείγματος (κενό ή αέρας) αφαιρούνταν προσεκτικά η συσκευασία του δείγματος και στη συνέχεια ζυγίζονταν 10gr δείγματος σε αποστειρωμένη σακούλα ομογενοποίησης υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο τεμαχισμός του δείγματος αλλά και η μεταφορά του στην σακούλα ομογενοποίησης γινόταν αποκλειστικά με αποστειρωμένη λαβίδα και νυστέρι. Στην συνέχεια το δείγμα αναμιγνύονταν (με αναλογία 1/10) με αποστειρωμένο αλατούχο διάλυμα Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K) ποσότητας 90ml και ακολουθούσε ομογενοποίηση με χρήση συσκευής Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 1 min. Τα υπόλοιπα 20gr κάθε δείγματος που δεν αναμιγνύονταν με το αποστειρωμένο αλατούχο διάλυμα, αλλά τεμαχίζονταν ισόποσα σε κενά τρυβλία και χρησιμοποιούνταν για περεταίρω ανάλυση για τη λήψη δεδομένων από τις φασματοσκοπικές μεθόδους (FTIR, MSI).

Μετά την δειγματοληψία ακολουθούσε ο ενοφθαλμισμός της επιλεγμένης αραιώσης κάθε δείγματος στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα. Στα θρεπτικά μέσα που πραγματοποιούνταν επιφανειακή επίστρωση, 0,1ml δείγματος από την επιθυμητή αραιώση, διασπείρονταν στην επιφάνεια του τρυβλίου με την βοήθεια αποστειρωμένου τριγώνου. Στα θρεπτικά μέσα που πραγματοποιούνταν ενσωμάτωση, 1ml του δείγματος εισάγονταν σε κενό τρυβλίο και ύστερα προσθέτονταν σε υγρή μορφή τα θρεπτικά μέσα και ακολουθούσε καλή ανάδευση για ομοιογενή διασπορά του δείγματος. Μετά την στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου στο τρυβλίο προσθέτονταν δεύτερη στρώση του υγρού θρεπτικού μέσου ώστε να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια, μετά τον ενοφθαλμισμό, ακολουθούσε επώαση σε ειδικούς θαλάμους σε θερμοκρασία και χρονικό διάστημα κατάλληλο για την ανάπτυξη του εκάστοτε μικροοργανισμού. Μετά την λήξη του χρονικού αυτού διαστήματος ακολουθούσε καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών στα τρυβλία της κάθε αραιώσης.



Εικόνα 9. Διαδικασία δειγματοληψίας

Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι μελετήθηκαν για την αλλοίωση της φέτας ήταν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), γαλακτικά βακτήρια του γένους *Streptococcus*, το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* και ζύμες-μύκητες.

Τα θρεπτικά υποστρώματα (Εικόνα 10) που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική μελέτη των παραπάνω μικροοργανισμών είναι αναφορικά τα παρακάτω:

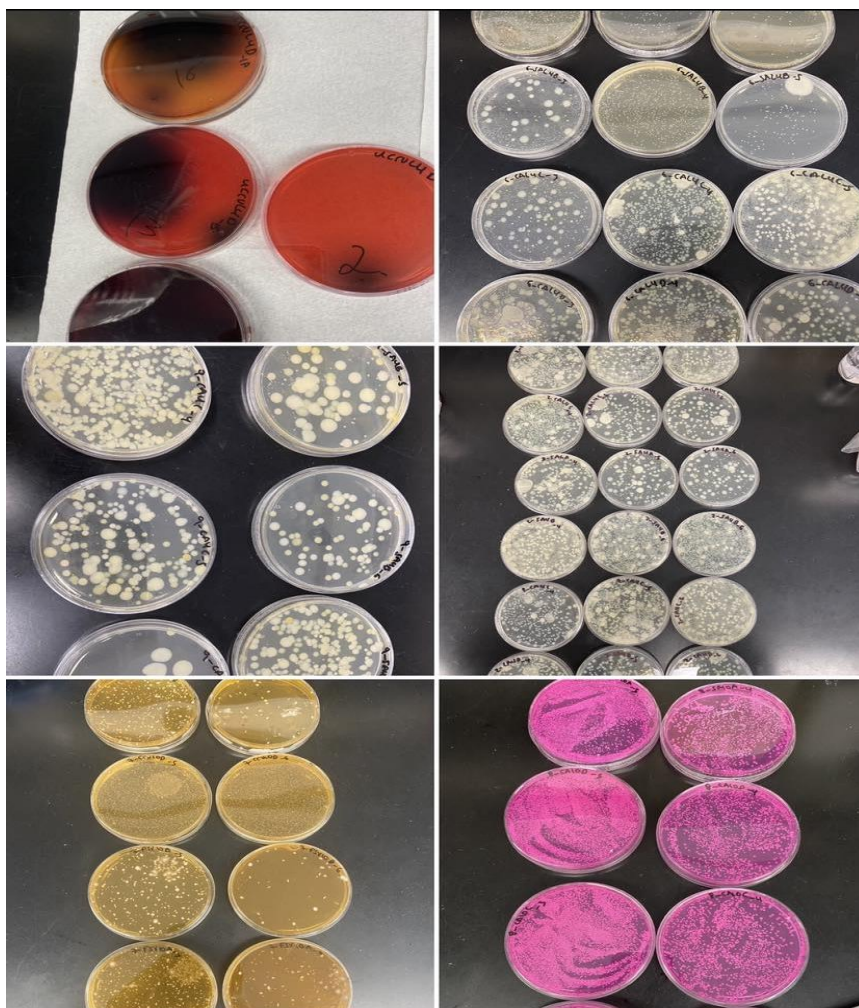
Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης:

1. **Plate Count Agar (PCA)** (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): Είναι ένα γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για καταμέτρηση της OMX. Η επώαση γινόταν στους 30°C για 48 ώρες.
2. **Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC)** (Lab M Limited) με προσθήκη αντιβιοτικού Chloramphenicol (LAB M, UK): Είναι ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για καταμέτρηση ζυμών και μυκήτων. Η επώαση γινόταν στους 25°C για 48 ώρες

3. **Listeria Palcam Agar Base** (PALCAM) (Ref:4016042, Biolife, Italiana S.r.l,Milano, Italy): Είναι ένα εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα για την καταμέτρηση και απομόνωση του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στο οποίο προστίθεται το αντιβιοτικό polymyxin B sulphate (Ref:4240042, Biolife, Italiana S.r.l,Milano, Italy). Οι αποικίες είχαν περίπου 1-1.5mm διάμετρο και πράσινο-γκρι έως και μαύρο χρώμα με μαύρο στεφάνι με βυθισμένο κέντρο. Η επώαση γινόταν στους 37°C για 48 ώρες.

Τεχνική της ενσωμάτωσης:

4. **M17 Agar** (Ref: 401719S2, Biolife, Italiana S.r.l. Milano, Italy): Είναι ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη και καταμέτρηση των γαλακτικών βακτηρίων του γένους *Streptococcus*. Οι αποικίες είχαν περίπου 1-2mm διάμετρο με σχήμα σχεδόν σφαιρικό-φακοειδές. Η επώαση γινόταν στους 37°C για 48 ώρες.
5. **De Man, Rogosa and Sharpe agar** (MRS) (Ref.401728S2, Biolife, Italiana S.r.l,Milano, Italy): Είναι ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για την καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Οι αποικίες είχαν φακοειδές σχήμα και λευκό χρώμα. Η επώαση γινόταν στους 30°C για 48 ώρες.



Εικόνα 10. Αποικίες μικροοργανισμών σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα

2.5 Μέτρηση pH

Μετά την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων γινόταν μέτρηση του pH στην 1^η δεκαδικά αραιώση κάθε με την βοήθεια ειδικού ψηφιακού οργάνου μέτρησης pH (RL150, Russell Ph, Cork, Ireland) με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). Πριν την χρήση του οργάνου ήταν αναγκαία η βαθμονόμηση του οργάνου με την χρήση 3 διαφορετικών πρότυπων διαλυμάτων διαφορετικού pH (4,7 και 10).

2.6 Μέτρηση ενεργότητας νερού (a_w)

Μετά την διαδικασία της δειγματοληψίας της φέτας, πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητας νερού (a_w) σε καθένα από τα 8 δείγματα. Η μέτρηση γινόταν σε ειδικό ψηφιακό όργανο (Dew Point Water Activity Meter 4TE, Aqualab, Pullman, Washington, U.S) (Εικόνα 11) και με την βοήθεια ειδικής υποδοχής, ένα λεπτό κομμάτι κάθε δείγματος τοποθετούνταν στο όργανο προς ανάλυση. Η μέτρηση ήταν αρκετά ακριβής

και ολιγόλεπτη (περίπου 5 λεπτά για κάθε μέτρηση) και πραγματοποιούνται σε σταθερές θερμοκρασιακές συνθήκες περιβάλλοντος.



Εικόνα 11. Ψηφιακό όργανο μέτρησης ενεργότητας νερού
(<https://aqualab.com/en/products/aqualab-4te-water-activity-meter>)

2.7 Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου

Για την παρασκευή των εδώδιμων αλγινικών μεμβρανών χρειάστηκαν 32 gr αλγινικού νατρίου-Sodium Alginate (A3249, Applichem), 16 gr γλυκερόλης-glycerol και ορισμένη ποσότητα χλωριούχου ασβεστίου-Calcium Chloride (Applichem). Αρχικά σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως τοποθετήθηκαν 800 ml απιονισμένου νερού και τοποθετήθηκε ειδικός αναδευτήρας (μαγνητάκι) μέχρι να φτάσει η θερμοκρασία στους 60°C. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι όλη η διαδικασία παρασκευής πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες και το δοχείο ζέσεως επικαλύπτονταν με ένα φύλλο αλουμινόχαρτου για την αποτροπή πιθανής επιμόλυνσης. Όταν η θερμοκρασία έφτασε τους 60°C σταδιακά και με πολύ καλή ανάδευση προστέθηκαν τα 32 gr αλγινικού νατρίου.

Παράλληλα με την διαδικασία αυτή, πραγματοποιούνταν φυγοκέντριση (4000 rpm για 10 min στους 4°C) των MRS broth των δύο τεχνολογικής σημασίας γαλακτικών βακτηρίων (*Lactiplantibacillus plantarum* (L125) και ο *Lactiplantibacillus pentosus* (L33) προκειμένου να ληφθεί το υπερκείμενο υγρό τους συνολικής ποσότητας 800 ml. Τα παραπάνω MRS broth είχαν επωαστεί την προηγούμενη ημέρα στους 30°C για 24 ώρες. Μετά την λήψη του υπερκείμενου υγρού, η ποσότητα αυτή τοποθετήθηκε στο ίδιο δοχείο ζέσεως με το απιονισμένο νερό προκειμένου να θερμανθεί (65° C) και να

διαλυθεί στο σύνολό του όλη η ποσότητα του αλγινικού ασβεστίου. Μόλις διαλύθηκε όλη η απαιτούμενη ποσότητα αλγινικών στο διάλυμα, το δοχείο ζέσεως απομακρύνθηκε από την εστία και τοποθετήθηκε στο ψυγείο στους 4°C για 30 λεπτά έτσι ώστε να απομακρυνθούν όλες οι φυσαλίδες αέρα που έχουν πραγματοποιηθεί κατά την ανάδευση.

Μετά τα 30 λεπτά, αφαιρέθηκε το δοχείο ζέσεως από το ψυγείο και τοποθετήθηκαν 16 gr γλυκερόλης (αφού πρώτα είχε θερμανθεί στους 60° C για 1 λεπτό σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως). Ακολούθησε ξανά ανάδευση, σε αρκετά πιο αργή ένταση προκειμένου να επιτευχθεί ομογενοποίηση χωρίς την παραγωγή φυσαλίδων. Ύστερα από την πλήρη ομογενοποίηση, το διάλυμα εξαπλώθηκε προσεκτικά σε τρυβλία όπου με ζυγό ακριβείας τοποθετήθηκαν περίπου 20 gr σε κάθε τρυβλίο. Μετά το στρώσιμο τα τρυβλία αφέθηκαν με ανοιχτά καπάκια σε Laminar flow cabinet για περίπου 12-13 ώρες. Μετά το πέρας αυτών των ωρών, τοποθετήθηκε σε κάθε τρυβλίο ελάχιστη ποσότητα (15-20 ml) υδατικού διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) και αφέθηκε για 60 sec περίπου προκειμένου να αποκολληθεί η μεμβράνη από τα τοιχώματα του τρυβλίου και να αφαιρεθεί εύκολα από αυτό. Η κάθε μεμβράνη που αφαιρέθηκε αφέθηκε σε απορροφητικό χαρτί για λίγα λεπτά προκειμένου να εξατμιστεί η περιττή υγρασία, αποθηκεύτηκαν σε τρυβλία τα οποία επικαλύφθηκαν με ταινία σφράγισης (parafilm) και αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι την χρήση τους.

2.8 Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων φέτας

Στην αρχή κάθε δειγματοληψίας, πριν τον τεμαχισμό και την επεξεργασία των δειγμάτων, πραγματοποιούνταν αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της φέτας και από τα τέσσερα άτομα της αντίστοιχης πειραματικής μελέτης όσον αφορά το άρωμα, την γεύση, υφή και την γενική εμφάνιση. Κάθε δείγμα βαθμολογούνταν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του με βαθμολογική κλίμακα της τάξης 1,2,3 στην οποία αντιστοιχούν οι χαρακτηρισμοί (1) φρέσκο-αποδεκτό, (2) οριακά φρέσκο-αποδεκτό και (3) αλλοιωμένο-μη αποδεκτό.

2.9 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Φασματοσκοπικά δεδομένα λήφθηκαν από ειδικό όργανο φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier. Για τα δείγματα φέτας που αναλύθηκαν χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο FT/IR- 6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan)

και κρύσταλλος ZnSe 45° HATR – Horizontal Attenuated Total Reflectance (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, Ηνωμένες Πολιτείες) ανιχνευτή DLaTGS και διαχωριστή Ge/KBr. Ο κρύσταλλος που χρησιμοποιήθηκε έχει δείκτη διάθλασης 2.4 και βάθος διείσδυσης 2.0 μm στα 1000 cm^{-1} .

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων φέτας, ποσότητα φέτας κομμένη σε λεπτά κομμάτια τοποθετούνταν πάνω στην κρυσταλλική πλάκα, επικαλύπτονταν από φύλλο αλουμινόχαρτου και ασκούταν ανάλογη πίεση προκειμένου να επιτευχθεί η ιδανική και άριστη επαφή της φέτας με τον κρύσταλλο. Πριν την έναρξη της ανάλυσης αλλά και ανά 4 δείγματα (δηλαδή ανά 8 φάσματα) πραγματοποιούνταν η λήψη φάσματος αναφοράς (background) όπως ο κρύσταλλος τοποθετούνταν στο όργανο κενός, χωρίς ποσότητα φέτας στην επιφάνειά του. Μετά από κάθε μέτρηση ήταν αναγκαίο ο κρύσταλλος να καθαρίζεται με απορρυπαντικό και απιονισμένο νερό και στην συνέχεια με ακετόνη. Καίριας σημασίας ήταν ο σχολαστικός καθαρισμός του κρυστάλλου και το καλό στέγνωμά του για την σωστή λήψη φάσματος σε κάθε επόμενη μέτρηση. Τα φάσματα λαμβάνονταν με χρήση του λογισμικού Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) software version 2 (Jasco Corp.), σε μήκη κύματος εύρους 4000 έως 400 cm^{-1} με 100 σαρώσεις ανάλυσης 4 cm^{-1} , ανά συνολικό χρόνο 2 min.

2.10 Εφαρμογή φασματοσκοπίας με την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)

Κατά την δειγματοληψία, τα κομμάτια φέτας, τοποθετούνταν σε κενό τρυβλίο ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί η λήψη των πολυφασματικών εικόνων. Για το κάθε δείγμα λαμβάνονταν δύο εικόνες και από τις δύο όψεις του δείγματος (μπροστινή και πισινή όψη). Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το VideometerLab και VideometerLite. Το VideometerLab είναι ένα σύστημα που λαμβάνει εικόνες σε 18 διαφορετικά και μη ομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος με εύρος 405-970 nm. Πιο αναλυτικά τα μήκη κύματος είναι 405, 430, 450, 470, 505, 565, 590, 630, 645, 660, 850, 870, 890, 910, 920, 940, 950 και 970 nm (Ropodi et al., 2014). Το σύστημα καταγραφής καταγράφει ανακλάσεις από την επιφάνεια των δειγμάτων με μια τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (charge couple device chip). Το δείγμα φέτας τοποθετούνταν μέσα σε μία σφαίρα Ulbricht, που εσωτερικά είχε μια λευκή επίστρωση. Στην κορυφή της σφαίρας ήταν η κάμερα. Η λευκή επίστρωση αλλά και το σφαιρικό σχήμα του οργάνου συνέβαλλαν στην ομοιογενή ανάκλαση του φωτός. Περιμετρικά και αντιδιαμετρικά της σφαίρας υπήρχαν δίοδοι εκπομπής φωτός (LEDs) για τα 18 μήκη

κύματος. Όταν λαμβάνονταν μια εικόνα τα LED άναβαν διαδοχικά και η ανάκλαση από το κάθε μήκος κύματος καταγραφόταν από την κάμερα. Το αποτέλεσμα ήταν μια μονόχρωμη εικόνα με 32-Bit ακρίβεια για κάθε τύπο LED, καταλήγοντας σε ένα υπερφασματικό κύβο. Πριν την λήψη της πρώτης πολυφασματικής εικόνας ήταν αναγκαίο να γίνει η διαδικασία του light setup. Με αυτόν τον τρόπο προετοιμάζονταν οι δίοδοι εκπομπής με βάση τον τύπο του αντικειμένου προς απεικόνιση. Μετά το light setup, το όργανο υποβάλλονταν σε ραδιομετρική και γεωμετρική βαθμονόμηση. Με τα παραπάνω διασφαλίζεται βέλτιστο δυναμικό εύρος και μειώνονται οι σκιές και η παραμόρφωση των ειδώλων (Panagou et al., 2014).

Ύστερα από την λήψη πολυφασματικών εικόνων με το όργανο VideometerLab ακολουθούσε λήψη εικόνων με το Videometer Lite. Η συσκευή αυτή συνδυάζει τις μετρήσεις των 10 μηκών κύματος που αναγράφονται παρακάτω σε μια ενιαία εικόνα. Τα μήκη κύματος που μετράει είναι από τα 405nm (UV) έως τα 850nm. Πιο συγκεκριμένα τα μήκη κύματος που περιλαμβάνονται στο VideometerLite είναι 405 nm (βιολετί), 460 nm (μπλε), 525 nm (κυανό), 590 nm (πορτοκαλί), 621nm (Κόκκινο), 660 nm (Κόκκινο), 850 nm (NIR). Η συσκευή αυτή δεν χρειάζονταν βαθμονόμηση και η λήψη των εικόνων διαρκούσε περισσότερο, έως και 7-10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα της φέτας τοποθετούνταν όπως και στο VideometerLab σε λεπτές φέτες σε κενό τρυβλίο (VIDEOMETER, Herlev, Denmark).

Κατά την ανάλυση των εικόνων και προκειμένου οι εικόνες να είναι κατάλληλες προς επεξεργασία, ήταν αναγκαία η επεξεργασία τους προκειμένου να αφαιρεθούν τμήματα που δεν ήταν σχετικά με την ανάλυση όπως τμήμα του κενού τρυβλίου (segmentation). Η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα του VideometerLab (Videometer-Labversion 2.12.39, Videometer A/S, Denmark) και η αρχή στην οποία βασίζονταν ήταν η κανονική διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminal Analysis, CDA). Με τον τρόπο αυτό προέκυπτε μία κομμένη εικόνα που περιείχε μόνο της περιοχές ενδιαφέροντος (RegionofInterest, ROI). Αυτές οι εικόνες χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των φασματικών δεδομένων. Για κάθε εικόνα υπολογίστηκε η μέση φασματοσκοπική ανάλυση, όπως προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των pixels της περιοχής ενδιαφέροντος (Ραφτοπούλου Ο., 2019).

2.11 Ανάλυση δεδομένων

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μικροβιολογικό φορτίο των δειγμάτων της φέτας, τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τα τρία όργανα υποβλήθηκαν σε περεταίρω αναλύσεις.

2.11.1 Μοντέλο για την εκτίμηση της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression – PLS-R)

Τα δεδομένα από την πειραματική μελέτη των δειγμάτων φέτας καθώς και αυτά που λήφθηκαν από τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR) και πολυφασματικής απεικόνισης (MSI), συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την πρόβλεψη της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Στην συγκεκριμένη αυτή μέθοδο υπάρχουν δύο σύνολα σημασίας, το σύνολο των δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και δεδομένων Y (εξαρτημένες μεταβλητές). Τα δύο αυτά σύνολα συσχετίζονται γραμμικά δίνοντας νέες εξαρτημένες και ανεξάρτητες μεταβλητές ενώ ταυτόχρονα εξάγονται και λανθασμένες μεταβλητές (Latent Variables, LVs) (Panagou et al., 2014, Markide-Nicolaou, 2010). Οι νέες x -μεταβλητές που σχηματίζονται είναι γραμμικός συνδυασμός των παλαιών x -μεταβλητών, οι οποίες στην συνέχεια αποσκοπούν ως προγνωστικοί παράγοντες του Y (Wold et al., 2001). Η μέθοδο PLS-R προσπαθεί να εξηγήσει όσο είναι περισσότερο δυνατόν την διακύμανση των εξαρτημένων μεταβλητών (Subramanian et al., 2010). Πρακτικά η μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) στοχεύει στην πρόβλεψη ενός συνόλου Y εξαρτημένων μεταβλητών από ένα πολύ μεγαλύτερο σύνολο X ανεξάρτητων μεταβλητών και στην εκτίμηση της κοινής τους δομής (Abdi H., 2003).

Η μέθοδος PLS-R «μοντελοποιεί» τη δομή του X, Y και διακρίνεται συγκριτικά με άλλες στατιστικές μεθόδους λόγω της ικανότητας της να αναλύει δεδομένα με έντονα συσχετισμένες, θορυβώδεις και πολυάριθμες μεταβλητές X καθώς και να μοντελοποιεί ταυτόχρονα πολλές μεταβλητές Y . Σε κάθε μοντελοποίηση είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός της σωστής πολυπλοκότητας του μοντέλου. Εξαιτίας της φύσης των μεταβλητών X , εγκυμονεί ο κίνδυνος της «υπερ-προσαρμογής» (overfitting), δηλαδή το μοντέλο να μην έχει καλή προγνωστική ισχύ. Για την αποφυγή αυτού του σημαντικού προβλήματος είναι αναγκαία η υλοποίηση ενός αξιόπιστου και έγκυρου ελέγχου, όπως είναι η διασταυρούμενη επικύρωση (CV). Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται

διαϊρώντας τα δεδομένο σε έναν αριθμό ομάδων και στη συνέχεια οι ομάδες αυτές χρησιμοποιούνται με κατάλληλο τρόπο και διαδοχικά για την επίτευξη παράλληλων μοντέλων με τα εναπομέναντα δεδομένα (Ergon et al., 2014, Wold et al., 2001).

Πριν από κάθε χρήση του μοντέλου επιβάλλεται η επικύρωσή του. Ο πιο ακριβής και ιδανικός τρόπος είναι με διαφορετικά αντιπροσωπευτικά δείγματα. Καθώς αυτό είναι σπάνιο, υπάρχουν δύο τρόποι επικύρωσης, είτε με διασταυρούμενη επικύρωση (CV), είτε με επαναξιολόγηση του μοντέλου μετά τυχαιοποίηση των δεδομένων (Wold et al., 2001).

Ειδικότερα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα τρία όργανα αντιστοιχήθηκαν με τα μικροβιολογικά δεδομένα για την περιοχή $1800-900\text{ cm}^{-1}$ για το όργανο του FTIR και για την περιοχή 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm για τα όργανα VideometerLab και VideometerLite. Στα πλαίσια της ανάλυσης αυτής, ως ανεξάρτητες μεταβλητές Χ χρησιμοποιήθηκαν οι κυματάρημοι των τριών οργάνων ενώ ως εξαρτημένες μεταβλητές Υ ορίστηκαν τα μικροβιολογικά δεδομένα OMX για τα αντίστοιχα δείγματα. Για την εφαρμογή της ανάλυσης αυτής χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα XLSTAT του Excel, ενώ για την προεπεξεργασία ορισμένων δεδομένων για την εξομάλυνση του θορύβου χρησιμοποιήθηκε το The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway). Συνολικά κατασκευάστηκαν 6 μοντέλα στα οποία ακολουθήθηκε διαφορετική επεξεργασία των δεδομένων, τα οποία αναλύονται παρακάτω. Για κάθε μοντέλο δοκιμάστηκαν συγκεκριμένοι μετασχηματισμοί αρχικών δεδομένων (Savitzky-Golay 1^η ή 2^η παράγωγος, SNV). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη (Calibration) και η εσωτερική επικύρωση (Full Cross Validation) των μοντέλων μέρος του συνόλου των δειγμάτων, δηλαδή το 70%, χρησιμοποιήθηκε για την ενέργεια αυτή, ενώ το υπόλοιπο 30% του συνόλου χρησιμοποιήθηκε για την εξωτερική (Prediction) επικύρωση των μοντέλων. Τέλος ως μεταβλητές Υ επιλέχθηκαν τα μικροβιολογικά αποτελέσματα OMX των δειγμάτων φέτας. Όμοιοι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν και στις έξι κατηγορίες δεδομένων (FTIR-δείγματα φέτας σε συσκευασία αέρα, FTIR-δείγματα φέτας σε συσκευασία κενού, Videometer Lab-δείγματα φέτας σε συσκευασία κενού, Videometer Lab-δείγματα φέτας σε συσκευασία αέρα, Videometer Lite-δείγματα φέτας σε συσκευασία κενού και Videometer Lite-δείγματα φέτας σε συσκευασία αέρα).

2.11.2 Μοντέλο για τον διαχωρισμό δειγμάτων φέτας με και χωρίς *Listeria monocytogenes* με διακριτή ανάλυση με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis - PLS-DA)

Η διακριτή ανάλυση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) είναι μια στατιστική πολυμεταβλητή μέθοδος ανάλυσης που συμβάλει στην διάκριση των δειγμάτων σε τάξεις ποιότητας, όπως στον διαχωρισμό των δειγμάτων φέτας που έχουν εμβολιαστεί με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* και σε αυτά που δεν περιέχουν το βακτήριο (controls). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προγνωστική και περιγραφική μοντελοποίηση καθώς και για την επιλογή μεταβλητών (Lee et al., 2018, Panagou et al., 2014). Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι ο ακριβέστερος προσδιορισμός του αριθμού της λανθάνουσας μεταβλητής (LVs) έτσι ώστε η τεχνική να αποκτήσει την μέγιστη δυνατή προγνωστική ικανότητα και να αποφευχθούν προβλήματα που μπορεί να αναχαιτίσουν την ανάλυση όπως είναι η υπερβολική προσαρμογή των δεδομένων (Panagou et al., 2014). Οι λανθάνουσες μεταβλητές εξάγονται με μια σειρά από κύρια στοιχεία αφού πρώτα δημιουργηθεί μια νέα γραμμική περιοχή (μεταβλητών X και Y) η οποία διαχωρίζει την περιοχή σε κλάσεις και προβάλλει τα αρχικά δεδομένα εισόδου και εξόδου σε έναν νέο λανθάνοντα χώρο (Lee et al., 2018, Panagou et al., 2014). Την μεγαλύτερη ποσότητα πληροφοριών τη μεταφέρει το πρώτο LV, στην συνέχεια το δεύτερο LV και ούτω καθεξής (Lee et al., 2018).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα φασματοσκοπικά δεδομένα και από τα δύο όργανα ταξινομήθηκαν σε ένα πίνακα όπου οι σειρές (X) αντιπροσωπεύουν τα δείγματα φέτας στα οποία έχει προηγηθεί εμβολιασμός με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* αλλά και αυτά στα οποία δεν έχει γίνει καθόλου εμβολιασμός (controls). Αντίστοιχα οι στήλες του πίνακα αντιπροσωπεύουν τις μεταβλητές (κυματάρια). Μια επιπλέον στήλη που υπάρχει στον πίνακα περιλαμβάνει την εξαρτημένη μεταβλητή (με ή χωρίς *Listeria monocytogenes*) και η στήλη αυτή προστέθηκε προκειμένου να είναι εφικτή η διάκριση κάθε κλάσης. Για το σκοπό αυτό η μεταβλητή Y, κωδικοποιήθηκε σε αριθμητική μορφή δίνοντας το -1 στην «Κλάση 1» (χωρίς *Listeria monocytogenes*) και το 1 στην «Κλάση 2» (με *Listeria monocytogenes*). Το σύνολο των σωστά ταξινομημένων δειγμάτων φέτας σε κάθε κατηγορία ποιότητας διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων στην κατηγορία αποτελεί την ευαισθησία ταξινόμησης (sensitivity, %) του μοντέλου. Αντίστοιχα η συνολικά σωστή ακρίβεια ταξινόμησης του μοντέλου (accuracy, %) ονομάζεται ως ο αριθμός των σωστών ταξινόμησεων σε όλες τις κατηγορίες διαιρεμένος με το σύνολο των δειγμάτων προς ανάλυση (Sokolova and Lapalme, 2009).

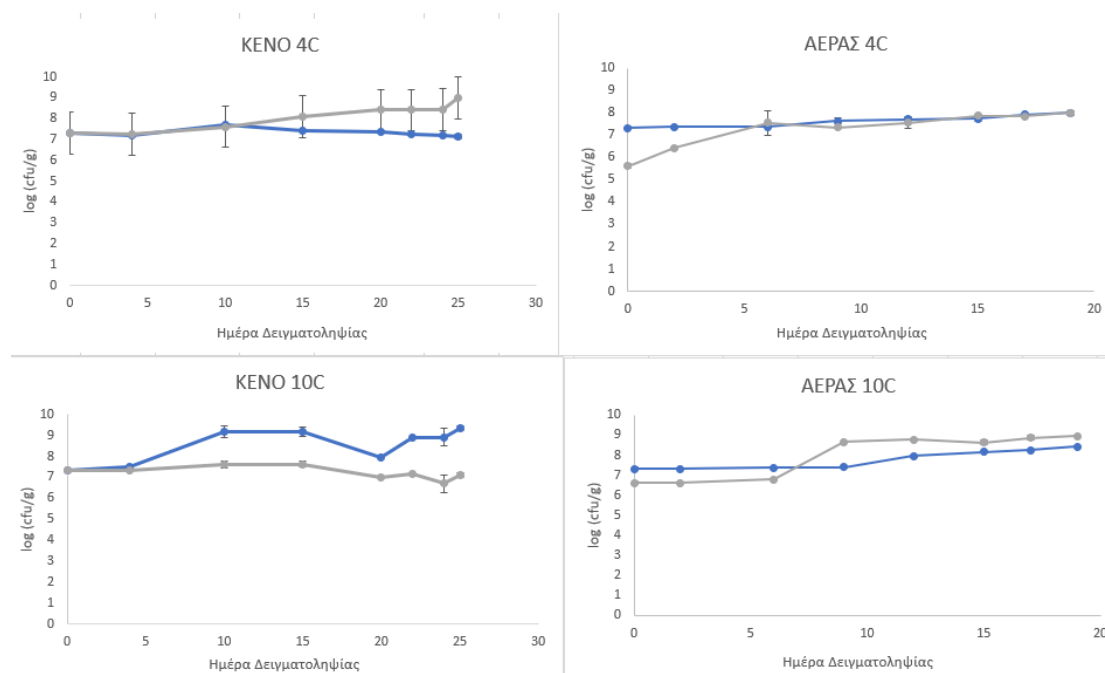
3. Αποτελέσματα

3.1 Εκτίμηση της μικροβιολογικών αποτελεσμάτων

3.1.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων

Στα **Διαγράμματα 3.1-3.4** απεικονίζονται οι πληθυσμοί για τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, για δείγματα φέτας συντηρημένα υπό αναερόβιες (συσκευασία κενού) και αερόβιες συνθήκες (συσκευασία αέρα), σε θερμοκρασίες 4°C και 10°C. Οι τιμές απεικονίζουν τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση ($\pm$) του κάθε δείγματος από τις δύο επαναλήψεις (log CFU/g).

Στα **Διαγράμματα 3.1-3.4** τα δείγματα στις αναερόβιες συνθήκες CCV4,CCV10 αποτελούν τα δείγματα controls στους 4°C και 10°C αντίστοιχα και τα δείγματα FSV4,FSV10 αποτελούν τα δείγματα με τις εδώδιμες μεμβράνες στους 4°C και 10°C αντίστοιχα. Ομοίως, για τις αερόβιες συνθήκες, τα δείγματα CA4,CA10 αποτελούν τα δείγματα controls στους 4°C και 10°C αντίστοιχα ενώ τα SA4, SA10 αποτελούν τα δείγματα στα οποία έχει γίνει ψεκασμός των δύο τεχνολογικής σημασίας γαλακτικών βακτηρίων.



Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα ανάπτυξης των μέσων όρων και τυπικών αποκλίσεων ($\pm$) της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), στα δείγματα φέτας σε συσκευασία κενού και αέρα στους 4°C και 10°C. Με μπλε (●) απεικονίζονται τα control δείγματα και με γκρι (●) τα δείγματα με το υπερκείμενο υγρό (SA4,SA10) και τα δείγματα με τις εδώδιμες μεμβράνες (FSV4, FSV10), στα αντίστοιχα διαγράμματα

Στο **Διάγραμμα 3.1** αποτυπώνονται τα αποτελέσματα για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX). Όπως είναι εμφανές στις αναερόβιες συνθήκες και συγκεκριμένα στους 4°C το αρχικό μικροβιολογικό φορτίο των δύο περιπτώσεων είναι σε πληθυσμό 7,32 log CFU/g. Ύστερα από διάστημα 30 ημερών (10^η ημέρα δειγματοληψίας) παρατηρείται στην περίπτωση του CCV4 μία μικρή μείωση καταλήγοντας στην τελική τιμή των 7,13 CFU/g ενώ αντίθετα για το FSV4 η τελική τιμή είναι υψηλότερη και ίση με 8,99 CFU/g.

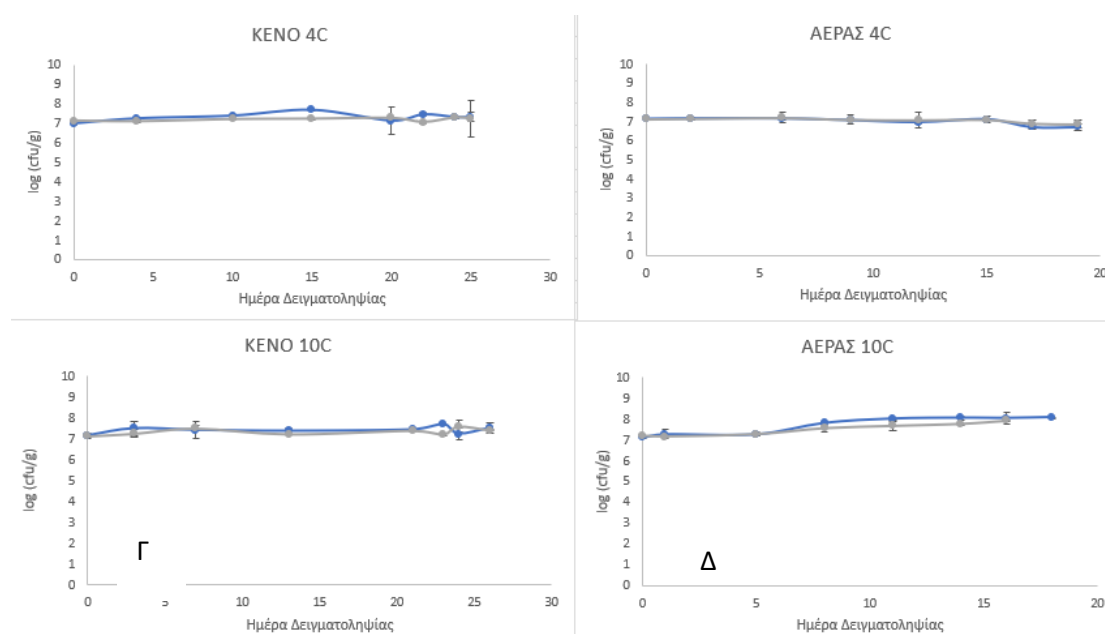
Αντίθετα σχετικά αποτελέσματα εμφανίστηκαν για τα ίδια δείγματα (CCV10, FSV10) στη συσκευασία κενού στους 10°C όπου ο αρχικός πληθυσμός των δειγμάτων ήταν 7,33 και 7,32 log CFU/g αντίστοιχα. Μετά το πέρας του ίδιου χρονικού διαστήματος (30 ημέρες) η λογαριθμική αύξηση ήταν λίγο μεγαλύτερη αυτής των 4°C για το δείγμα control με τελική τιμή 9.33 log CFU/g ενώ ο πληθυσμός του δείγματος των εδώδιμων μεμβρανών διατηρείται σχετικά σταθερός σε όλο το χρονικό διάστημα συντήρησης με τελική τιμή 7,10 log CFU/g. Είναι εμφανές ότι οι τελικοί πληθυσμοί OMX και στις δύο θερμοκρασίες δεν εμφανίζουν μεγάλη διαφορά δεδομένου ότι η συσκευασία κενού είναι μια πολύ σταθερή συσκευασία που αποτρέπει την επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και αποτρέπει την εμφάνιση αλλοιώσεων στη φέτα (James M. Jay et al., 2005). Είναι σημαντικό να τονιστεί όμως ότι η θερμοκρασία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζοντας τις φάσεις ανάπτυξής τους και ειδικότερα σε υψηλότερη θερμοκρασία αναμένεται να επηρεαστεί και περισσότερο η ανάπτυξη (Silva et al., 2018).

Ομοίως στις αερόβιες συνθήκες συσκευασίας οι αρχικοί πληθυσμοί των δειγμάτων CA4, CA10 και στις δύο θερμοκρασίες είναι ίδιες με τις αναερόβιες συνθήκες στην τιμή των 7,32 log CFU/g ενώ τα δείγματα SA4, SA10 είναι σε χαμηλότερους πληθυσμούς 5,62 log CFU/g και 6,62 log CFU/g στους 4°C και 10°C αντίστοιχα. Όπως είναι εμφανές και στο **Διάγραμμα 3.1**, στις αερόβιες συνθήκες οι τελικοί πληθυσμοί όλων των δειγμάτων είναι σε υψηλά επίπεδα και σχετικά ίδιοι καθώς στους 4°C και για τις δύο περιπτώσεις ο τελικός πληθυσμός είναι 8 log CFU/g ενώ τα ίδια δείγματα (CA10,SA10) εμφάνισαν μετά το χρονικό διάστημα των 31 ημερών τελικούς πληθυσμούς 8,43 και 8,94 log CFU/g αντίστοιχα.

Είναι προφανές ότι στις αερόβιες συνθήκες και στους 10°C παρατηρείται υψηλότερο μικροβιακό φορτίο και στις δύο περιπτώσεις συγκριτικά με τις υπόλοιπες συνθήκες, γεγονός που είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι η αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα της φέτας απαρτίζεται κυρίως από γαλακτικά βακτήρια των οποίων η ανάπτυξη ευνοείται

σε αερόβια περιβάλλοντα και σε υψηλότερες συνθήκες εξαιτίας του ότι οι χαμηλότερη θερμοκρασία παρατείνει την φάση προσαρμογής τους (lag phase) (Silva et al., 2018). Επιπρόσθετα οι αναερόβιες συνθήκες είναι πιο σταθερές συγκριτικά με τις αερόβιες συνθήκες δεδομένου ότι οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί της φέτας κυρίως εννοούνται από την παρουσία οξυγόνου στο περιβάλλον ανάπτυξης τους καθώς είναι καθοριστικός παράγοντας για την μικροβιακή τους αύξηση και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών όπως στην περίπτωση των ζυμών (Shi and Maktabdar, 2022).

Στο **Διάγραμμα 3.2** παρατίθεται ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και στις δύο θερμοκρασίες (4°C, 10°C).



Διάγραμμα 3.2: Διάγραμμα ανάπτυξης διασποράς των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε MRS Agar θρεπτικό υπόστρωμα στα δείγματα φέτας σε συσκευασία κενού και αέρα στους 4°C και 10°C, όπου με μπλε (●) απεικονίζονται τα control δείγματα και με γκρι (●) τα δείγματα με το υπερκείμενο υγρό (SA4,SA10) και τα δείγματα με τις εδωδιμες μεμβράνες (FSV4, FSV10)

Πιο συγκεκριμένα στις αναερόβιες συνθήκες στους 4°C, το δείγμα FSV4 ο αρχικός πληθυσμός ήταν 6,98 log CFU/g και μετά το διάστημα των 76 ημερών ο τελικός πληθυσμός ήταν 7,88 log CFU/g. Ελάχιστά πιο μικρή λογαριθμική αύξηση παρουσίασε το δείγμα CCV4 όπου ο πληθυσμός του από 7,12 log CFU/g πήγε 7,99 log CFU/g.

Αντίστοιχες αυξήσεις παρατηρούνται στο ίδιο είδος συσκευασίας στους 10°C (**Διάγραμμα 3.2**). Το δείγμα FSV10 είχε ίδιο αρχικό πληθυσμό με την προηγούμενη θερμοκρασία, 6,98 log CFU/g, ενώ ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων

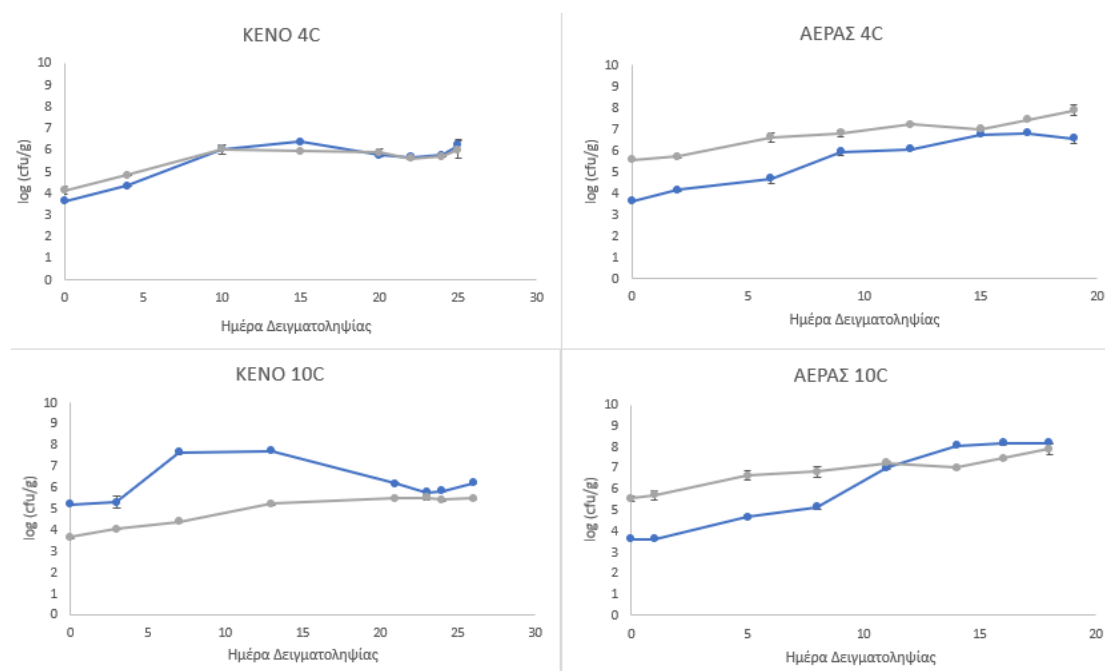
παρουσίασε μια μικρή διακύμανση κατά το πρώτο διάστημα των 20 ημερών καταλήγοντας τελικά στον πληθυσμό των 8,33 log CFU/g την 76^η ημέρα. Ελάχιστα πιο μικρή αύξηση παρουσίασε το δείγμα control (CCV10), το οποίο στην πρώτη δειγματοληψία είχε πληθυσμό περίπου 7,12 log CFU/g και στο τέλος των 76 ημερών εμφάνισε πληθυσμό 8,20 log CFU/g. Είναι εμφανές ότι και στις δύο θερμοκρασίες παρατηρήθηκαν περίπου ίδιες λογαριθμικές αυξήσεις και στα δύο είδη δειγμάτων με ελάχιστα πιο μεγάλη αύξηση να εμφανίζεται στα FSV4,FSV10. Η ελάχιστη αυτή διαφορά πιθανόν να οφείλεται στην ποσότητα υπερκείμενου υγρού τεχνολογικής σημασίας γαλακτικών βακτηρίων, *Lactiplantibacillus plantarum* (L125) και *Lactiplantibacillus pentosus* (L33), που περιέχουν οι συγκεκριμένες εδώδιμες μεμβράνες. Είναι αναγκαίο επίσης να τονιστεί ότι η προστασία και λειτουργικότητα των εδώδιμων μεμβρανών συνδέεται άρρηκτα με την διαπερατότητα και ακεραιότητα της μεμβράνης, το αρχικό μικροβιολογικό φορτίο του προϊόντος καθώς και από τις εξωτερικές συνθήκες που εγκυμονούν κινδύνους επιμόλυνσης (Costa et al., 2018).

Όσον αφορά τα δείγματα υπό αερόβιες συνθήκες, στο **Διάγραμμα 3.2** και τα δύο δείγματα εμφανίζουν πανομοιότυπη πορεία ανάπτυξης και στις δύο θερμοκρασίες διατηρώντας σταθερά και σε υψηλά σχετικά επίπεδα τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα SA4 στους 4°C κατά την πρώτη δειγματοληψία είχε αρχικό πληθυσμό 7,13 log CFU/g ενώ ο τελικός πληθυσμός παρουσίασε μια σταθερή πορεία με μια μικρή και ελάχιστη μείωση φτάνοντας τελικά τον πληθυσμό των 6,85 log CFU/g. Αντίστοιχα για το control (CA4) δείγμα ο τελικός πληθυσμός σε διάστημα 50 ημερών από 7,12 log CFU/g πήγε στα 6,70 log CFU/g.

Παρομοίως στους 10°C, και τα δύο δείγματα εμφανίζουν σχεδόν ίδια πορεία ανάπτυξης οξυγαλακτικών βακτηρίων καταλήγοντας όμως σε υψηλότερους πληθυσμούς συγκριτικά με όλες τις περιπτώσεις. Τα δύο δείγματα, CA10, SA10, έχουν σχεδόν όμοιους τελικούς πληθυσμούς σε διάστημα 31 ημερών, δηλαδή 8,07 log CFU/g και 8,01 log CFU/g αντίστοιχα.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι τελικοί πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε κάθε θερμοκρασία δεν εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση καθώς και στις δύο συσκευασίες οι τελικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν σχεδόν 1 log CFU/g αύξηση ανεξαρτήτου δείγματος και είδος συσκευασίας. Αυτό που πρέπει να ληφθεί υπόψιν είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο εμφανίζεται αυτός ο πληθυσμός καθώς

παρατηρείται ότι στις αερόβιες συνθήκες το διάστημα αλλοίωσης της φέτας είναι 50 και 31 ημέρες στους 4°C και 10°C ενώ στις αναερόβιες συνθήκες χρειάστηκε διάστημα 75 και 76 ημερών αντίστοιχα για να επιτευχθεί ο πληθυσμός αυτός. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό δεδομένου ότι η αερόβιες συνθήκες και η υψηλότερη θερμοκρασία επιταχύνουν τις αλλοιώσεις, μικροβιολογικές και φυσικοχημικές, συγκριτικά με τη συσκευασία κενού που προσφέρει πιο σταθερές συνθήκες. Στην πειραματική μελέτη των Chou et al., (2003) η παραπάνω πρόταση έρχεται σε συμφωνία καθώς σε τυρί cheddar επιταχύνθηκε η αλλοίωση και η παραγωγή γαλακτικού οξέος στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Είναι ευρέως γνωστό ότι η υψηλότερη θερμοκρασία επιταχύνει τον μεταβολισμό των βακτηρίων (Turner και Thomas, 1981). Επιπρόσθετα δεν μπορεί να παραληφθεί το γεγονός ότι υπό αερόβιες συνθήκες αναπτύσσονται οι περισσότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στην φέτα, όπως γαλακτικά βακτήρια, ζύμες και μύκητες, καθιστώντας περιβάλλον ευνοϊκό και για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Shi and Maktabdar, 2021, Papadopoulou et al., 2018, Settanni and Moschetti, 2010).



Διάγραμμα 3.3: Διάγραμμα ανάπτυξης διασποράς ζυμών και μυκήτων σε συσκευασίες κενού και αέρα στους 4°C, 10°C που μετρήθηκαν σε RBC θρεπτικό υπόστρωμα όπου με μπλε (●) απεικονίζονται τα control δείγματα και με γκρι (●) τα δείγματα με το υπερκείμενο υγρό (SA4,SA10) και τα δείγματα με τις εδωδίες μεμβράνες (FSV4, FSV10)

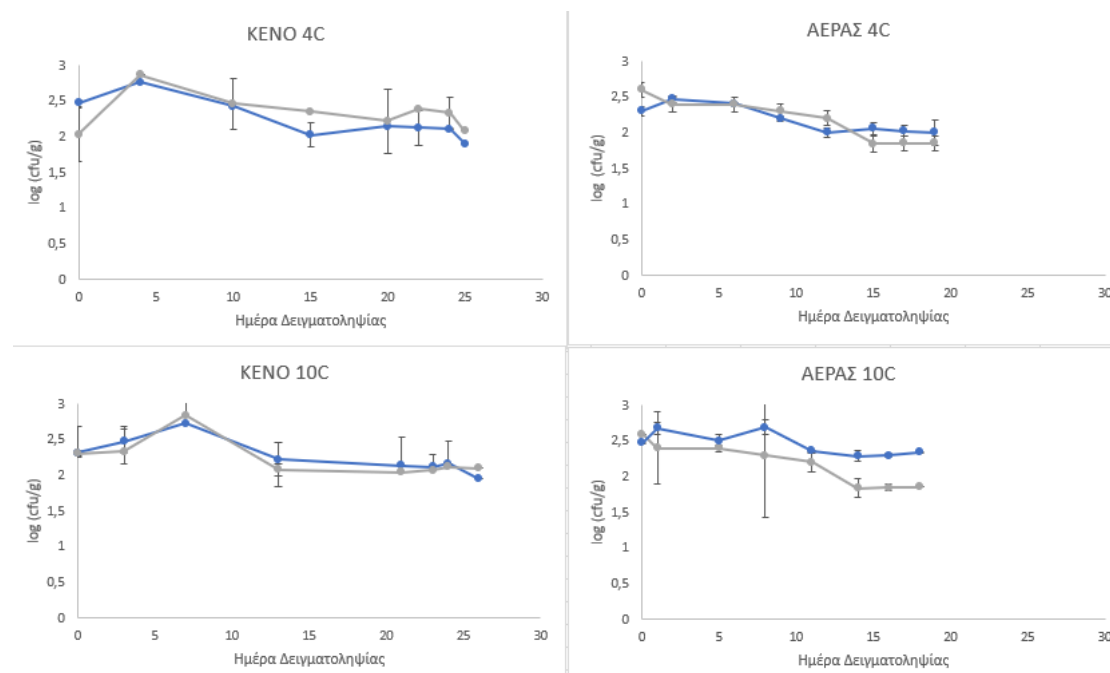
Στο παραπάνω **Διάγραμμα 3.3**, αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των πληθυσμών των ζυμών και μυκήτων στα δείγματα φέτας. Στις αναερόβιες συνθήκες στους 4°C ο αρχικός πληθυσμός το CCV4 ήταν 3,62 log CFU/g ενώ ύστερα από διάστημα 76 ημερών έφτασε

στα 6,22 log CFU/g. Μικρότερη λογαριθμική αύξηση για το ίδιο χρονικό διάστημα παρατηρήθηκε στο δείγμα FSV4 όπου από αρχικό πληθυσμό 4,11 log CFU/g έφτασε στα 5,99 log CFU/g.

Παραπλήσια αποτελέσματα παρατηρούνται και στους 10°C του ίδιου είδους συσκευασίας (κενό), όπου στην συγκεκριμένη περίπτωση οι αρχικοί πληθυσμοί ήταν υψηλότεροι. Συγκεκριμένα για το CCV10 ο τελικός πληθυσμός σε διάστημα 75 ημερών έφτασε τους 6,21 log CFU/g ενώ ο αρχικός πληθυσμός του ήταν 5,20 log CFU/g. Αντίστοιχα το δείγμα FSV10 παρατηρήθηκε αύξηση περίπου 2 log, με τελικό πληθυσμό 6,47 log CFU/g.

Αντίθετα με τις συνθήκες κενού, τα δείγματα φέτα και στις δύο αερόβιες συνθήκες παρουσίασαν μεγάλη αύξηση στους πληθυσμούς των ζυμών και μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα στους 4°C το CA4 παρουσίασε τελικό πληθυσμό 6,58 log CFU/g ενώ ο αρχικός πληθυσμός του ήταν 3,62 log CFU/g. Παραπλήσια αύξηση παρουσίασε και το δείγμα SA4 το οποίο από 4,09 log CFU/g έφτασε τον πληθυσμό των 7 log CFU/g. Αντίστοιχα στους 10°C οι τελικοί πληθυσμοί ήταν εξίσου πολύ υψηλοί και συγκεκριμένα το δείγμα CA10 έφτασε τους 8,19 log CFU/g ενώ το δείγμα SA10 7,88 log CFU/g.

Είναι φανερό ότι οι πληθυσμοί των ζυμών και μυκήτων ευνοούνται από τις αερόβιες συνθήκες καθώς είναι υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί (Μαρκάκη και Μαστρονικολή, 2008). Έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται και να αλλοιώνουν τρόφιμα ακόμη και σε ποσοστό υγρασίας μικρότερο του 85% και να παράγουν μυκοτοξίνες και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι επιζήμιοι για το τρόφιμο, όπως η φέτα. Στις βιομηχανίες τροφίμων η σωστή επιλογή θερμοκρασία συντήρησης παίζει καταλυτικό ρόλο στην εμφάνιση και επιβίωση πολλών μικροβίων όπως και οι μύκητες καθώς οι μύκητες έχουν την ικανότητα επιβίωσης ακόμη και σε χαμηλές σχετικά θερμοκρασίες με μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και εκβλάστησης (Awasti and Anand, 2020, Awasti et al., 2019) Η φέτα είναι ιδανικό για αυτούς περιβάλλον ανάπτυξης αλλά και σε συνδυασμό με υψηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης καθιστούν εμφανή την εντονότερη ανάπτυξή τους στην συσκευασία της φέτας σε αερόβιο περιβάλλον και στους 10°C (Stack et al., 2001, Beuchat et al., 1982).



Διάγραμμα 3.4: Διάγραμμα διασποράς του παθογόνου βακτηρίου *Listeria* υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες στους 4°C, 10°C που μετρήθηκαν σε *Palcam* θρεπτικό υπόστρωμα όπου με μπλε (●) απεικονίζονται τα control δείγματα και με γκρι (●) τα δείγματα με το υπερκείμενο υγρό (SA4,SA10) και τα δείγματα με τις εδωδιμες μεμβράνες (FSV4, FSV10)

Στο **Διάγραμμα 3.4**, αποτυπώνονται οι πληθυσμοί του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στα δείγματα φέτας.

Πιο συγκεκριμένα, στην συσκευασία κενού των 4°C, τα δύο δείγματα φέτας (FSVL4, CCVL4) δεν έχουν μεγάλη απόκλιση μεταξύ τους όσον αφορά τον αρχικό και τελικό πληθυσμό. Παρόλα αυτά το FSVL4 παρουσίασε πιο ομαλή και αργή μείωση στο διάστημα των 76 ημερών συγκριτικά με το CCVL4 παρόλο που ο τελικός πληθυσμός του είναι 2,07 log CFU/g, υψηλότερο συγκριτικά με το 1,89 log CFU/g του control δείγματος.

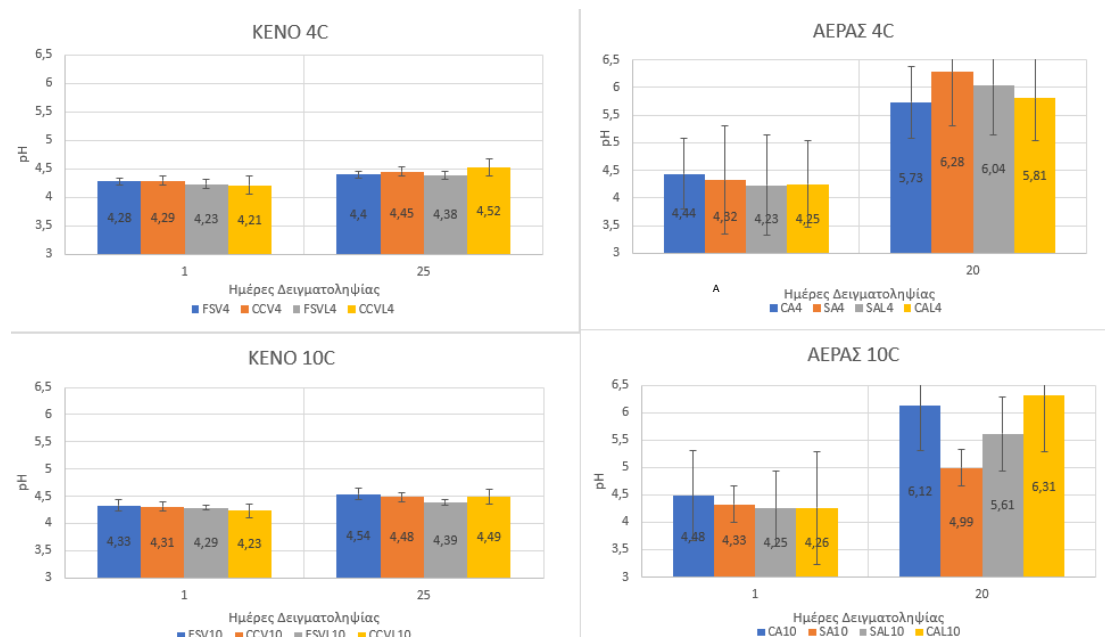
Αντίστοιχη πορεία αποτυπώνεται και στους 10°C όπου για το ίδιο χρονικό διάστημα οι τελικοί πληθυσμοί των FSVL10 και CCVL10 είναι 2,09 log CFU/g και 1,95 log CFU/g αντίστοιχα. Συνεπώς παρατηρείται ότι στις αναερόβιες συνθήκες δεν παρατηρείται αισθητή διαφορά στις τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων φέτας. Ελάχιστη επίδραση φαίνεται να έχει ο ρόλος της εδωδιμης μεμβράνης αλγινικού νατρίου καθώς οι τελικοί πληθυσμοί των δειγμάτων και στις δύο θερμοκρασίες (FSVL4, FSVL10) είναι ελάχιστα χαμηλότεροι συγκριτικά με τα controls (CCVL4, CCVL10). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με πολλά πειραματικά δεδομένα που αποτύπωσαν τον ρόλο και την χρησιμότητα των αλγινικών εδωδιμων μεμβρανών ως προς τη σταθερότητα και την προστασία των

προϊόντων (Yan et al., 2023. Dmitrenko et al., 2021). Δεν μπορεί να παραληφθεί ο ρόλος των γαλακτικών βακτηρίων που εμπεριέχονται στις αλγινικές μεμβράνες έναντι του παθογόνου βακτηρίου καθώς είναι γνωστό ότι τα γαλακτικά βακτήρια έχοντας τη δυνατότητα να παράγουν οργανικά οξέα και άλλους ανασταλτικούς παράγοντες μειώνουν το pH και δημιουργούν ένα περιβάλλον μη φιλικό για την ανάπτυξη του παθογόνου (Belessi et al., 2007).

Στις αερόβιες συνθήκες στους 4°C και 10°C, οι τελικοί πληθυσμοί μετά από 50 και 31 ημέρες αντίστοιχα, είναι σχεδόν παραπλήσιοι σε όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα στους 4°C σε διάστημα 50 ημερών οι τελικοί πληθυσμοί για τα δείγματα CAL4, SAL4 ήταν 2 log CFU/g και 1,85 log CFU/g αντίστοιχα ενώ στους 10°C τα ίδια δείγματα (CAL10, SAL10) έφτασαν σε πληθυσμό 2,34 log CFU/g και 2,91 log CFU/g αντίστοιχα.

Στις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες (συσκευασία κενού στους 4°C και 10°C και συσκευασία αέρα στους 4°C και 10°C) δεν παρατηρείται αισθητή διαφορά όσον αφορά τον τελικό πληθυσμό των δειγμάτων της φέτας. Σε όλα τα δείγματα η μείωση του πληθυσμού είναι περίπου 1 log CFU/g, δεδομένου ότι στα δείγματα κατά την δειγματοληψία είχε ενσωματωθεί εμβόλιο του παθογόνου βακτηρίου της τάξης των 3 log CFU/g. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι οι συσκευασίες των αερόβιων συνθηκών (4°C και 10°C) χρειάστηκαν χρονικό διάστημα 50 και 31 ημερών προκειμένου να επιτευχθεί η 1 log CFU/g μείωση ενώ στον αντίποδα οι συσκευασίες των αναερόβιων συνθηκών (4°C και 10°C) πέτυχαν την ίδια μείωση σχεδόν στο διπλάσιο χρονικό διάστημα (76 ημέρες). Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην δράση πολλών παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα τελικά να περιορίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων και μυκήτων καθώς και η παραγωγή των μεταβολικών τους προϊόντων, όπως οργανικά οξέα, μυκοτοξίνες, αφλατοξίνες και εμφανή μικκύλια (Yan et al., 2023. Dmitrenko et al., 2021). Τέλος ο τελικός πληθυσμός σε όλες τις περιπτώσεις μειώνεται αλλά δεν μηδενίζεται δεδομένου ότι ο καταβολισμός γαλακτικού οξέος από τους μύκητες και τις μούχλες που έχουν αναπτυχθεί αυξάνει το pH των δειγμάτων και ευνοεί την επιβίωση των παθογόνων ακόμη και σε χαμηλούς πληθυσμούς (Hayaloglu and Sevda, 2007).

3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH



Διάγραμμα 3.5 Ραβδόγραμμα των μετρήσεων pH των δειγμάτων φέτας την πρώτη και τελευταία ημέρα δειγματοληψίας υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες στους 4°C, 10°C όπου με μπλε (●) απεικονίζονται τα δείγματα εδώδιμων μεμβρανών (FSV4, FSV10) και τα δείγματα με UHT γάλα (CA4, CA10) στους 4°C και 10°C αντίστοιχα. Με πορτοκαλί (●) απεικονίζονται τα δείγματα με UHT γάλα (CCV4, CCV10) αλλά και τα δείγματα με το υπερκείμενο (SA4,10) στους 4°C, 10°C αντίστοιχα. Με γκρι (●) αναφέρονται τα δείγματα εδώδιμων μεμβρανών με *L. monocytogenes* (FSVL4, FSVL10) και δείγματα με UHT γάλα με *L. monocytogenes* (CAL4, CAL10) στους 4°C και 10°C αντίστοιχα. Τέλος με κίτρινο (●) αναγράφονται τα δείγματα με UHT γάλα με *L. Monocytogenes* (CCVL4, CCVL10, CAL4, CAL10) στους 4°C και 10°C αντίστοιχα

Από το **Διάγραμμα 3.5** είναι εμφανές ότι το pH ακολουθεί αυξητική τάση σε όλα τα δείγματα φέτας που αναλύθηκαν, συγκριτικά με την πρώτη δειγματοληψία, γεγονός που υπογραμμίζει την άρρηκτη σχέση του pH με την διάρκεια συντήρησης. Πιο υψηλές τιμές pH σε όλα τα δείγματα εμφανίστηκαν στις αερόβιες συνθήκες και στις δύο θερμοκρασίες χωρίς μεγάλες διαφορές γεγονός που δείχνει ότι η τόσο μικρή διαφορά θερμοκρασίας δεν επηρεάζει έντονα την μεταβολή του pH. Οι αερόβιες συνθήκες συγκριτικά με τις αναερόβιες έχουν ορισμένες διαφορές. Όπως είναι εμφανές και στο παραπάνω **Διάγραμμα 3.5**, οι τιμές pH σε όλα τα δείγματα φέτας και στις δύο θερμοκρασίες παραμένουν σχετικά σταθερές γύρω στο 4,50 με πολύ μικρές μεταβολές στο χρονικό διάστημα των 76 ημερών. Τα δείγματα μεταξύ τους είχαν παραπλήσιες τιμές με μεγαλύτερη το 4,49 του δείγματος CCV10 την 76^η ημέρα δειγματοληψίας.

Στον αντίποδα, οι τιμές pH στις αερόβιες συνθήκες σημείωσαν μεγαλύτερη αυξητική τάση φτάνοντας μέχρι και την τιμή 6,31 την 31^η ημέρα δειγματοληψίας δείγματος για το δείγμα CAL10. Τα αποτελέσματα αυτά είναι λογικά και έρχονται σε συμφωνία με

πολλές πειραματικές μελέτες. Είναι γνωστό ότι η φέτα είναι ένα όξινο τρόφιμο. Παρόλα αυτά η μικροβιακή χλωρίδα που αναπτύσσεται στην επιφάνειά της επηρεάζει άμεσα το pH του προϊόντος όπως η παρουσία ζυμών και μυκήτων (στον αέρα και στις δύο θερμοκρασίες οι ζύμες και οι μύκητες άγγιζαν τους πληθυσμούς περίπου 9,50 log CFU/g) όπου με τα μεταβολικά τους προϊόντα αλλά και την εμφάνιση υφών και μικκυλίων μειώνουν τα επίπεδα γαλακτικού οξέος και αυξάνουν το pH (Varsha and Nampoothiri, 2015, Belessi et al., 2007, Beuchat, 1982).

3.3 Αποτελέσματα μέτρησης ενεργότητας νερού (a_w)

Κατά την πρώτη μέρα δειγματοληψίας (day 1) τα δείγματα είχαν παραπλήσιες τιμές a_w , κοντά στο 0,95-0,96, ανεξαιρέτως θερμοκρασίας και είδους συσκευασίας. Μετά το διάστημα των 31 ημερών για την συσκευασία αέρα στους 10°C οι τιμές των δειγμάτων ήταν γύρω στο 0,97 ενώ στους 4°C περίπου 0,99. Ελάχιστα μικρότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην συσκευασία κενού μετά από διάστημα 76 ημερών όπου μετρήθηκαν τιμές περίπου 0.96 και στις δύο θερμοκρασίες.

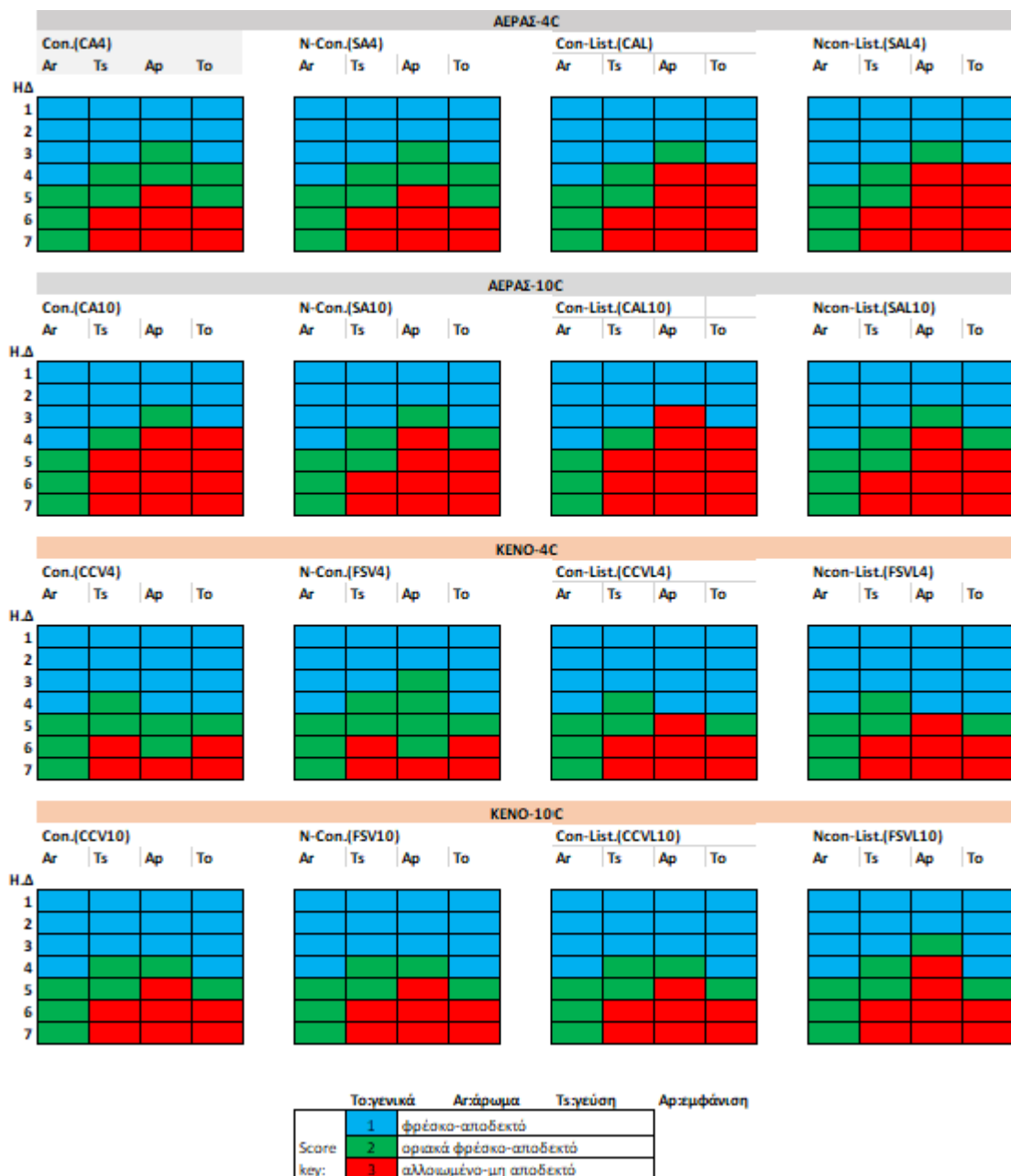
Οι τιμές της ενεργότητας νερού παραμένουν σχετικά σταθερές και σε υψηλά σχετικά επίπεδα. Τα υψηλά επίπεδα ενεργότητας νερού είναι λογικά δεδομένου ότι η φέτα είναι ένα γαλακτοκομικό τρόφιμο πλούσιο σε σχετική υγρασία (Papavasiliou et al., 2019, Φράγκου Δ., 2013, Sarantinopoulos et al., 2001). Η διάρκεια συντήρησης και η θερμοκρασία φαίνεται να μην επηρέασαν αισθητά τις τιμές της ενεργότητας νερού καθώς ακόμη και στην περίπτωση των αναερόβιων συνθηκών με διάρκεια συντήρησης 76 ημέρες και στις δύο θερμοκρασίες τα επίπεδα του a_w παρέμειναν σχετικά σταθερά με μικρή αύξηση. Τέλος τα γαλακτικά βακτήρια ως η κυρίαρχη μικροβιακή χλωρίδα της φέτας τείνουν να διατηρήσουν την ενεργότητα νερού σε υψηλά επίπεδα και να μην επηρεαστεί αισθητά από την ανάπτυξη των ζυμών καθώς οι στις συνθήκες αυτές είναι ικανά να πραγματοποιήσουν την εκβλάστηση των σπορίων τους, την αξιοποίηση θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξή τους αλλά και την παραγωγή διάφορων μεταβολικών προϊόντων (οργανικά οξέα) (Perlat et al., 2012, Beuchat, 1982).

3.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου

Τα αποτελέσματα από τον οργανοληπτικό έλεγχο παρατίθενται στην **Εικόνα 12**. Οι εδώδιμες μεμβράνες επηρέασαν αισθητά την εμφάνιση και την γεύση, όπως αποτυπώνονται και στην συνολική βαθμολογία και στις δύο θερμοκρασίες. Ειδικότερα

οι εδωδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου, εξαιτίας του γεγονότος ότι κατασκευάστηκαν από το υπερκείμενο υγρό των δύο γαλακτικών βακτηρίων που επωάστηκαν σε MRS Broth, είχαν υποκίτρινό χρώμα, δίνοντας και στα δείγματα φέτας αυτήν την εμφάνιση. Όσον αφορά τις άλλες παραμέτρους, το άρωμα επηρεάστηκε λιγότερο από όλα, καθώς μόνο ύστερα από διάστημα 20-30 ημερών εκδηλώθηκε ταγγή οσμή.

Η μεγαλύτερη τιμή (3) παρατηρείται στις αερόβιες συνθήκες και κυρίως στους 10°C. Είναι εμφανές ότι μετά το διάστημα των 20 ημερών όλοι σχεδόν οι παράμετροι του οργανοληπτικού ελέγχου βαθμολογούνται με τον χείριστο βαθμό ενώ συγκριτικά στις αναερόβιες συνθήκες αυτό εμφανίζεται σχεδόν στο διπλάσιο χρονικό διάστημα (69 ημέρες). Είναι γνωστό ότι παράγοντες όπως οξυγόνο (O₂), υψηλή θερμοκρασία, επιταχύνουν τις χημικές και μικροβιακές αντιδράσεις και μειώνουν την διάρκεια ζωής (shelf-life) των προϊόντων, δηλαδή το χρονικό διάστημα στο οποίο το τρόφιμο είναι μικροβιολογικά σταθερό και κατάλληλο προς κατανάλωση (Man D., 2015).



Εικόνα 12. Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων φέτας υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες στους 4°C, 10°C

3.5 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων

3.5.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR) και της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)

Οι βιοχημικές και μικροβιολογικές αλλαγές που γίνονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως είναι και το τυρί φέτα, είναι εφικτό να ανιχνευθούν με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας υπερύθρου FTIR. Το γεγονός αυτό είναι εφικτό καθώς παρατηρούνται χαρακτηριστικές περιοχές στο φάσμα οι οποίες μπορούν να προβλέψουν μια

αντίστοιχη μικροβιολογική και βιοχημική αλλοίωση (Moran, 2021, Foda et al., 2013). Πειραματικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες τυριών προκειμένου να διασφαλιστεί η μέγιστη ποιότητά τους και η ασφάλεια των καταναλωτών (Saji et al., 2024). Επιπροσθέτως, η χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας FTIR ως ταχεία μέθοδο ανάλυσης έχει απασχολήσει σημαντικά μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας χρησιμοποιώντας την για την εκτίμηση και το χαρακτηρισμό του μικροβιολογικού φορτίου του επικρατέστερου μικροοργανισμού σε τυριά ιταλικού τύπου. Αυτό συνέβη στο πείραμα των Turhan και Oner (2015) οι οποίοι μεταξύ άλλων τεχνικών χρησιμοποίησαν και τη μέθοδο FTIR ως ταχεία μέθοδο ανάλυσης και προσδιορισμού των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) στα ιταλικά τυριά τύπου pasta filata. Παρόμοιες προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν και από τους Foda et al. (2013) οι οποίοι εφάρμοσαν την φασματοσκοπία υπέρυθρου FTIR σε λευκά μαλακά τυριά εμπορίου προκειμένου να ανιχνεύσουν την χημική σύστασή τους (περιεκτικότητα σε λιπαρά, πρωτεΐνες, ιχνοστοιχεία κλπ).

Στην συγκεκριμένη εργασία, από τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR που συλλέχθηκαν, μελετήθηκε η περιοχή μεταξύ 1900 και 800 cm^{-1} . Για την φέτα, οι σημαντικές κορυφές παρατηρούνται στα 1627-1631 cm^{-1} λόγω της παρουσίας νερού (δονήσεις τάσης H-O) και αμιδίου I, στα 1450 cm^{-1} εξαιτίας της απορρόφησης από όξινα αμινοξέα καθώς και εστερικές και αλειφατικές αλυσίδες λιπαρών οξέων (δονήσεις τάσεις C-O). Δονήσεις από αμίδιο III (δονήσεις τάσης C-N και C-O, N-H δεσμοί) παρατηρούνται στα 1225 cm^{-1} και 1230 cm^{-1} στην συσκευασία αέρα και κενού αντίστοιχα. Τέλος κορυφές στα 1450 cm^{-1} , 1147 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 1084 και 900 cm^{-1} παρουσιάζονται εξαιτίας των δεσμών C-C και δονήσεις τάσης C=O. Εν κατακλείδι, η περιοχή των 1900 και 800 cm^{-1} είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για την χημική όσο και για την οργανοληπτική ανάλυση των τυριών καθώς μεταξύ αυτής της περιοχής ανιχνεύονται σήματα C-O, C=O, C-H δεσμών καθώς και εστέρες και λιπαρά οξέα τα οποία συνολικά συμβάλλουν στην διαμόρφωση της ποιότητας και των χαρακτηριστικών του κάθε τυριού (Foda et al., 2013).

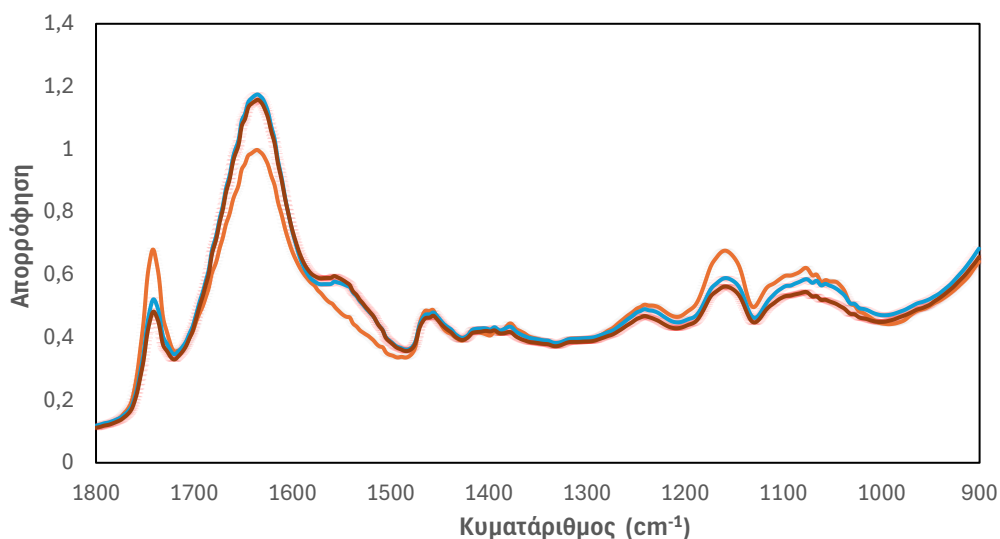
Στα **Διαγράμματα 3.6-3.7** αποτυπώνονται τα χαρακτηριστικά φάσματα των δειγμάτων φέτας με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR). Ύστερα από οπτική παρατήρηση των φασμάτων γίνεται αντιληπτό πως και στα δύο είδη διαγραμμάτων δεν παρατηρούνται τεράστιες διαφορές εξαιρουμένων κάποιων συγκεκριμένων περιοχών. Πιο συγκεκριμένα στα 1150 cm^{-1} παρατηρείται μια

διαφοροποίηση μεταξύ των κορυφών με τα φρέσκα δείγματα (πορτοκαλί) να εμφανίζουν υψηλότερη απορρόφηση συγκριτικά με αυτές των αλλοιωμένων δειγμάτων φέτας στους 4°C (μπλε) και 10°C (κόκκινο). Επιπρόσθετα στα 1650 cm⁻¹ παρατηρούνται υψηλές κορυφές και στις δύο θερμοκρασίες με αυτή στους 10°C (κόκκινο) στις αερόβιες συνθήκες (**Διάγραμμα 3.6**) να είναι ελάχιστα υψηλότερη. Γενικότερα η περιοχή μεταξύ 1586 cm⁻¹ και 1698 cm⁻¹ είναι ύψιστης σημασίας για την εκτίμηση της αλλοίωσης των τροφίμων όπως και η φέτα καθώς στην περιοχή αυτή γίνεται αντιληπτή η απορρόφηση C-C, C=C, C-N, N-H δεσμών καθώς και πρωτεϊνών όπως του αμιδίου I και αμιδίου II (Ferragina et al., 2013).

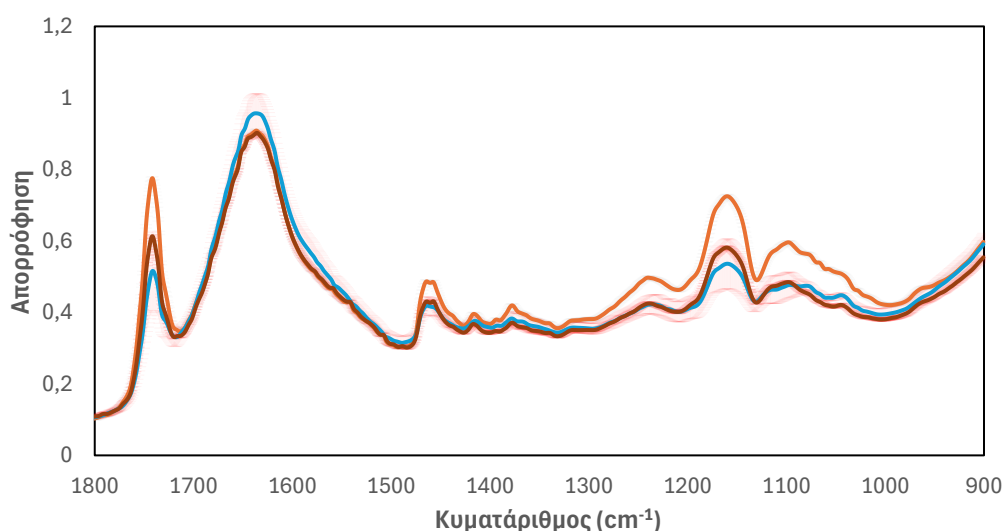
Στα **Διάγραμματα 3.8-3.9** αποτυπώνονται τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα της πολυφασματικής επεικόνισης (MSI) με την χρήση των δυο οργάνων. Η ανάκλαση του φωτός ως συνάρτηση του μήκους κύματος που έχει ανακλαστεί στην συγκεκριμένη περιοχή εξαιτίας κάποιου στερεού, αερίου ή υγρού προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τις αλλαγές στους δεσμούς και στην σύνθεση του τροφίμου (Clark, R. N., 1995). Στο όργανο VideometerLite δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην ανάκλαση στα δύο είδη συσκευασιών, σημειώνοντας υψηλότερη ανάκλαση και στα δύο, περίπου στα 600 nm. Αντίθετα στο όργανο VideometerLab παρατηρούνται μεγαλύτερες διαφορές στην ανάκλαση μεταξύ των δύο ειδών συσκευασιών. Συγκεκριμένα στην συσκευασία κενού η ανάκλαση των αλλοιωμένων δειγμάτων φέτας και στις δύο θερμοκρασίες είναι υψηλότερη και πιο κοντά στην ανάκλαση των φρέσκων δειγμάτων φέτας σε αντίθεση με την συσκευασία του αέρα όπου η ανάκλαση των αλλοιωμένων δειγμάτων και στις δύο θερμοκρασίες είναι χαμηλότερη και απέχει περισσότερο από την ανάκλαση των φρέσκων δειγμάτων.

Στην συγκεκριμένη πειραματική μελέτη τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας με την μέθοδο του FT-IR καθώς και του MSI (**Διαγράμματα 3.6-3.9**) δεν μπορούν να αποτελέσουν την βάση για την ανάλυση της φέτας στα περεταίρω συστατικά της καθώς τα φάσματα δεν είναι εντελώς διακριτά, και υπάρχει μεγάλος κίνδυνος παρερμηνευσής τους. Παρόλα αυτά αντίστοιχες έρευνες σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα αλλά και όχι μόνο, επιτρέπουν την ανάλυσή τους μέσω αυτών των δύο μεθόδων όπως πραγματοποιήθηκε από τους Subramanian et al. (2011) στο τυρί cheddar το οποίο αναλύθηκε μέσω της μεθόδου FT-IR προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρακολούθηση των οργανικών οξέων και αμινοξέων του τυριού. Άλλες πειραματικές μελέτες σε σπόρους ζαχαρότευτλων έδωσαν χρήσιμες πληροφορίες για την αλλοίωσή

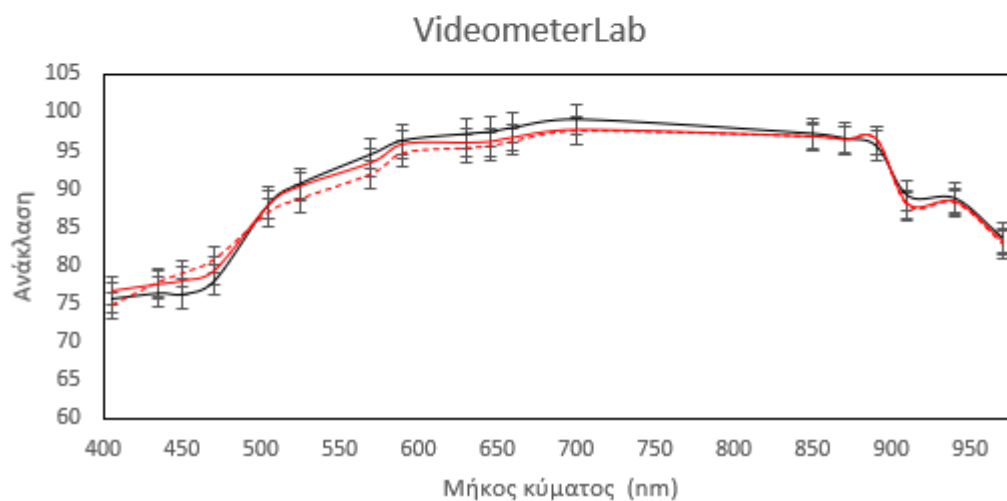
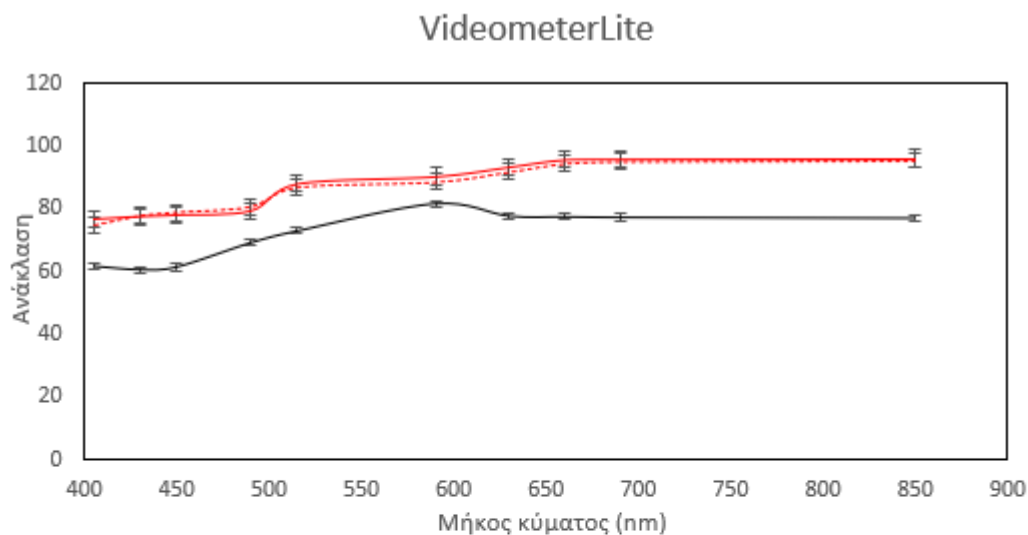
τους μέσω της μεθόδου της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και του οργάνου VideometerLab (Salimi and Boelt, 2019). Παρομοίως οι Feng et al. (2017) διερεύνησαν την χρήση της μεθόδου της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) σε ωμά αλλά και επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος εδραιώνοντάς την ως μια ταχεία και μη επεμβατική τεχνική που επιτρέπει την εκτίμηση της ποιότητας και ασφάλειας των προϊόντων κρέατος και διευκολύνει την ανάλυσή τους και σε βιομηχανικό επίπεδο.



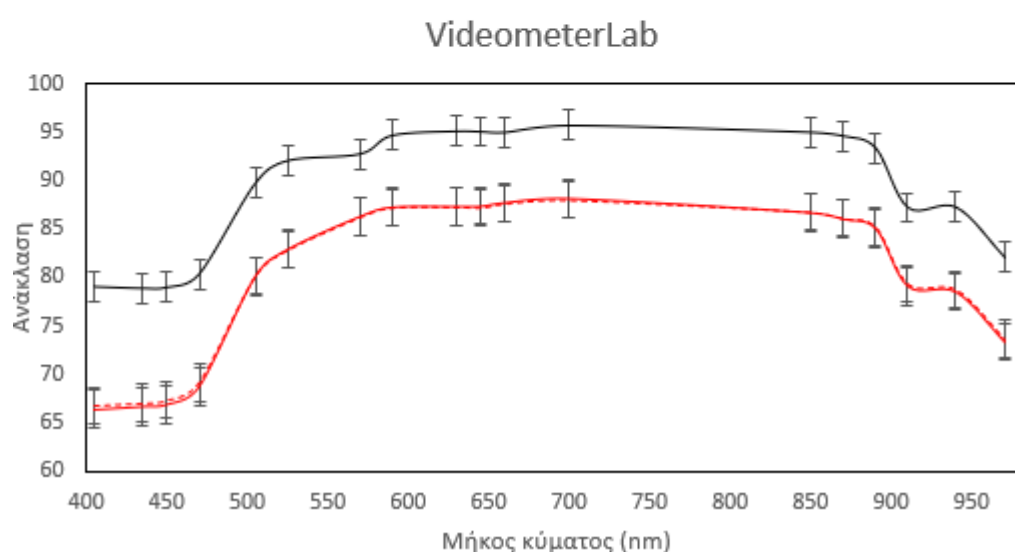
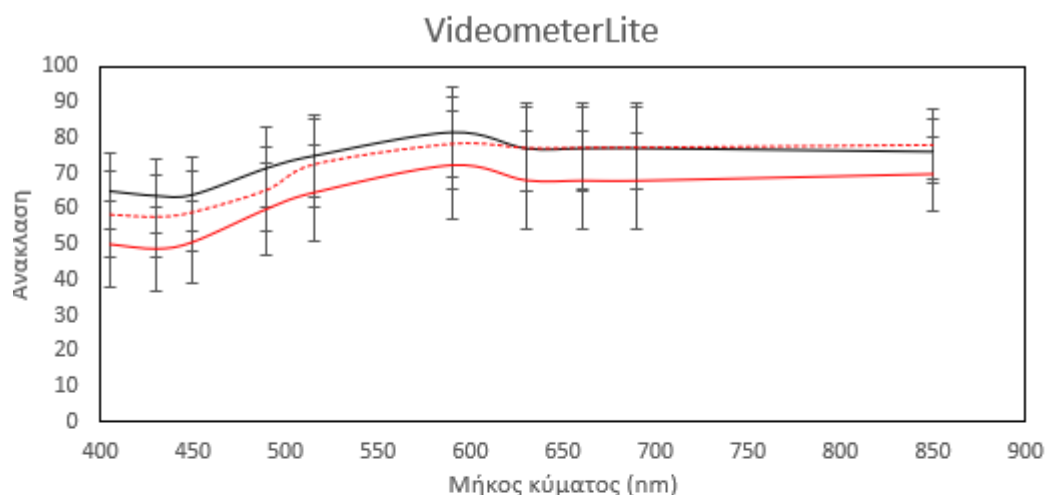
Διάγραμμα 3.6: Διάγραμμα των μέσων όρων και τυπικών αποκλίσεων των απορροφήσεων των φρέσκων δειγμάτων φέτας (πορτοκαλί), των αλλοιωμένων δειγμάτων φέτας στον αέρα στους 4°C (μπλε) και στους 10 °C (κόκκινο)



Διάγραμμα 3.7: Διάγραμμα των μέσων όρων και τυπικών αποκλίσεων των απορροφήσεων των φρέσκων δειγμάτων φέτας (πορτοκαλί), των αλλοιωμένων δειγμάτων φέτας στο κενό στους 4°C (μπλέ) και στους 10 °C (κόκκινο)



Διάγραμμα 3.8: Διάγραμμα των μέσων όρων και τυπικών αποκλίσεων των ανακλάσεων ως συνάρτηση του μήκους κύματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (μαύρο), των αλλοιωμένων δειγμάτων φέτας στο κενό στους 4°C (κόκκινο) και στους 10 °C (κόκκινο-διακεκομμένο) για τα όργανα VideometerLite (πάνω) και VideometerLab (κάτω)



Διάγραμμα 3.9: Διάγραμμα των μέσων όρων και τυπικών αποκλίσεων των ανακλάσεων ως συνάρτηση του μήκους κύματος των φρέσκων δειγμάτων φέτας (μαύρο), των αλλοιωμένων δειγμάτων φέτας στον αέρα στους 4°C (κόκκινο) και στους 10 °C (κόκκινο-διακεκομμένο) για τα όργανα VideometerLite (πάνω) και VideometerLab (κάτω)

3.5.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square-Regression, PLS-R)

Για την εκτίμηση του πληθυσμού της OMX στα δείγματα φέτας κατά την συντήρησή της, κατασκευάστηκαν έξι διαφορετικά μοντέλα ανάλογα με το όργανο και την συσκευασία. Αναλυτικότερα για κάθε όργανο, FT-IR 6200 JASCO, VideometerLab, VideometerLite, κατασκευάστηκαν δύο μοντέλα. Στους πίνακες (Πίνακες 3.1-3.2) απεικονίζονται οι δείκτες απόδοσης του κάθε μοντέλου κατά την ανάπτυξη, επικύρωση και πρόβλεψή με σκοπό την αξιολόγησή του. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή των μοντέλων αναφέρονται στην **Ενότητα 2.11.1**.

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων για τα δεδομένα των τριών οργάνων στις αερόβιες συνθήκες

ΟΡΓΑΝΟ	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	SLOPE	OFFSET	R ²	RMSE
FTIR 6200 JASCO	Ανάπτυξη (n=171)	0,13	7,48	0,13	0,08
	Επικύρωση (CV)	0,24	5,90	0,01	0,10
	Πρόβλεψη (n=76)	0,31	5,31	0,09	0,86
VIDEOMETER LAB	Ανάπτυξη (n=177)	0,27	6,29	0,27	0,08
	Επικύρωση (CV)	0,39	4,56	0,17	0,09
	Πρόβλεψη (n=76)	0,30	5,26	0,27	0,82
VIDEOMETER LITE	Ανάπτυξη (n=88)	0,23	6,44	0,23	0,78
	Επικύρωση (CV)	0,37	4,58	0,39	0,83
	Πρόβλεψη (n=39)	0,51	3,64	0,23	0,78

Για τα δεδομένα του **Πίνακα 3.1** για το όργανο FTIR παρατηρείται ότι το μοντέλο δεν προβλέπει ικανοποιητικά τα μικροβιολογικά δεδομένα της OMX. Αυτό τεκμηριώνεται από τις τιμές του R² και του RMSE κατά την πρόβλεψη του μοντέλου καθώς έχουν τιμές 0,09 και 0,86 αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στα δύο άλλα όργανα με τιμές για το R² και το RMSE 0,27 και 0,82 για το VideometerLab και 0,23 και 0,78 VideometerLite αντίστοιχα. Είναι εμφανές ότι κανένα από τα τρία όργανα δεν μπόρεσε να συσχετίσει ικανοποιητικά τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX. Η μη ικανοποιητική αυτή συσχέτιση πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το εύρος της OMX δεν ήταν αρκετά μεγάλο ώστε να μπορέσουν να αναπτυχθούν επιτυχώς τα μοντέλα. Επίσης οι τιμές της OMX για τις αερόβιες συνθήκες δεν παρουσίαζαν μεγάλες διακυμάνσεις ήδη από την 3^η δειγματοληψία, όπως φαίνεται και στην Ενότητα 3.1.1 γεγονός που συνέβαλλε αισθητά στην μη ικανοποιητική πρόβλεψη στα μοντέλα.

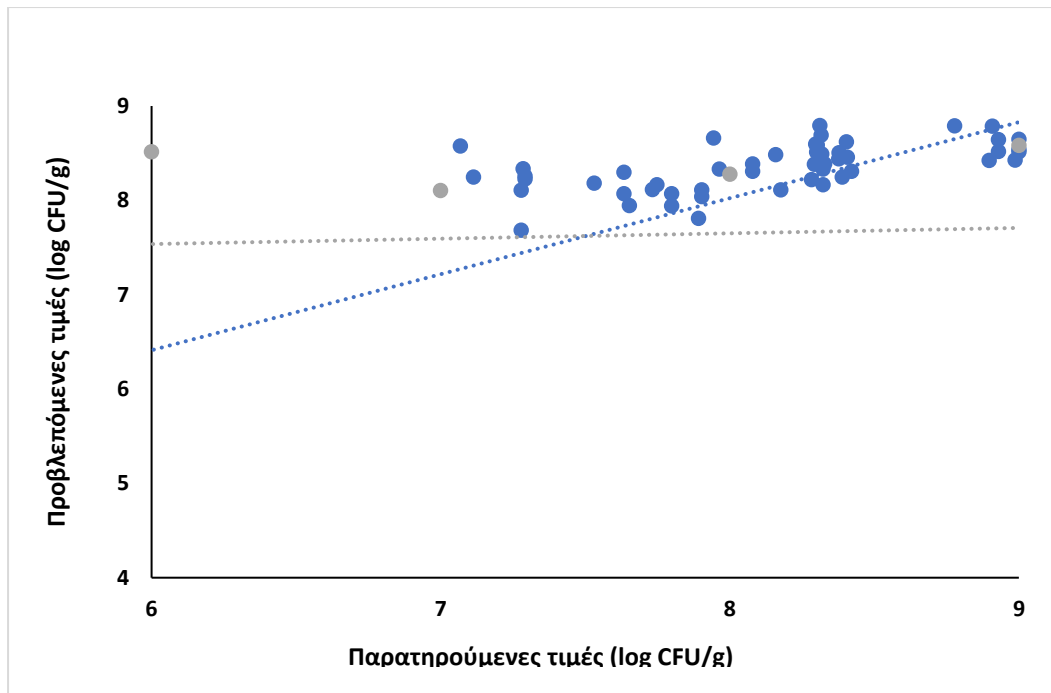
Όμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στις αναερόβιες συνθήκες (**Πίνακας 3.2**) καθώς το εύρος της OMX ήταν και στις συνθήκες αυτές μικρό και στις δύο θερμοκρασίες. Αναλυτικότερα στο FTIR στην πρόβλεψη του μοντέλου το R² και το RMSE σημειώνουν 0,34 και 0,53 αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στα δύο άλλα όργανα με τιμές για το R² και το RMSE 0,31 και 0,55 για το

VideometerLab και -0,20 και 0,83 VideometerLite αντίστοιχα. Όπως είναι εμφανές και στην περίπτωση των αναερόβιων συνθηκών τα δεδομένα και των τριών οργάνων δεν συσχετίζονται ικανοποιητικό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.

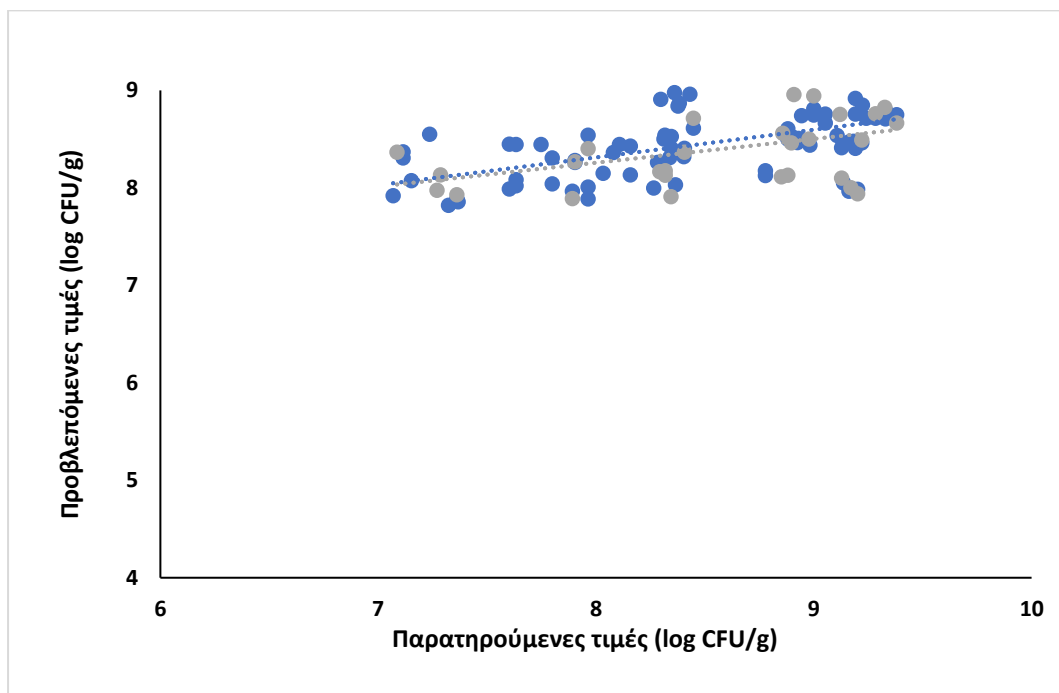
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων για τα δεδομένα των τριών οργάνων στις αναερόβιες συνθήκες στους 4°C και 10°C

ΟΡΓΑΝΟ	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	SLOPE	OFFSET	R ²	RMSE
FTIR 6200 JASCO	Ανάπτυξη (n=168)	0,18	6,92	0,18	0,06
	Επικύρωση (CV)	0,05	7,19	0,25	0,59
	Πρόβλεψη (n=72)	0,80	1,57	0,34	0,53
VIDEOMETER LAB	Ανάπτυξη	0,25	6,22	0,26	0,57
	Επικύρωση (CV) (n=179)	0,24	6,30	0,13	0,62
	Πρόβλεψη (n=78)	0,28	6,03	0,31	0,55
VIDEOMETER LITE	Ανάπτυξη (n=67)	0,27	5,77	0,27	0,61
	Επικύρωση (CV)	0,20	6,45	0,19	0,65
	Πρόβλεψη (n=29)	-0,01	8,00	-0,20	0,83

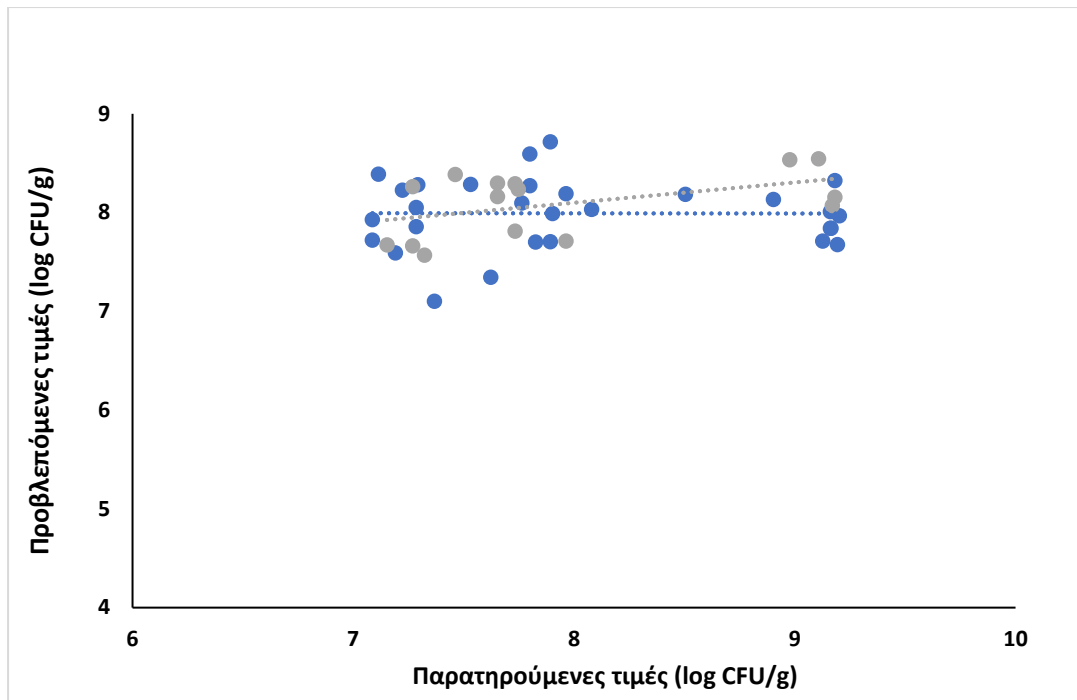
Στα παρακάτω διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών (**Διαγράμματα 3.10-3.15**) φαίνονται τα προαναφερόμενα αποτελέσματα σε σχέση με την ευθεία $y = ax + \beta$, όπου το a αποτελεί την κλίση της ευθείας και β τον σταθερό όρο.



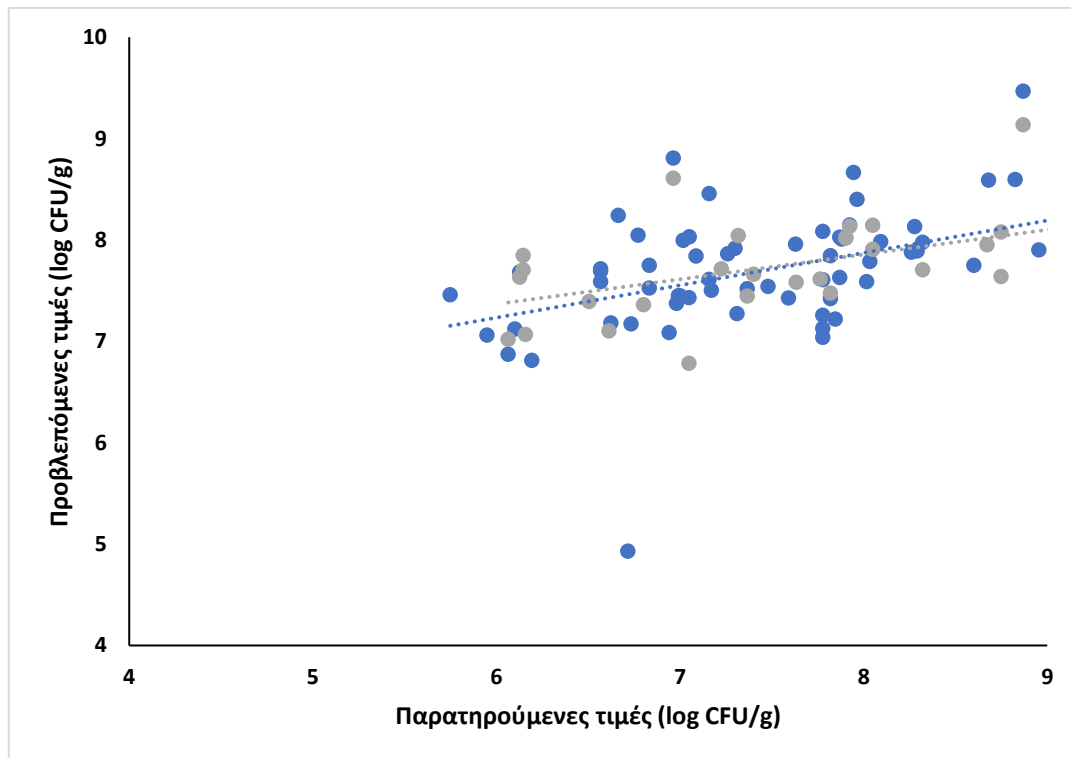
Διάγραμμα 3.10: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τα δεδομένα από το FTIR 6200 JASCO για δείγματα σε αναερόβιες συνθήκες



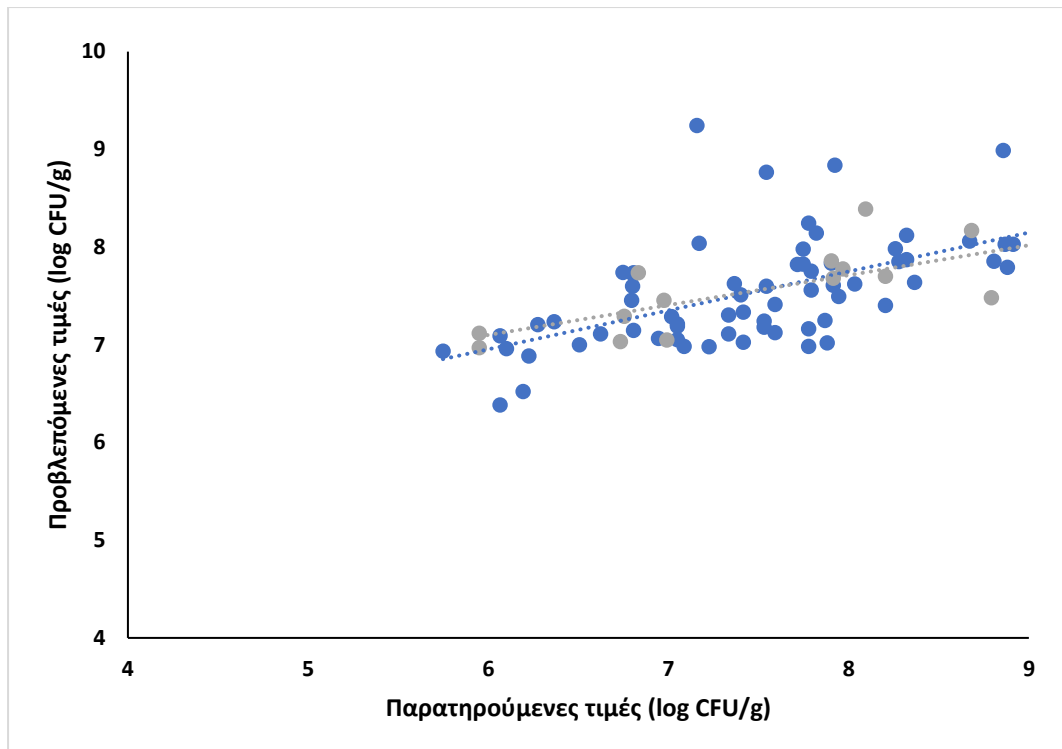
Διάγραμμα 3.11: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τα δεδομένα από το VideometerLab για δείγματα σε αναερόβιες συνθήκες



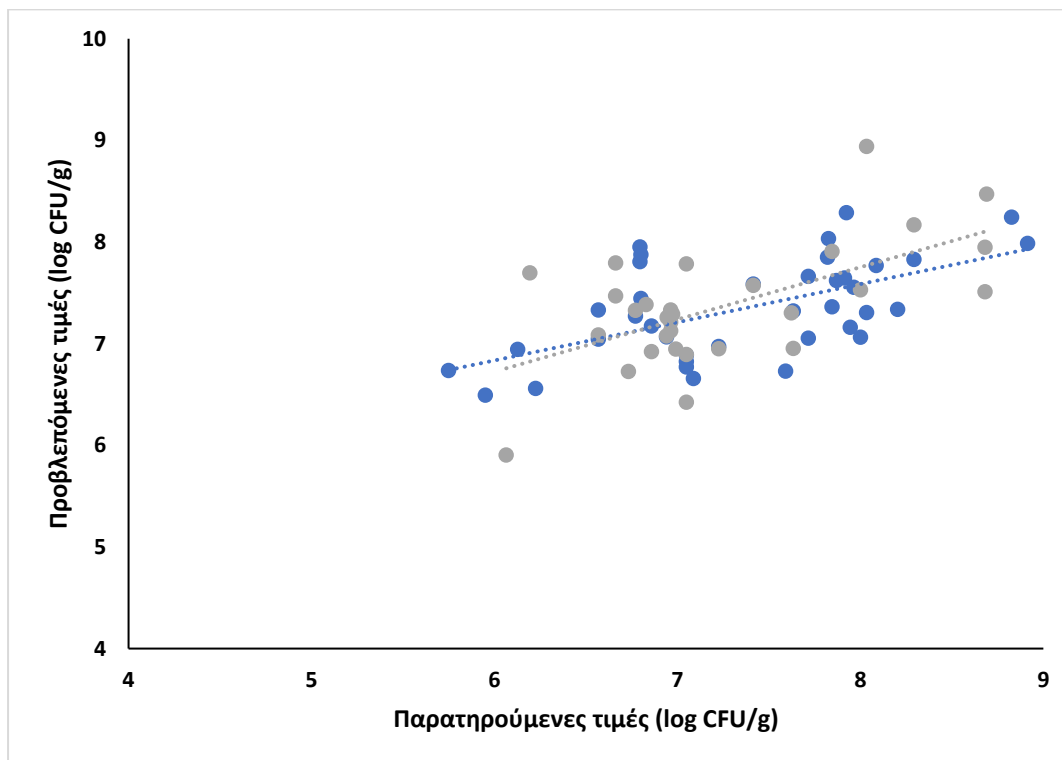
Διάγραμμα 3.12: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τα δεδομένα από το VideometerLite για δείγματα σε αναερόβιες συνθήκες



Διάγραμμα 3.13: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τα δεδομένα από το FTIR 6200 JASCO για δείγματα σε αερόβιες συνθήκες



Διάγραμμα 3.14: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τα δεδομένα από το VideometerLab για δείγματα σε αερόβιες συνθήκες



Διάγραμμα 3.15: Συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τα δεδομένα από το VideometerLite για δείγματα σε αερόβιες συνθήκες

Συνολικά από τα παραπάνω διαγράμματα είναι φανερό ότι η συσχέτιση των τιμών της επικύρωσης και της πρόβλεψης για την εκτίμηση της OMX δεν είναι ικανοποιητική καθώς η διασπορά δεν είναι ιδανική έτσι ώστε να προκύψουν τα σωστά συμπεράσματα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται όπως και στην προαναφερθείσα περίπτωση στο μικρό εύρος τιμών των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων της OMX. Είναι φανερό πως τα δείγματα στις αναερόβιες συνθήκες εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα (με βάση τις τιμές RMSE και R^2) σε όλα τα όργανα συγκριτικά με τις αερόβιες συνθήκες. Συγκεκριμένα για να χαρακτηριστεί μια τιμή του slope (κλίσης) ικανοποιητική θα πρέπει να είναι κοντά στην μονάδα (1) καθώς η κλίση της γραμμής παλινδρόμησης απεικονίζει την σχέση μεταξύ των μεταβλητών. Στις αναερόβιες συνθήκες και στα τρία όργανα οι τιμές του slope ήταν πολύ χαμηλές γεγονός που υποδηλώνει μια αδύναμη σχέση μεταξύ των μεταβλητών. Αντίστοιχα οι τιμές του offset (μετατόπιση) δείχνουν το πόσο κοντά είναι η μετατόπιση στο μέσο όρο της μεταβλητής απόκρισης (y-intercept). Υψηλότερη τιμή στις αναερόβιες συνθήκες παρατηρήθηκε στο όργανο FTIR 6200 JASCO (5,31) ενώ στα άλλα δύο όργανα οι τιμές ήταν χαμηλότερες γεγονός που δείχνει ότι και για τα τρία όργανα η μετατόπιση δεν είναι ικανοποιητική, δηλαδή η γραμμή παλινδρόμησης δεν διέρχεται από το κέντρο των δεδομένων.

Ομοίως στις αερόβιες συνθήκες οι τιμές των δύο παραμέτρων (slope, offset) και για τα τρία όργανα ήταν παρόμοιες με αυτές των αναερόβιων. Αναφορικά το όργανο VideometerLite ήταν το μοναδικό όπου σημείωσε αρνητική κλίση (slope= -0,01) στις αναερόβιες συνθήκες γεγονός που δείχνει αρνητική σχέση μεταξύ των μεταβλητών ενώ παρατηρήθηκε υψηλότερη όλων offset (8,00) τιμή όμως που δεν μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική. Συνεπώς τα αποτελέσματα των **Πινάκων 3.1-3.2** δεν μπορούν να αποτελέσουν κριτήρια για την σωστή αξιολόγηση των μοντέλων. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον στο μέλλον να σχεδιαστούν μοντέλα συσχέτισης και ερμηνείας των αποτελεσμάτων όχι με βάση τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX αλλά με βάση την μεταβολή των οργανοληπτικών αποτελεσμάτων.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αυτά έρχονται τα αποτελέσματα άλλων πειραματικών μελετών σε τυρί cheddar όπου η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων αποδείχθηκε αρκετά αποτελεσματική στην μελέτη συσχέτισης των μη πτητικών μεταβολιτών (οργανικά οξέα και ελεύθερα λιπαρά οξέα) με το οργανοληπτικό προφίλ του τυριού αποδεικνύοντας ότι τα μη πτητικά αυτά συστατικά έχουν στενή συσχέτιση με την γεύση (ξινό, umami) (Xiang et al., 2023). Επιπρόσθετα σε αντίστοιχη περαματική

μελέτων των Papadopoulou et al. (2018) σε φέτα σημειώθηκαν τιμές R^2 και RMSE 0,75 και 0,37 που υποδηλώνουν ικανοποιητική ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Ομοίως, η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων διευκόλυνε την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων στο πείραμα των Saji et al. (2024), ελέγχοντας όλη την περιοχή του φάσματος ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), πετυχαίνοντας πολύ καλή αποτελεσματικότητα πρόβλεψης (με βάση τις τιμές R^2) δίνοντας καίριες πληροφορίες για την ποιότητα του γάλακτος.

3.5.3 Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως και η φέτα, είναι τρόφιμα με υψηλή διατροφική και εμπορική αξία και για το λόγο αυτό η ανάγκη διασφάλισης της αξίας τους αλλά και η παρεμπόδιση νόθευσής τους είναι ιδιαίτερα σημαντική (Rohenkohl et al., 2011). Σε πειραματική μελέτη των Teixeira et al (2021) η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) αποδείχθηκε αρκετά αποδοτική καθώς συνέβαλε στην ανίχνευση νοθείας σε γιαούρτι και τυρί από κατσικίσιο γάλα.

Στην συγκεκριμένη μελέτη τα δύο υποσύνολα είναι τα δείγματα φέτας χωρίς το παθογόνο *Listeria monocytogenes* (control) και τα δείγματα που περιείχαν το παθογόνο *Listeria monocytogenes*. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 3.3-3.8) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοντέλων με την μορφή πίνακα confusion matrix καθώς και οι δείκτες απόδοσης ευαισθησία, ακρίβεια, συνολική ακρίβεια.

Πίνακας 3.3 : Confusion matrix από την εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας σε αερόβιες συνθήκες για τις δύο κλάσεις με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του FTIR

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ						
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	44	27	71	61,97
		CONTROL LISTERIA	25	51	76	67,11
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	69	78	147	
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	63,77	65,38		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	64,63			
	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	6	11	17	35,29
		CONTROL LISTERIA	5	8	13	61,54
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	11	19	30	
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	54,55	42,11		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	46,67			
	ΠΡΟΒΛΕΨΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	14	21	35	40
		CONTROL LISTERIA	23	15	38	39,47
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	37	36	73	
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	37,84	41,67		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	39,73			

Πίνακας 3.4 : Confusion matrix από την εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας σε αερόβιες συνθήκες για τις δύο κλάσεις με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του VideometerLab

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ						
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	65	13	78	83,33
		CONTROL LISTERIA	45	24	69	34,78
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	110	37	147	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	59,09	64,86		
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	63,77	65,38		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	60,54			
	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	8	2	10	80
		CONTROL LISTERIA	13	7	20	35
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	21	9	30	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	38,09	22,22		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	50,00			
	ΠΡΟΒΛΕΨΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	26	5	31	83,87
		CONTROL LISTERIA	32	11	43	25,58
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	58	16	74	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ %	55,17	68,75		
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):				
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	50,00			

Πίνακας 3.5 : Confusion matrix από την εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας σε αερόβιες συνθήκες για τις δύο κλάσεις με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του VideometerLite

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ						
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	65	13	78	83,33
		CONTROL LISTERIA	45	24	69	34,78
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	110	37	147	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	59,09	64,86		
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	63,77	65,38		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):				
	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	5	2	7	71,43
		CONTROL LISTERIA	4	4	8	50
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	9	6	15	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	55,56	66,67		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):				
	ΠΡΟΒΛΕΨΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	14	5	19	73,68
		CONTROL LISTERIA	13	10	23	43,48
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	27	15	42	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	0	8,88		
		%				
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	51,85	66,67		
ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):					57,14	

Πίνακας 3.6 : Confusion matrix από την εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας σε αναερόβιες συνθήκες για τις δύο κλάσεις με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του FTIR

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ						
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	47	23	70	67,14
		CONTROL LISTERIA	27	50	77	64,94
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	74	73	147	
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	63,51	68,49		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	65,99			
	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	9	7	16	56,25
		CONTROL LISTERIA	8	6	14	42,86
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	17	13	30	
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	52,94	46,15		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	50			
	ΠΡΟΒΛΕΨΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	23	13	36	63,89
		CONTROL LISTERIA	16	20	36	55,56
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	39	33	73	
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	58,97	60,61		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	59,72			

Πίνακας 3.7 : Confusion matrix από την εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας σε αναερόβιες συνθήκες για τις δύο κλάσεις με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του VideometerLab

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ						
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	28	42	70	40
		CONTROL LISTERIA	25	52	77	67,53
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	53	94	147	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	52,83	55,32		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):				54,42
	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	4	5	9	44,44
		CONTROL LISTERIA	6	15	21	71,43
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	10	24	30	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	40	75		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):				63,33
	ΠΡΟΒΛΕΨΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	14	30	44	31,82
		CONTROL LISTERIA	12	20	32	62,5
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	26	50	76	
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ %	53,85	40		
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):				44,74

Πίνακας 3.8 : Confusion matrix από την εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα φέτας σε αναερόβιες συνθήκες για τις δύο κλάσεις με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του VideometerLite

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ							
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	70	10	80	87,5	
		CONTROL LISTERIA	40	27	67	40,3	
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	110	37	147		
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	63,64	72,97			
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):					65,99
		ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
	CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA		7	1	8	87,5	
	CONTROL LISTERIA		6	1	7	14,29	
	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ		13	2	15		
	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)		53,85	50			
	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):					53,33	
	ΠΡΟΒΛΕΨΗ			CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	CONTROL LISTERIA	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΕΙΡΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)
		CONTROL ΧΩΡΙΣ LISTERIA	9	1	10	90	
		CONTROL LISTERIA	17	2	19	10,53	
		ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ/ΣΤΗΛΗ	26	3	29		
		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ %	0	8,88			
		ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):	100	94,74			
		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (%):					37,93

Με βάση τα δεδομένα που παρουσιάζονται στους ανωτέρω πίνακες (**Πίνακας 3.3-3.8**) είναι εμφανές ότι το μοντέλο ταξινόμησης των δειγμάτων φέτας δεν ήταν αποδοτικό σε καμιά από τις έξι περιπτώσεις, έχοντας υπόψιν τις τιμές της ευαισθησίας και της συνολικής ακρίβειας και στα τρία στάδια. Υψηλότερη συνολική ακρίβεια στις αερόβιες συνθήκες παρατηρήθηκε στο όργανο VideometerLite (57,14 %) ενώ τα άλλα δύο

όργανα, FTIR 6200 JASCO και VideometerLite, ήταν αρκετά χαμηλές με τιμές 39,73 % και 50 % αντίστοιχα. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρούνται στις αναερόβιες συνθήκες στις οποίες στο όργανο του FTIR 6200 JASCO παρατηρείται η μεγαλύτερη συνολική ακρίβεια στο στάδιο της πρόβλεψης (59,72 %) ενώ στα άλλα δύο όργανα, VideometerLab και VideometerLite, παρατηρούνται χαμηλές τιμές (44,74 % και 37,93 % αντίστοιχα). Τα παραπάνω αποτελέσματα πιθανόν να προκλήθηκαν εξαιτίας του χαμηλού πληθυσμού του παθογόνου *Listeria monocytogenes* ο οποίος εμβολιάστηκε στα δείγματα φέτας κατά την προετοιμασία της πειραματικής μελέτης (3 log). Όμοια αποτελέσματα εμφάνισε ο αλγόριθμος (PLS-DA) σε δείγματα κοτόπουλου στο πείραμα των Cheng et al. (2022) όπου η συνολική ακρίβειά του μοντέλου σε όλα σχεδόν τα στάδια ήταν κάτω από 60%. Αντιθέτως, σε πειραματική μελέτη σε μπιφτέκια μοσχαριού ο αλγόριθμος είχε πολύ καλή συνολική ακρίβεια σε όλα τα στάδια (Panagou et al., 2014).

4. Συμπεράσματα

Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της παραπάνω ερευνητικής μελέτης επιβεβαιώνουν ότι και η θερμοκρασία αλλά και συνθήκες συντήρησης (αερόβιες και αναερόβιες) επηρεάζουν αισθητά την διάρκεια ζωής της φέτας. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως πιο έντονη αλλοίωση εμφανίζουν τα δείγματα φέτας στις αερόβιες συνθήκες στους 10°C καθώς και τα μικροβιολογικά αλλά και τα φυσικοχημικά αποτελέσματα είναι εντονότερα σε σύγκριση με τις άλλες 3 περιπτώσεις. Σχετικά με την διάρκεια ζωής του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* τα μικροβιολογικά αποτελέσματα έδειξαν ότι και στις δύο θερμοκρασίες το παθογόνο δεν εμφανίζει έντονη θνησιμότητα καθώς ακόμη και σε διάστημα 76 ημερών το βακτήριο παραμένει σε πληθυσμό έως και 1,89 log CFU/g στους 4°C και σε 2,07 log CFU/g στους 10°C υπό αναερόβιες συνθήκες. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε διάστημα 50 και 31 ημερών στις αερόβιες συνθήκες όπου οι τελικοί πληθυσμοί άγγιξαν τους 2 log CFU/g στους 4°C και σε 2,34 log στους 10°C.

Όσον αφορά τις τιμές του pH, όλα τα δείγματα των αερόβιων συνθηκών εμφανίζουν αυξητική τάση σε σύγκριση με των αναερόβιων συνθηκών σημειώνοντας την 31^η ημέρα δειγματοληψίας τιμή 6,30, όπου είναι και η υψηλότερη όλων των δειγμάτων. Αντιθέτως, οι τιμές PH στις αναερόβιες συνθήκες παρατηρούνται ελαφρώς αυξημένες σε όλη την διάρκεια συντήρησης. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανών να οφείλεται στην μεγαλύτερη ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων στη επιφάνεια των δειγμάτων φέτας των αερόβιων συνθηκών σε σύγκριση με τις αναερόβιες συνθήκες. Επιπρόσθετα, οι τιμές της ενεργότητας νερού παραμένουν περίπου σε τιμές κοντά στο 0,96 σε όλη την διάρκεια των 76 ημερών συντήρησης των δειγμάτων και στις δύο θερμοκρασίες.

Όσον αφορά τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα των μεθόδων MSI και FTIR για την περιοχή που επιλέχθηκε (1900-800 cm⁻¹), τα τελικά φάσματα που προέκυψαν για τα φρέσκα και αλλοιωμένα δείγματα στις δύο συνθήκες συντήρησης εμφανίζουν μικρές διαφορές στις απορροφήσεις και ενδεχομένως να αποτυπώνουν την αλλοίωση των δειγμάτων. Ωστόσο, εξαιτίας της ποιότητας των φασμάτων και της μη ικανοποιητικής πρόβλεψης της OMX μέσω των μοντέλων πρόβλεψης, δεν μπορούν να αποδοθούν σημαντικές κορυφές που σχετίζονται με την μικροβιολογική αλλοίωση.

Τέλος, τα αποτελέσματα των δύο μαθηματικών μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της OMX και για τον διαχωρισμό των δύο κλάσεων των δειγμάτων φέτας, το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) και το μοντέλο διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), αντίστοιχα, δεν πέτυχαν ικανοποιητική απόδοση. Από τις τιμές R^2 και RMSE των μοντέλων PLSR σε όλες τις περιπτώσεις, καθώς και από τις τιμές της συνολικής ακρίβειας των μοντέλων PLSDA, λήφθηκε το συμπέρασμα πως τα μοντέλα αυτά δεν μπορούσαν να εφαρμοστούν επιτυχώς στην συγκεκριμένη πειραματική μελέτη. Πιθανόν λόγω του μικρού εύρους των τιμών της OMX καθώς και του μικρού εμβολίου του παθογόνου. Μελλοντικά, θα είχε ενδιαφέρον η επεξεργασία των μοντέλων να γινόταν με βάση άλλα κριτήρια όπως είναι τα οργανοληπτικά ή τα φυσικοχημικά αποτελέσματα τα οποία σε διάρκεια συντήρησης 76 ημερών εμφάνισαν μεγαλύτερες διακυμάνσεις και μεγαλύτερο εύρος.

5. Βιβλιογραφία

- Abdi, H. (2003). *Partial Least Squares (PLS) Regression*. <https://personal.utdallas.edu/~herve/Abdi-PLS-pretty.pdf>
- Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.-M., & Paalme, T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1), 171–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00537-8)
- Adams M. R., Moss M. O., (2008). Food Microbiology, In: Food Microbiology. Royal Society of Chemistry. Cambridge: UK. pp. 136-139
- Ali Adnan Hayaloglu, & Sevda Kirbag. (2007). Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.002>
- Ambadoyiannis, G., Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2004). Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. *Food Biotechnology*, 18(3), 307-325.
- Angelopoulou, A., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Manolopoulou, E., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2017). Production of probiotic Feta cheese using *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* as adjunct. *International Dairy Journal*, 66, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.011>
- 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>
- Axelsson, L., & Ahrné, S. (2000). Lactic acid bacteria. In *Applied microbial systematics* (pp. 367-388). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Awasti, N., & Anand, S. (2020). The Role of Yeast and Molds in Dairy Industry: An Update. *Dairy Processing: Advanced Research to Applications*, 243–262. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4_12
- Awasti, N., Anand, S., & Djira, G. (2019). Sporulating behavior of *Bacillus licheniformis* strains influences their population dynamics during raw milk holding. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6001–6012. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15613>
- Axelsson, L., & Ahrné, S. (2000). Lactic acid bacteria. In *Applied microbial systematics* (pp. 367-388). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Barukcic, I., Ćetar, M., Marasovic, I., Lisak Jakopovic, K., Galic, K., & Božanic, R. (2020). Evaluation of quality parameters and shelf life of fresh cheese packed under modified atmosphere. *Journal of food science and technology*, 57, 2722-2731.
- Belessi, C. I. A., Papanikolaou, S., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N. (2008).

Survival and acid resistance of *Listeria innocua* in Feta cheese and yogurt, in the presence or absence of fungi. *Journal of food protection*, 71(4), 742-749.

- Beuchat, L. R. (1983). Influence of Water Activity on Growth, Metabolic Activities and Survival of Yeasts and Molds. *Journal of Food Protection*, 46(2), 135–141. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.135>
- Bozkurt, H., & Erkmen, O. (2001). Predictive modeling of *Yersinia enterocolitica* inactivation in Turkish Feta cheese during storage. *Journal of Food Engineering*, 47(2), 81–87. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(00\)00102-3](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(00)00102-3)
- 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>
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2020). BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. *FDA*, 1(5). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>
- Cheng, T., Li, P., Ma, J., Tian, X., & Zhong, N. (2022). Identification of Four Chicken Breeds by Hyperspectral Imaging Combined with Chemometrics. *Processes*, 10(8), 1484. <https://doi.org/10.3390/pr10081484>
- Chou, Y.-E., Edwards, C. G., Luedecke, L. O., Bates, M. P., & Clark, S. (2003). Nonstarter Lactic Acid Bacteria and Aging Temperature Affect Calcium Lactate Crystallization in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2516–2524. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73846-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73846-6)
- Clark, R. N. (1995). Reflectance spectra. *AGU handbook of physical constants*, 178.
- Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., & Rosa, H. J. D. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191(5), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>
- 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(4), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>
- de W Blackburn, C. (Ed.). (2006). *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing.
- Dmitrenko, M., Ljabin, V., Kuzminova, A., Lahderanta, E., Solov'yev, N., & Penkova, A. (2021). Modification Approaches to Enhance Dehydration Properties of Sodium Alginate-Based Pervaporation Membranes. *Membranes*, 11(4), 255. <https://doi.org/10.3390/membranes11040255>
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G.-J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 130–141.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>

- Engstrom, S. K., Cheng, C., Seman, D., & Glass, K. A. (2020). Growth of *Listeria monocytogenes* in a model high-moisture cheese on the basis of pH, moisture, and acid type. *Journal of Food Protection*, 83(8), 1335-1344.
- Ergon, R., Granato, D., & Ares, G. (2014). Principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR). *Mathematical and statistical methods in food science and technology Wiley Blackwell, Chichester*, 121-42.
- Feng, C., Makino, Y., Oshita, S., & Juan Francisco García-Martín. (2018). Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. *Food Control*, 84(3), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.013>
- Ferragina, A., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., & Bittante, G. (2013). The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to predict cheese yield and nutrient recovery or whey loss traits from unprocessed bovine milk samples. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7980–7990. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7036>
- Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), 151–157. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01215.x>
- Foda, M., Bahgaat, W., Kassem, J., & Aly, S. (2013). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectra in Relation to the Composition of White Soft Cheese. *World Applied Sciences Journal*, 26(3), 289–295. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.26.03.13477>
- Fox, P. F., & Cogan, T. M. (2004). Factors that Affect the Quality of Cheese. *Cheese*, 583–608. [https://doi.org/10.1016/s1874-558x\(04\)80084-8](https://doi.org/10.1016/s1874-558x(04)80084-8)
- Giannakas, A. E., Konstantinos Zaharioudakis, Kollia, E., Kopsacheili, A., Learda Avdylaj, Georgopoulos, S., Areti Leontiou, Karabagias, V. K., Kehayias, G., Efthymia Ragkava, Charalampos Proestos, & Salmas, C. E. (2023). The Development of a Novel Sodium Alginate-Based Edible Active Hydrogel Coating and Its Application on Traditional Greek Spreadable Cheese. *Gels*, 9(10), 807–807. <https://doi.org/10.3390/gels9100807>
- Gorris, L. G. M., & Peppelenbos, H. W. (1992). Modified atmosphere and vacuum packaging to extend the shelf life of respiring food products. *HortTechnology*, 2(3), 303-309.
- Hameed, K. (2016). Fungal diversity in different types of cheese and the effect of natamycin on their survival during Feta cheese manufacture and storage. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 3(3), 214. <https://doi.org/10.5455/javar.2016.c152>
- Hayaloglu, A. A. (2016). Cheese: Microbiology of cheese. *Reference module in food science*, 1, 1-11.

- ilkay, T., & Z uuml beyde, O. ner. (2015). Determination of lactic acid bacteria in Kaşar cheese and identification by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *African Journal of Biotechnology*, 14(41), 2891–2902. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14686>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1998). *Microbial ecology of food commodities* (Vol. 6). Aspen Publishers.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & David Allen Golden. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). Springer.
- Kamarinou, C. S., Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Tassou, C. C., Galanis, A., Nikos Chorianopoulos, & Argyri, A. A. (2023). Application of multi-functional lactic acid bacteria strains in a pilot scale feta cheese production. *Frontiers in Microbiology*, 14(4). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254598>
- Kapetanakou, A. E., Taoukis, P., & Skandamis, P. N. (2019). Model development for microbial spoilage of packaged fresh–cut salad products using temperature and in-package CO₂ levels as predictor variables. *LWT*, 113(7), 108285. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108285>
- König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (Eds.). (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-29). Heidelberg: Springer.
- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G.-J. .E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25(7), 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.006>
- Larson, A. E., Johnson, E. A., & Nelson, J. H. (1999). Survival of *Listeria monocytogenes* in Commercial Cheese Brines. *Journal of Dairy Science*, 82(9), 1860–1868. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75419-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75419-6)
- Leclercq-Perlat, M.-N. ., Sicard, M., Trelea, I. C., Picque, D., & Corrieu, G. (2012). Temperature and relative humidity influence the microbial and physicochemical characteristics of Camembert-type cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4666–4682. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5368>
- Lee, L. C., Liong, C.-Y., & Jemain, A. A. (2018). Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst*, 143(15), 3526–3539. <https://doi.org/10.1039/C8AN00599K>
- Lei, T., & Sun, D.-W. (2019). Developments of nondestructive techniques for evaluating quality attributes of cheeses: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88(7), 527–542. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.013>
- Manthou, E., Lago, S. L., Dagres, E., Lianou, A., Tsakanikas, P., Panagou, E. Z., ... & Nychas, G. J. E. (2020). Application of spectroscopic and multispectral imaging technologies on the assessment of ready-to-eat pineapple quality: A performance evaluation study of machine learning models generated from two commercial data analytics tools. *Computers and Electronics in Agriculture*, 175, 105529.

- Markide, N. N. (2011). *The use of analytical techniques for the rapid detection of microbial spoilage and adulteration in milk*. Doctoral Dissertation, the University of Manchester (United Kingdom).
- Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). *Functional dairy products*.
- 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)
- Moran-Gilad, J., & Yagel, Y. (2021). *Application and Integration of Omics-powered Diagnostics in Clinical and Public Health Microbiology*. Springer Nature.
- Oumayma Boukria, Sofiane Boudalia, Bhat, Z., Hassoun, A., & Abderrahmane Ait Kaddour. (2023). Evaluation of the adulteration of camel milk by non-camel milk using multispectral image, fluorescence and infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part a Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 300(7), 122932–122932. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122932>
- Ozer, B., & Akdemir-Evrendilek, G. (Eds.). (2014). *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments*.
- 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), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.026>
- 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(7), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.005>
- 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(2), 82–87. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-52.2.82>
- Patil, A. R., Chogale, N. D., Pagarkar, A. U., Koli, J. M., Bhosale, B. P., Sharangdhar, S. T., & Kulkarni, G. N. (2020). Vacuum packaging is a tool for shelf life extension of fish product: a review.
- Pax, A. P., Ong, L., Vongsivut, J., Tobin, M. J., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2019). The characterisation of Mozzarella cheese microstructure using high resolution synchrotron transmission and ATR-FTIR microspectroscopy. *Food Chemistry*, 291(7), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.016>
- Pexara, A., Solomakos, N., Sergelidis, D., & Govaris, A. (2012). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in Feta and Galotyri cheeses. *Journal of dairy research*, 79(4), 405–413.
- Possas, A., Hernández, M., Esteban-Carbonero, Ó., Valero, A., & Rodríguez-Lázaro, D. (2022). *Listeria monocytogenes* survives better at lower storage

temperatures in regular and low-salt soft and cured cheeses. *Food Microbiology*, 104(3), 103979. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103979>

- 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>
- Ζαρκάδα, Χ. (2020). Προϊόντα σήμανσης ΠΟΠ και ΠΓΕ στην Ελλάδα και στην Ευρώπη.
- Ζερφυρίδης, Γ. (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος, Τυροκομία. 2η έκδοση, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, 133.
- Μαρκάκη, Π., & Μαστρονικολή, Σ. (2008). Σημειώσεις για το εργαστήριο μικροβιολογίας τροφίμων.[Πανεπιστημιακές σημειώσεις] Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων. Τμήμα Χημείας Τομέας ΙΙ. Πανεπιστήμιο Αθηνών.(pdf) Μικροβιολογία & Υγιεινή Τροφίμων (εργαστήριο).
- Νυχάς, Γ.-Ι. (2018) Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, pp.128-135
- Πολυσίου, Μ., Ταραντίλης, Π. (2008). Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Ενόργανη ανάλυση. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Ραφτοπούλου, Ο. (2019). Εκτίμηση μέσω πολυφασματικής απεικόνισης της αλλοίωσης και αξιολόγηση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόντα κοτόπουλου.
- ΥΠΑΑΤ. (2024). <https://www.minagric.gr/for-farmer-2/2012-02-02-07-52-07/ellinikaproionta>
- Φράγκου, Δ. Η. (2013). Φέτα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ). ΕΛ.ΓΟ “ΔΗΜΗΤΡΑ”, ΕΘΙΑΓΕ, Τεύχος, 2. https://www.elgo.gr/images/pdf/publications/demeter_magazine/dmtr2p17-20.pdf
- Φωτεινιάς, Ν. Ι. (2015). Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού αίγιου γάλακτος στην Φέτα (Master's thesis).
- Χαβαλέ, Ε. Κ. (2010). Παραγωγή και ανάλυση του εξωτερικού εμπορίου του τυριού φέτα (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης).
- Χασάπη, Σ. (2006). Τεχνολογία παραγωγής και ποιοτικά χαρακτηριστικά του τυριού φέτα (Doctoral dissertation, ΤΕΙ Δυτικής Μακεδονίας).