



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

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση βιοπροστατευτικών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων  
στο οργανοληπτικό και μικροβιακό προφίλ της φέτας



**Αντωνία Μαρία Π. Μπαράκη**

Επιβλέπων καθηγητής:

Νίκος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ 2024**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση βιοπροστατευτικών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων  
στο οργανοληπτικό και μικροβιακό προφίλ της φέτας

Effect of bioprotective strains of lactic acid bacteria on the organoleptic  
and microbial profile of feta cheese

**Αντωνία Μαρία Π. Μπαράκη**

Εξεταστική Επιτροπή:

Χωριανόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Πανάγου Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Παπαδημητρίου Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

## Επίδραση βιοπροστατευτικών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων στο οργανοληπτικό και μικροβιακό προφίλ της φέτας

ΔΙΠΜΣ: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα, η βιομηχανία των τροφίμων λαμβάνει σοβαρά το ρόλο της στην προστασία των καταναλωτών και φροντίζει μέσω της εφαρμογής της σχετικής νομοθεσίας για την παραγωγή ασφαλών προϊόντων, υψηλής ποιότητας και με αυξημένη διάρκεια ζωής. Ωστόσο η απαίτηση των καταναλωτών για χρήση πιο φυσικών συντηρητικών, ωφέλιμων για την υγεία, καθώς και η αύξηση των κρουσμάτων τροφιμογενών ασθενειών παγκοσμίως, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον στην χρήση βιοπροστατευτικών καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) και των αντιμικροβιακών ουσιών που εκκρίνονται από αυτούς, για την μεγιστοποίηση της ασφάλειας και του χρόνου ζωής των τροφίμων καθώς και την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Τα τυριά αν και θεωρούνται ασφαλή προϊόντα, η κατανάλωσή τους τα τελευταία χρόνια έχει συνδεθεί με την εμφάνιση διαφόρων τροφιμογενών, όπως η Λιστερίωση, που οφείλεται στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στον θάνατο. Η φέτα ανήκει στα ημι-μαλακά τυριά που ωριμάζουν στην άλμη για τουλάχιστον 2 μήνες και αποτελεί προϊόν ΠΟΠ (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης), με μεγάλη εγχώρια κατανάλωση και εν δυνάμει κίνδυνο εμφάνισης της *Listeria monocytogenes*. Για τον λόγο αυτό η ανάγκη για βελτιωμένες μεθόδους συντήρησης, που θα αυξήσουν την ασφάλεια και θα τον χρόνο ζωής των προϊόντων αυτών αποτελεί πρόκληση για την γαλακτοβιομηχανία και γενικότερα τη βιομηχανία των τροφίμων.

Επιπλέον τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την εύρεση και ανάπτυξη σύγχρονων, μη-επεμβατικών και ταχειών μεθόδων, που θα συμβάλλουν στην εκτίμηση της αλλοίωσης στα τρόφιμα καθώς και στην ανίχνευση της παρουσίας των παθογόνων σε αυτά. Μερικές από αυτές τις μεθόδους αποτελούν η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) καθώς και η μέθοδος της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), τα αποτελέσματα των οποίων υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία με την χρήση πολυπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης.

Με βάση τα παραπάνω, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της προσθήκης του υπερκείμενου διαλύματος των βιοπροστατευτικών στελεχών του *Lactiplantibacillus pentosus* L33 *Lactiplantibacillus plantarum* L125, στα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας, καθώς και στην εκτίμηση του επιπέδου ασφάλειας του προϊόντος παρουσία του παθογόνου *Listeria monocytogenes*. Παράλληλα, αξιολογήθηκε και η αποτελεσματικότητα της φασματοσκοπίας του MSI και του FTIR στην εκτίμηση της OMX στην φέτα, μέσω της κατασκευής μοντέλων με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square, PLS).

Για τον σκοπό αυτό στην παρούσα έρευνα, δείγματα ωριμασμένης φέτας χαμηλής αλατότητας εμβολιάστηκαν με 3 Log CFU/g με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, και κατόπιν ψεκάστηκαν είτε με σκέτο UHT γάλα (Control), είτε με υπερκείμενο διάλυμα UHT γάλακτος των στελεχών *Lactiplantibacillus pentosus* L33

και *Lactiplantibacillus plantarum* L125, απαλλαγμένο από κύτταρα (Supernatant, S ή Cell Free Supernatant). Κατόπιν τα δείγματα συσκευάστηκαν είτε σε άλμη είτε σε κενό στους 4 °C και 10 °C για περίπου 80 ημέρες. Κατά την συντήρησή τους πραγματοποιούνταν μικροβιακές αναλύσεις, σχετικά με τους πληθυσμούς της OMX, των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων, των ζυμών/μυκήτων και της *Listeria monocytogenes*, ενώ παράλληλα λαμβάνονταν μετρήσεις όσον αφορά το pH, την ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) καθώς και την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων, σχετικά με την εμφάνιση, την οσμή, την γεύση (δείγματα χωρίς *Listeria monocytogenes*) και την υφή τους. Επιπλέον πραγματοποιούνταν φασματοσκοπικές μετρήσεις με την χρήση της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και συγκεκριμένα των οργάνων Videometer Lab και Videometer Lite, καθώς και της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).

Κατόπιν, κατασκευάστηκαν μοντέλα συσχέτισης των μικροβιολογικών με τα φασματοσκοπικά δεδομένα, όπου το 70% των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και την επικύρωση, ενώ το 30% για την πρόβλεψη. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα αποτέλεσαν τις ανεξάρτητες μεταβλητές, ενώ ο πληθυσμός της OMX την εξαρτημένη. Επιπλέον σε κάποια μοντέλα χρειάστηκε προεπεξεργασία των αρχικών δεδομένων μέσω μετασχηματισμών, όπως οι SNV και οι Savitzky-Golay Derivatives (1ης παράγωγος) για εξομάλυνση των δεδομένων. Τα μοντέλα πρόβλεψης της OMX κατασκευάστηκαν μέσω της γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Σχετικά με τα μοντέλα ανίχνευσης της παρουσίας της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα μέσω του διαχωρισμού τους σε δύο κλάσεις (Κλάση 1= απουσία, Κλάση 2= παρουσία *L.monocytogenes*), κατασκευάστηκαν μοντέλα μέσω της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα και ως εξαρτημένη οι δύο κλάσεις για την απουσία-παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα.

Όσον αφορά τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, κυρίαρχο μικροοργανισμό στην φέτα αποτέλεσαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι/κόκκοι. Ο πληθυσμός των ζυμών αυξήθηκε σταδιακά εμφανίζοντας χαμηλότερους πληθυσμούς στα δείγματα του Supernatant σε σχέση με αυτά του Control, ενώ πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* μειώθηκε παρουσιάζοντας ταχύτερη μείωση και χαμηλότερους πληθυσμούς στα δείγματα του Supernatant. Οι τιμές του pH (4.4-4.6) και της  $a_w$  (0.96) παρέμειναν σχετικά σταθερές.

Τα αποτελέσματα από την οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξαν ότι η προσθήκη του Supernatant βελτίωσε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας κυρίως ως προς την εμφάνιση και την υφή της και αύξησε τον χρόνο συντήρησής της σε σύγκριση με τα δείγματα του Control.

Τα μοντέλα PLS-R που αναπτύχθηκαν για την εκτίμηση της OMX δεν έδωσαν ικανοποιητικούς συντελεστές απόδοσης, για κανένα από τα 3 όργανα. Πιο αναλυτικά, οι τιμές του  $R^2$  και RMSE στην περίπτωση του Videometer Lab ήταν 0.206-0.263 και 0.287-0.408, αντίστοιχα, στην περίπτωση του Videometer Lite μεταξύ -250-0.048 και 0.276-0.0.334, αντίστοιχα, και τέλος στην περίπτωση του FTIR, 0.056-0.129 και 0.366-0.460. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα μοντέλα δεν κατάφεραν να προβλέψουν αποτελεσματικά την αλλοίωση στα δείγματα της φέτας.

Τέλος, τα μοντέλα PLS-DA που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα, παρουσίασαν χαμηλές τιμές συνολικής ακρίβειας (%) με

εύρος 40-48.75% στην περίπτωση του Videometer Lab και 54.35% στην περίπτωση του Videometer Lite, δίνοντας έτσι μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Όσον αφορά το FTIR η τιμή της συνολικής ακρίβειας (%) ήταν χαμηλή (57.14%) στην περίπτωση των δειγμάτων της άλμης και υψηλή (82.86%) στην περίπτωση των δειγμάτων του κενού με την τελευταία να παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συμπερασματικά, με εξαίρεση το μοντέλο του FTIR στην περίπτωση των δειγμάτων του κενού, τα υπόλοιπα δεν κατάφεραν να διαχωρίσουν σε ικανοποιητικό βαθμό τα δείγματα ως προς τις δύο κλάσεις, σχετικά με την απουσία-παρουσία της *Listeria monocytogenes*.

**Επιστημονική Περιοχή:** Μικροβιολογία Τροφίμων

**Λέξεις Κλειδιά:** Λευκά τυριά άλμης, φέτα, βιοσυντήρηση, οξυγαλακτικά βακτήρια, *Listeria monocytogenes*, φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)

## **Effect of bioprotective strains of lactic acid bacteria on the organoleptic and microbial profile of feta cheese**

*MSc in Food Safety and Quality Management Systems  
Department of Food Science and Technology  
Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology*

### **ABSTRACT**

Today, the food industry takes its role in consumer protection seriously and ensures, through the implementation of relevant legislation, the production of safe products of high quality and with extended shelf life. However, consumer demand for the use of more natural preservatives, beneficial to health, and the rise of foodborne illness outbreaks worldwide have shifted focus toward the use of bioprotective cultures of lactic acid bacteria (LAB) and the antimicrobial substances they secrete, to maximize food safety and shelf life, as well as to improve their organoleptic characteristics.

Although cheeses are considered safe products, their consumption in recent years has been linked to the occurrence of various foodborne illnesses, such as Listeriosis, which is caused by the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes* and can even lead to death. Feta cheese, which belongs to semi-soft cheeses that mature in brine for at least 2 months, is a PDO (Protected Designation of Origin) product with high domestic consumption and a potential risk of *Listeria monocytogenes* contamination. For this reason, the need for improved preservation methods, which will increase safety and shelf life, presents a challenge for the dairy industry and the food industry in general. Additionally, in recent years, efforts have been made to find and develop modern, non-invasive, and rapid methods that will contribute to assessing food spoilage and detecting the presence of pathogens. Some of these methods include multispectral imaging (MSI) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), the results of which are further processed using multivariate statistical analysis.

Based on the above, the aim of this study was to assess the addition of the supernatant of the bioprotective strains *Lactiplantibacillus pentosus* L33 and *Lactiplantibacillus plantarum* L125 to the microbiological and organoleptic characteristics of feta cheese, as well as to assess the safety level of the product in the presence of the pathogen *Listeria monocytogenes*. In parallel, the effectiveness of MSI and FTIR spectroscopy in assessing LAB populations in feta cheese was evaluated, through the construction of models using the Partial Least Square (PLS) method.

For this purpose, in this research, samples of matured low-salt feta cheese were inoculated with 3 Log CFU/g of the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes*, and then sprayed either with plain UHT milk (Control) or with the supernatant of UHT milk from the strains *Lactiplantibacillus pentosus* L33 and *Lactiplantibacillus plantarum* L125, free from cells (Supernatant, S or Cell-Free Supernatant). The samples were then packed either in brine or vacuum at 4 °C and 10 °C for approximately 80 days. During their storage, microbial analyses were conducted regarding LAB populations, lactic streptococci, yeasts/molds, and *Listeria monocytogenes*, while measurements were also taken for pH, water activity (aw), and organoleptic evaluation of the samples regarding appearance, smell, taste (samples without *Listeria monocytogenes*), and texture.

Spectroscopic measurements were also taken using multispectral imaging (MSI), specifically the Videometer Lab and Videometer Lite instruments, as well as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Models correlating the microbiological with the spectroscopic data were then constructed, where 70% of the samples were used for model development and validation, while 30% were used for prediction. The spectroscopic data served as independent variables, while the LAB population was the dependent variable. In some models, pre-processing of the initial data was required using transformations such as SNV and Savitzky-Golay Derivatives (1st derivative) to smooth the data. PLS-R regression models were developed to estimate LAB populations.

Regarding the detection of *Listeria monocytogenes* in samples through classification into two classes (Class 1 = absence, Class 2 = presence of *L. monocytogenes*), models were developed using PLS-DA. Spectroscopic data were used as independent variables, and the presence/absence of *Listeria monocytogenes* as the dependent variable.

In terms of microbiological results, LAB and lactic streptococci were dominant microorganisms in the feta cheese. The yeast population gradually increased, with lower populations in Supernatant samples compared to Control, while the *Listeria monocytogenes* population decreased more rapidly and remained lower in the Supernatant samples. The pH (4.4-4.6) and aw (0.96) values remained relatively stable. Results from the organoleptic evaluation indicated that the addition of the Supernatant improved the organoleptic characteristics of feta cheese, particularly in terms of appearance and texture, and extended its shelf life compared to Control samples.

The PLS-R models developed for estimating LAB populations did not yield satisfactory performance coefficients for any of the three instruments. Specifically, the R<sup>2</sup> and RMSE values for the Videometer Lab ranged from 0.206 to 0.263 and 0.287 to 0.408, respectively, for Videometer Lite between -0.250 and 0.048 and 0.276 to 0.334, respectively, and for FTIR from 0.056 to 0.129 and 0.366 to 0.460. These results indicate that the models were not effective in predicting spoilage in the feta cheese samples.

Finally, the PLS-DA models developed for detecting *Listeria monocytogenes* in samples showed low overall accuracy (%) ranging from 40-48.75% for the Videometer Lab and 54.35% for Videometer Lite, providing unsatisfactory results. Regarding FTIR, the total accuracy (%) was low (57.14%) for brine samples and high (82.86%) for vacuum-packed samples, with the latter showing satisfactory results. In conclusion, with the exception of the FTIR model for vacuum-packed samples, the other models did not effectively classify the samples based on the presence/absence of *Listeria monocytogenes*.

**Scientific Area:** Food Microbiology

**Key words:** White brine cheeses, feta, biopreservation, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*; Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, multispectral imaging (MSI) analysis

## Ευχαριστίες

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

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Νίκο Χωριανόπουλο, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω σε αυτή τη μελέτη και να συμβάλλω στη δημοσίευση των αποτελεσμάτων της στο πλαίσιο μιας πιο εκτεταμένης έρευνας καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την διδακτορική φοιτήτρια Αγγελική Δουκάκη που συνέβαλε στην διεξαγωγή και αργότερα στην συγγραφή της συγκεκριμένης μελέτης, όντας πάντα πρόθυμη να βοηθήσει και να αφιερώσει πολύτιμο χρόνο, παρά τις αυξημένες ακαδημαϊκές υποχρεώσεις της.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Ιωάννη Νταλάκα, Ιωάννη Τζούμκα και Μαρίνα Σιάπκα με τους οποίους συνεργαστήκαμε άψογα καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας στα πλαίσια της κοινής μας μελέτης και αργότερα κατά την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για τις πολύτιμες γνώσεις μικροβιολογίας στα πλαίσια των μαθημάτων και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κώστα Παπαδημητρίου του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών που δέχτηκε να είναι μέλος της εξεταστικής επιτροπής στην παρούσα έρευνα. Συνολικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους δύο για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την μελέτη της εργασίας μου.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου που με στηρίζουν σε κάθε βήμα μου και κάθε επιλογή μου.

---

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



## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	9
1.1 Τυρί .....	9
1.1.1 Λευκά τυριά άλμης .....	10
1.2 Φέτα.....	10
1.2.1 Θρεπτική σύσταση της φέτας .....	12
1.2.2 Στάδια παραγωγής της φέτας.....	14
1.2.3 Μικροβιακή χλωρίδα φέτας.....	15
1.2.4 Παθογόνοι και αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στην φέτα .....	18
1.3 Βιοσυντήρηση .....	20
1.3.1 Βιοσυντήρηση των τροφίμων.....	20
1.3.2 Βιοσυντήρηση των τυριών .....	23
1.3.3 Χρήση του γένους <i>Lactobacillus</i> στα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	27
1.4 Ταχείες μέθοδοι ανάλυσης στην βιομηχανία των τροφίμων .....	28
1.4.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis-MSI).....	31
1.4.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	32
1.4.3 Ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων στη βιομηχανία τροφίμων....	34
Σκοπός.....	36
2. Υλικά και μέθοδοι.....	37
2.1 Προετοιμασία πειράματος.....	37
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός .....	39
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων .....	40
2.3.1 Παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος και ψεκασμός των δειγμάτων...41	
2.3.2 Απομόνωση του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> και εμβολιασμός των δειγμάτων.....	42
2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	43
2.5 Οργανοληπτική αξιολόγηση .....	46
2.6 Μέτρηση pH.....	46
2.7 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging, MSI).....	47
2.7.1 Videometer Lab .....	47
2.7.2 Videometer Lite .....	50
2.8 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) ..	52
2.9 Μέτρηση ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ) .....	53
2.10 Ανάλυση Δεδομένων .....	54

2.10.1 Κατασκευή μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R) για την ποσοτική εκτίμηση της OMX.....	54
2.10.2 Κατασκευή Μοντέλων Διακριτής Ανάλυσης με την μέθοδο Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis-PLS-DA) για την ανίχνευση της <i>L. monocytogenes</i> . ....	57
3. Αποτελέσματα.....	59
3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων.....	59
3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων pH και ενεργότητας ύδατος (aw).....	64
3.3 Οργανοληπτική Αξιολόγηση.....	65
3.4 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων.....	67
3.4.1 Αποτελέσματα δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).....	67
3.4.2 Αποτελέσματα δεδομένων φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR).....	70
3.5 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R).....	73
3.5.1 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R) με χρήση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης(MSI).....	73
3.5.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R) με χρήση των δεδομένων της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	77
3.6. Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA).....	80
3.6.1 Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA) με χρήση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης(MSI).....	80
3.6.2 Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA) με χρήση των δεδομένων της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	84
4. Συζήτηση.....	87
5. Συμπεράσματα.....	96
6. Βιβλιογραφία.....	97

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Τυρί

Σύμφωνα με το άρθρο 83 του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, << τα τυριά αυτά, είναι τα προϊόντα ωρίμανσης του πήγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένα από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν, με την επενέργεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδος, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου και μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγμα αυτών ή/και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα) >>. Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (283-1978) ορίζεται ως << το ωριμασμένο ή φρέσκο, μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό ή εξαιρετικά σκληρό, αφυδατωμένο προϊόν που προέρχεται από γάλα στο οποίο η αναλογία πρωτεΐνης ορού γάλακτος/καζεΐνης δεν υπερβαίνει αυτή του γάλακτος >>. Το τυρί παράγεται σε όλο τον κόσμο και παρουσιάζει τεράστια ποικιλία ως προς την γεύση, το άρωμα και τη μορφή του. Από όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το τυρί θεωρείται το πιο ποικιλόμορφο προϊόν, καθώς σε αντίθεση με τα άλλα υφίσταται συνεχώς βιολογικές και βιοχημικές μεταβολές κατά την παρασκευή και αποθήκευσή του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μεταβάλλονται και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, όπως η υφή και το άρωμα, καθώς και η λειτουργικότητά του. Κατά την παραγωγή και ωρίμανσή του πραγματοποιείται μια σειρά από ελεγχόμενες βιοχημικές διαδικασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα το εξαιρετικό άρωμα και τη γεύση του. Αν οι διαδικασίες αυτές δεν είναι συγχρονισμένες τότε το τελικό προϊόν που προκύπτει δεν έχει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Εξαιρετικά ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι αν και τα τυριά προέρχονται από την ίδια πρώτη ύλη (γάλα από περιορισμένα ήδη ζώων) και υφίστανται παρόμοιες διαδικασίες παρασκευής (πρωτόκολλα) που εξαρτώνται από την ποικιλία, τα τελικά προϊόντα διαφέρουν και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία (Fox et al., 2017). Σύμφωνα με τους Sandine and Elliker (1970) υπάρχουν πάνω από 1000 ποικιλίες τυριών παγκοσμίως. Για τον λόγο αυτό θεωρείται ενδιαφέρον προϊόν για μελέτη.

Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας τους τα τυριά κατηγοριοποιούνται με βάση α) τον παράγοντα που προάγει την πήξη του γάλακτος (πυτιά ή οξύ), β) την υφή ή την περιεχόμενη υγρασία (σκληρό, ημί-σκληρο, ημι-μαλακό, μαλακό), την ωρίμανση (ωριμασμένο ή φρέσκο). Όσον αφορά τον παράγοντα πήξης το 75% των τυριών παγκοσμίως παράγονται μέσω της δράσης της πυτιάς ως μέσο πήξης του γάλακτος. Η

τυριά αποτελείται από ένζυμα του στομάχου των ζώων (πρωτεολυτικά ένζυμα), τα οποία προκαλούν την πήξη του γάλακτος μετά από αποθήκευση. Λιγότερα είναι τα τυριά εκείνα που παράγονται μέσω της χρήση οξέος ως παράγοντα πήξης. Κατά την διαδικασία αυτή, τα οξυγαλακτικά βακτήρια που είναι ενδογενή βακτήρια του γάλακτος, ζυμώνουν την λακτόζη, παράγοντας γαλακτικό οξύ. Η συσσώρευση οξέος προκαλεί την πτώση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών (pH~ 4,6), το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση των καζεϊνών και έτσι την πήξη του γάλακτος (δημιουργία gel) (Fox et al., 2017).

### **1.1.1 Λευκά τυριά άλμης**

Τα τυριά άλμης είναι εκείνα τα τυριά που ωριμάζουν και συντηρούνται στην άλμη για μεγάλο διάστημα συνήθως μέχρι την κατανάλωση και παράγονται κυρίως στις χώρες της Ανατολικής Μεσογείου και τα Βαλκάνια με διαφορετικές ονομασίες και τρόπους παρασκευής (Abdi El-Salam and Alichanidis, 2004; Alichanidis and Polychroniadou, 2008). Κατηγορία των τυριών αυτών αποτελούν τα λευκά τυριά άλμης, τα οποία φτιάχνονται από τυρόπηγμα, χωρίς εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας και έχουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως ελαφρώς όξινη και αλμυρή γεύση, που καταλήγει πολλές φορές σε λίγο πικάντικη και ταγγή. Για την παρασκευή τους χρησιμοποιείται συνήθως ως πρώτη ύλη γάλα προβάτου και κατσίκας, ενώ το χρώμα τους είναι λευκό καθώς στο γάλα αυτό δεν περιέχονται καροτενοειδή. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται αγελαδινό γάλα μετά από αφαίρεση των καροτενοειδών για διατήρηση του λευκού χρώματος. Η υφή τους είναι αρκετά μαλακή επιτρέποντας την κοπή τους σε φέτες, ενώ φέρουν μικρές μηχανικές οπές. Η κατανάλωσή τους γίνεται μετά από τουλάχιστον 2 μήνες παραμονής τους στην άλμη (Alichanidis and Polychroniadou, 2008). Βασικό χαρακτηριστικό των τυριών αυτών που τα διαχωρίζει από της Βόρειας Ευρώπης είναι η ξηρή αλάτιση κατά την παρασκευή τους και κατόπιν η ωρίμανση και συντήρησή τους στην άλμη (Bintsis and Papadimas, 2002). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν αρκετά ελληνικά τυριά όπως η Φέτα, το Καλαθάκι Λήμνου και ο Τελεμές (Moatsou and Govaris, 2011).

## **1.2 Φέτα**

Η φέτα είναι το πιο διαδεδομένο ελληνικό τυρί στον κόσμο και σύμφωνα με τον κανονισμό 1829/2002 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, από το 2002 έχει αναγνωριστεί ως ελληνικό προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ). Με βάση τον

κανονισμό αυτό η φέτα ορίζεται ως το μαλακό λευκό τυρί άλμης που παράγεται παραδοσιακά στην Ελλάδα (περιοχές της Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και του Νομού Λέσβου) και αποτελείται είτε αποκλειστικά από πρόβιο γάλα είτε από μίξη αυτού με γίδινο έως 30 % (Commission Regulation (EC) No. 1829/2002). Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (1998) το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της φέτας θα πρέπει να πληροί κάποιες προϋποθέσεις, οι οποίες είναι:

- Το γίδινο γάλα να μην υπερβαίνει το 30% κατά βάρος
- Η λιποπεριεκτικότητα του πρέπει να είναι τουλάχιστον 6% κατά βάρος
- Το pH του να είναι τουλάχιστον 6,5
- Η πήξη του πρέπει να γίνεται εντός 48 ωρών μετά την άμελξη. Επιπλέον μέχρι την πήξη του πρέπει να διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας
- Να προέρχεται από φυλές προβάτων και αιγών που εκτρέφονται παραδοσιακά, είναι προσαρμοσμένες στην περιοχή παρασκευής της φέτας και η διατροφή τους βασίζεται στην γλωρίδα της εν λόγω περιοχής
- Να προέρχεται από άμελξη, τουλάχιστον 10 ημερών μετά τον τοκετό του ζώου.
- Να είναι καθαρό, αγνό, υγιεινό και πλήρες
- Να είναι νωπό ή παστεριωμένο.
- Να απουσιάζουν αντιβιοτικά και γενετικά τροποποιημένα υλικά

Η φέτα με την ωρίμανση πρέπει να είναι τόσο μαλακιά ώστε να μπορεί να κοπεί σε κομμάτια, να έχει ευχάριστη και ελαφρώς όξινη γεύση, καθώς και πλούσιο άρωμα. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι τα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της φέτας που διατίθεται στο εμπόριο διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τον παραγωγό από τον οποίο προέρχεται. Αυτό είναι αποτέλεσμα των διαφορών της σύστασης του γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη καθώς και της τεχνολογία παρασκευής της φέτας, η οποία ποικίλει σε πλαίσια όμως που επιτρέπει η νομοθεσία(πχ τύπος της πυτιάς για πήξη του γάλακτος, χρήση ξύλινου βαρελιού ή μεταλλικού περιέκτη για ωρίμανση κτλ.) (Paradimitriou et al., 2022). Στο παρελθόν η παρασκευή της πραγματοποιούνταν σε μικρής κλίμακας οικογενειακές φάρμες χωρίς την παστερίωση του γάλακτος και χωρίς εξειδικευμένο εξοπλισμό, ενώ σήμερα παράγεται με παστεριωμένο γάλα σε καλά εξοπλισμένες γαλακτοβιομηχανίες με χρήση εμπορικών καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων ως εκκινητήριες καλλιέργειες (Anifantakis, 1991; Sarantinopoulos et al., 2002; Manolopoulou et al., 2003). Η εγχώρια κατανάλωσή της στην Ελλάδα είναι μεγάλη και υπολογίζεται ότι αντιστοιχεί κατά μέσο όρο σε 12 kg/άτομο ετησίως (Manolopoulou et al., 2003).

### 1.2.1 Θρεπτική σύσταση της φέτας

Η φέτα όπως όλα τα τυριά είναι ένα προϊόν πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, καθώς περιέχει πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, βιοενεργά πεπτίδια, λίπος, βιταμίνες, μέταλλα καθώς και ιχνοστοιχεία που παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία. Επίσης λόγω της ωρίμανσης της δεν περιέχει λακτόζη και είναι κατάλληλο για κατανάλωση από άτομα με δυσανεξία. Συγκεκριμένα έμφαση δίνεται στο ασβέστιο (Ca) που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις καθώς και στα βιοενεργά πεπτίδια, όπου και τα δύο συμβάλλουν στην αντιμετώπιση διαφόρων διαταραχών όπως υπέρταση, οστεοπόρωση, παχυσαρκία κ.α. Επιπλέον εξίσου σημαντική είναι η συνεισφορά της φέτας σε αμινοξέα καθώς διαθέτει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για τον οργανισμό (Walther et al., 2008). Ωστόσο η περιεκτικότητά των παραπάνω θρεπτικών συστατικών ποικίλει, καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως: η σύσταση του γάλακτος, η μικροβιακή χλωρίδα του προϊόντος, η περιεκτικότητα σε αλάτι, οι συνθήκες και η διάρκεια της ωρίμανσης κ.α (Moatsou and Govaris,2011; Katsouri et al., 2020). Για παράδειγμα οι συνθήκες και η διάρκεια της ωρίμανσης καθορίζει τον τύπο της πρωτεόλυσης και της λιπόλυσης επιδρώντας έτσι στην σύσταση του τελικού προϊόντος (Katsouri et al.,2020). Κατά προσέγγιση η θρεπτική σύσταση της φέτας σύμφωνα με τον USDA (2019) είναι η παρακάτω:

**Πίνακας 1.1:** Θρεπτικά συστατικά φέτας, ανά 100g προϊόντος (USDA,2019).

Θρεπτικά Συστατικά	Φέτα (100g)
Νερό(g)	55.2
Ενέργεια(kcal)	265
Ενέργεια(kJ)	1110
Πρωτεΐνες (g)	14.2
Συνολικά Λιπίδια(Λίπη)	21.5
Λιπαρά οξέα(κορεσμένα)(g)	13.3
Λιπαρά οξέα(μονοακόρεστα)(g)	4.62
Λιπαρά οξέα(πολυακόρεστα)(g)	0.591
Υδατάνθρακες (g)	3.88
Αλάτι(g)	2.3
Ασβέστιο, Ca(mg)	493
Σίδηρος Fe(mg)	0.65

Μαγνήσιο, Mg (mg)	19
Φώσφορος, P(mg)	337
Κάλιο, K(mg)	62
Νάτριο, Na(mg)	1140
Ψευδάργυρος, Zn(mg)	2.88
Χαλκός, Cu(mg)	0.032
Μαγγάνιο, Mn (mg)	0.028
Σελήνιο, Se(mg)	15
Βιταμίνη Β6 (mg)	0.424
Βιταμίνη Β12(mg)	1.69
Βιταμίνη Ε(mg)	0.18
Θειαμίνη(Β1)(mg)	0.154
Ριβοφλαβίνη(Β2)(mg)	0.844
Νιασίνη(Β3)(mg)	0.991

*Πίνακας 1.2:* Περιεκτικότητα φέτας σε αμινοξέα, ανά 100g προϊόντος (USDA,2019).

Αμινοξέα(g)	Φέτα (100g)
Βαλίνη	1.06
Λευκίνη	1.4
Ισολευκίνη	0.803
Θρεονίνη	0.637
Ιστιδίνη	0.397
Λυσίνη	1.22
Τρυποφάνη	0.2
Φαινυλαλανίνη	0.675
Μεθεινίνη	0.368
Γλουταμινικό οξύ	2.42
Ασπαραγινικό οξύ	0.779
Αργυνίνη	0.47
Προλίνη	1.38
Σερίνη	1.17
Γλυκίνη	0.097

Η σύσταση της φέτας αλλά και άλλων τυριών παρόμοιων με την φέτα κυμαίνεται από 45–60% υγρασία, 10–20% λίπος, 15–20% πρωτεΐνη, 4.6–5.3 pH και 5–10% αλάτι (Hammam et al., 2022).

### 1.2.2 Στάδια παραγωγής της φέτας

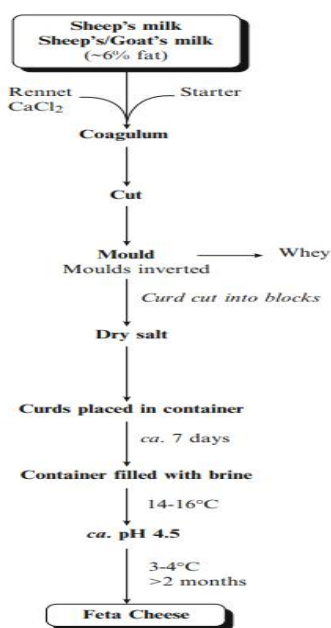
Παραδοσιακά η παρασκευή της φέτας γινόταν με νωπό γάλα προβάτου, χωρίς την προσθήκη καλλιεργειών εκκίνησης και η διαμόρφωση της χαρακτηριστικής γεύσης και υφής της ήταν αποτέλεσμα της ανάπτυξης της φυσικής γαλακτικής μικροχλωρίδας καθώς και κάποιων επιμολυντών από το περιβάλλον παρασκευής της φέτας (Zygouris, 1952). Αν και το γάλα καλής ποιότητας επιδρούσε θετικά στην άμεση ωρίμανση και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας, υπήρχε κίνδυνος παρασκευής ελαττωματικών και επικίνδυνων τελικών προϊόντων για την υγεία του καταναλωτή, ειδικά σε περιόδους υψηλής θερμοκρασίας. Έτσι οι φορείς της δημόσιας υγείας επέβαλλαν την παστερίωση του γάλακτος, ενώ δίνεται μεγάλη σημασία στις καλές συνθήκες υγιεινής, στην παραγωγή ασφαλούς προϊόντος αλλά και στην μείωση της πιθανότητας αλλοίωσης (Bintsis and Robinson, 2004). Οι πρακτικές αυτές σε συνδυασμό με την προσθήκη ανθεκτικών καλλιεργειών βακτηρίων εκκίνησης που προωθούν την όξυνση της φέτας, έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ασφαλών και τυποποιημένων προϊόντων που υστερούν όμως γευστικά (Law, 1999).

Αναλυτικά η διαδικασία παρασκευής της φέτας είναι η εξής:

Το νωπό γάλα μεταφέρεται σε θερμοκρασία ψύξης (4 °C) στο εργοστάσιο όπου πραγματοποιείται η παστερίωση στους 72 °C για 15 sec. Αφότου πέσει η θερμοκρασία στους 32 °C προστίθενται καλλιέργειες εκκίνησης, το χλωριούχο ασβέστιο και μετά από 30 min προστίθεται και η πυτιά, με αποτέλεσμα το γάλα να πήξει μετά από 50-60 min. Μετά την πήξη του γάλακτος το τυρόπηγμα που προκύπτει τοποθετείται σε ειδικά καλούπια και αφήνεται να φυσική στράγγιση χωρίς πίεση. Κατά την φυσική στράγγιση, το τυρόπηγμα που προκύπτει υποβάλλεται σε ξηρό επιφανειακό αλάτισμα με χοντρόκοκκο αλάτι. Στην επιφάνεια έτσι του τυροπήγατος αναπτύσσεται η μικροχλωρίδα στην οποία οφείλονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας, ενώ παράλληλα συμβάλλουν στην ωρίμανση. Κατόπιν το τυρόπηγμα τοποθετείται σε ξύλινους ή μεταλλικούς υποδοχείς όπου προστίθεται άλμη με χλωριούχο νάτριο 7% κατά βάρος και αποθηκεύεται σε θαλάμους ωρίμανσης με συνθήκες θερμοκρασίας έως 18 °C και ΣΥ 85%. Αυτό αποτελεί το πρώτο στάδιο της ωρίμανσης, με διάρκεια 15



ημέρες, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο οι υποδοχείς που φέρουν το τυρόπηγμα τοποθετούνται σε θαλάμους ψύξης με σταθερές συνθήκες 2-4 °C και ΣΥ τουλάχιστον 85%. Ο συνολικός χρόνος της ωρίμανσης και για τα δύο στάδια είναι τουλάχιστον 2 μήνες (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014). Με το τέλος της ωρίμανσης το pH είναι κάτω από 4.6 και η υγρασία της φέτας περίπου 55% (Mauropoulos and Arvanitoyiannis, 1999).



Εικόνα 1.1: Στάδια παρασκευής της φέτας (Fox et al., 2017).

### 1.2.3 Μικροβιακή χλωρίδα φέτας

Η μικροβιακή σύσταση της φέτας επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η ποιότητα του νοπού γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη, η θερμική επεξεργασία, η μικροβιακή επιμόλυνση κατά την παρασκευή της (κυρίως κατά την ξηρή αλάτιση), οι εκκινητήριες καλλιέργειες κτλ. (Abd El-Salan and Alichanidis, 2004). Η μικροβιακή χλωρίδα της φέτας και κυρίως αυτή που κυριαρχεί καθ' όλη την παρασκευής της έχει άμεση επίδραση στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της. Οι κύριοι μικροοργανισμοί που επικρατούν στην φέτα είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) ως καλλιέργειες εκκίνησης (SLAB), είτε ως μη εκκινητήριες καλλιέργειες (NSLAB), καθώς και οι ζύμες (Papadimitriou et al., 2022).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι μια ετερογενής ομάδα μικροοργανισμών με φυσιολογικές ομοιότητες και ποικίλα μορφολογικά χαρακτηριστικά (ράβδοι, κόκκοι). Είναι Gram+, προαιρετικά αναερόβια και έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν τα

σάκχαρα του γάλακτος (λακτόζη) παράγοντας γαλακτικό οξύ με ομο- ή ετερο-ζυμωτικό μεταβολισμό. Οι μικροοργανισμοί αυτοί λόγω της μειωμένης ικανότητάς τους να βιοσυνθέτουν (Klaenhammer et al., 2005), λαμβάνουν θρεπτικά συστατικά από περιβάλλοντα που είναι πλούσια σε άζωτο και άνθρακα όπως οι πρώτες ύλες των ζώων (πχ γάλα), τα ζυμούμενα προϊόντα όπου είναι και το φυσικό τους περιβάλλον κ.α. (Salminen and von Wright, 1998). Τα LAB έχουν εκτεταμένη εφαρμογή στην βιομηχανία καθώς λόγω των δυνατοτήτων του μεταβολισμού τους συμβάλλουν στην διαμόρφωση της γεύσης, της ποιότητας, της διατροφικής αξίας και της ασφάλειας των ζυμούμενων προϊόντων (Settanni and Moschetti, 2010). Επιπλέον κάποια στελέχη έχουν προβιοτικές ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ζυμούμενα τρόφιμα για ποικίλες χρήσεις, όπως για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, μέσω παραγωγής βακτηριοσινών, για την προσθήκη συμπληρώματος θρεπτικών συστατικών (Almutairi, et al., 2021), καθώς και για την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους (Kavas et al., 2021). Λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους στα ζυμούμενα προϊόντα τα περισσότερα LAB χαρακτηρίστηκαν από τον FDA και την EFSA ως ασφαλή, δίνοντας τα ακρωνύμια GRAS (Generally Regarded As Safe) και QPS (Qualified Presumption of Safety) αντίστοιχα. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, και κάποια γένη *Streptococcus* (EFSA 2007).

Τα LAB είναι απαραίτητα για την παρασκευή της φέτα όπως και άλλων τυριών. Κάποια από αυτά χρησιμοποιούνται ως εκκινητήριες καλλιέργειες, καθώς έχουν την δυνατότητα να ζυμώνουν την λακτόζη με ταχύτατους ρυθμούς και να συμβάλλουν έτσι στην άμεση όξυνσή του τυροπήγματος (Bintsis and Papadimas, 2002; Settanni and Moschetti, 2010). Η κατηγορία αυτή των LAB που σχετίζεται με τις εκκινητήριες καλλιέργειες για την παρασκευή ζυμούμενων προϊόντων ονομάζεται SLAB (Starter Lactic Acid Bacteria) και συγκεκριμένα στην περίπτωση της φέτας περιλαμβάνει τα είδη *Lactococcus lactis* και *Leuconostoc spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* και *Lactobacillus helveticus*, ενώ προστίθενται είτε μέσω γιαουρτιού, είτε απευθείας (Fox et al., 2004). Τα SLAB αυξάνονται μέχρι και το πρώτο στάδιο της ωρίμανσης, και στη συνέχεια μειώνονται ραγδαία (Abd El-Salan and Alichanidis, 2004). Η πτώση αυτή οφείλεται πιθανόν στο χαμηλό pH (4.4-4.6) και στην υψηλή περιεκτικότητα του τυροπήγματος σε αλάτι (3%) (Manolopoulou et al., 2003; Bintsis and Papadima, 2002; Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2014).

Άλλη κατηγορία των LAB σχετίζεται με την ωρίμανση της φέτας και ονομάζεται NSLAB (Non-Starter Lactic Acid Bacteria). Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται κυρίως είδη του γένους *Lactobacillus* όπως : *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus rhamnosus among facultatively heterofermentative species* και *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri* και *Lactobacillus brevis* καθώς και άλλα είδη όπως *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* και *Leuconostoc* (Settanni and Moschetti, 2010). Από όλους τους παραπάνω πιο διαδεδομένος είναι ο *Lactobacillus plantarum* (Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 1992; Manopoulou et al., 2003). Τα NSLAB είτε υπάρχουν στο γάλα εξ αρχής και επιβιώνουν κατά την παστερίωση είτε επιμολύνουν στην συνέχεια το τυρί ή την άλμη από το περιβάλλον της παραγωγής (Papadimitriou et al., 2020). Η κατηγορία αυτή των LAB είναι η κυρίαρχη μικροχλωρίδα της φέτας καθώς αρχίζει να αυξάνεται κατά την ωρίμανση και συνεχίζει λίγους μήνες μετά (Fox et al., 2004). Παρατηρήθηκε ότι το 90 και 95% από LAB που απομονώθηκαν από φέτα 30 και 90 ημερών ωρίμανσης αντίστοιχα άνηκε σε αυτή την κατηγορία καθώς το περιβάλλον της φέτας ευνοεί την ανάπτυξή τους (Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 1992; Bintsis and Papadima, 2002). Η επικράτηση αυτής της ομάδας των μικροοργανισμών στο στάδιο της ωρίμανσης, όπου απουσιάζει λακτόζη (έχει μεταβολιστεί στα προηγούμενα στάδια), οφείλεται στην ικανότητά τους να χρησιμοποιούν εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως γαλακτικό και κιτρικό οξύ, ριβόζη, λιπαρά οξέα, αμινοξέα κ.α. (Blaya et al., 2018). Από τα SNLAB οι εντερόκοκκοι εμφανίζονται σε υψηλούς πληθυσμούς κατά το στάδιο της ωρίμανσης πολλών τυριών συμπεριλαμβανομένων της φέτας (Sarantinopoulos et al., 2002). Αν και συμβάλλουν σημαντικά στην χαρακτηριστική ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης πολλών τυριών, υπάρχει δυσπιστία ως προς την επικράτηση και την χρήση τους σε φρέσκα ή ζυμούμενα τρόφιμα, καθώς μερικά στελέχη του γένους *Enterococcus* είναι προαιρετικά παθογόνα (Tsanasidou et al., 2021).

Οι ζύμες που αναπτύσσονται στο τυρί έχουν διπλό ρόλο καθώς είτε συμβάλουν στην ανάπτυξη της γεύσης κατά την ωρίμανση, είτε αποτελούν αλλοιωγόνων μικροοργανισμό (Westall et al., 1998). Τα βασικότερα είδη που εμφανίζονται στην φέτα είναι τα εξής: *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*,

*Pichia membranifaciens*, *Torulasporea delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida sake* και *Kluyveromyces lactis* (Rantsiou et al., 2008). Ο όγκος των κυττάρων τους είναι 50 φορές μεγαλύτερος από αυτόν των βακτηρίων και ο ρόλος τους είναι να αναπτύσσονται στην επιφάνεια της φέτας μετά το στάδιο της αλάτισης, συμβάλλοντας ενεργά στην ανάπτυξη της χαρακτηριστικής γεύσης (Yanai et al., 1977; Abd El-Salan and Alichanidis, 2004). Αν και οι ζύμες δεν προστίθενται κατά την παραγωγή του τυριού, η εμφάνισή τους οφείλεται σε πιθανές επιμολύνσεις από το περιβάλλον της παραγωγής, την άλμη, τον εξοπλισμό κ.α. (Manolopoulou et al., 2003). Η επιβίωση τους στο περιβάλλον του τυριού οφείλεται στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε χαμηλό pH, υψηλή αλατότητα, χαμηλές θερμοκρασίες και χαμηλά ποσοστά υγρασίας (Viljoen, 2001).

#### **1.2.4 Παθογόνοι και αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στην φέτα**

Το τυρί αν και αποτελεί ένα προϊόν υψηλό σε θρεπτικά συστατικά, σε αντίθεση με το γάλα, αποτελεί ένα από τα πιο ασφαλή προϊόντα για κατανάλωση. Συγκριτικά με την παγκόσμια παραγωγή του τυριού, οι περιπτώσεις τροφιμογενών ασθενειών που έχουν καταγραφεί παγκοσμίως μετά από κατανάλωση τυριών, είναι λίγες. Στις περιπτώσεις αυτές υπεύθυνοι για την πρόκληση των ασθενειών αυτών ήταν οι εξής μικροοργανισμοί: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (0157:H7) *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (Little et al., 2008; Fox et al., 2017). Έρευνες έδειξαν ότι τα παθογόνα προέκυψαν από νοπό ή μη επαρκώς παστεριωμένο γάλα, είτε από παστεριωμένο γάλα που επιμολύνθηκε από το περιβάλλον παρασκευής του (Little et al., 2008). Γενικότερα η ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το αρχικό επίπεδο της επιμόλυνσης, το είδος και η αποτελεσματικότητα της θερμικής επεξεργασίας, η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, η ανθεκτικότητά τους στην οξύτητα και το αλάτι, οι συνθήκες παραγωγής και η σύσταση του προϊόντος (Bintsis and Papadimas, 2002). Στην φέτα έχουν βρεθεί όλα τα παραπάνω παθογόνα με σημαντικότερο και πιο διαδεδομένο την *Listeria monocytogenes*.

Η *Listeria monocytogenes* (Gram+) θεωρείται το πιο επικίνδυνο από τα παραπάνω παθογόνα καθώς η ασθένεια που προκαλεί (λιστερίωση) έχει υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες (Donnelly, 2001). Σύμφωνα με την EFSA (2015), τα κρούσματα λιστερίωσης αυξήθηκαν την περίοδο από το 2009-2013, όπου

κάποιες περιπτώσεις αφορούσαν μαλακά τυριά. Η *Listeria monocytogenes* παρουσιάζεται πιο συχνά στο τυρί από το γάλα και ιδιαίτερα στα μαλακά τυριά (Lianou and Sofos, 2007). Για τον λόγο αυτό η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (ΕΕ) μέσω του κανονισμού (EC 2073/2005) και της τροποποίησης του αργότερα (EC 1441/2007), έθεσε ως μέγιστο φορτίο της στα τρόφιμα την στιγμή της κατανάλωσης και κατά την διάρκεια ζωής τους στο ράφι τα 100 CFU/g ή CFU/ml. Η *Listeria monocytogenes* είναι ανθεκτικός μικροοργανισμός και μπορεί να επιβιώσει σε στρεσογόνα περιβάλλοντα όπως αυτά των γαλακτοκομικών, με υψηλή οξύτητα και υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι (Belessi et al., 2008). Συγκεκριμένα έχει την δυνατότητα να επιβιώσει σε συνθήκες από -0.4 έως 45 °C, σε τιμές pH από 4.4-9.4 και αλατότητα έως 10 % NaCl (Fox et al., 2017). Στην φέτα έχει παρατηρηθεί η επιβίωση και ανάπτυξη της μετά από αποθήκευση 90 ημερών στους 4 °C σε τιμή pH 4.3 (Parageorgiou and Marth, 1989). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η επιμόλυνση στην φέτα πραγματοποιείται κυρίως κατά την ωρίμανσή της (Belessi et al., 2008). Αυτό πιθανόν συμβαίνει λόγω της ανάπτυξης των ζυμών στην επιφάνεια της φέτας, στο στάδιο της ωρίμανσης, οι οποίες αυξάνουν το pH και ευνοούν έτσι την ανάπτυξη της (Ramsaran et al., 1998; Morgan et al., 2001). Τέλος ένας βασικός λόγος που καθιστά δύσκολο τον έλεγχο της μετάδοσής της στα τρόφιμα είναι το γεγονός ότι μπορεί να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε περιβάλλον ψύξης και χαμηλής ενεργότητας ύδατος που είναι και οι συνθήκες συνθήκες διακίνησης και συντήρησης των τροφίμων για τον περιορισμό των παθογόνων (Mena et al., 2004).

Ο *Staphylococcus aureus* είναι προαιρετικά αναερόβιος Gram+ κόκκος και συναντάται στους βλεννογόνους και το δέρμα του ανθρώπου και των ζώων, μέσω των οποίων γίνεται η επιμόλυνση στα τρόφιμα. Κάποια στελέχη έχουν την δυνατότητα να παράγουν εντεροτοξίνες και να προκαλούν έτσι σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση (Staphylococcal food poisoning, SFP) που εκδηλώνεται με έντονη ναυτία εμετό, κράμπες στο στομάχι κτλ. (Le Loir et al., 2003; Argudín, et al., 2010). Μπορεί να επιβιώσει σε εύρος θερμοκρασιών από 7 έως 48.5 °C και σε pH 4.2-9.3 καθώς και σε περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα (15% NaCl). Η ιδιότητά του αυτή, του δίνει την δυνατότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε ζυμούμενα προϊόντα, όπως τα τυριά (Le Loir et al., 2003). Θεωρείται η τρίτη σημαντικότερη αιτία πρόκλησης τροφιμογενούς ασθένειας παγκοσμίως (Normanno et al., 2005).

Το βακτήριο *E. Coli* (O157:H7) είναι ένας προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και συναντάται στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Ο συγκεκριμένος ορότυπος διαφέρει από άλλους του είδους αυτού και μπορεί να επιβιώνει σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH της τάξης του 4.0 έως 4.5 (Doyle and Benchat, 2007). Η ασθένεια εκδηλώνεται με διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα κ.α., ενώ μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο (Meng et al., 2001).

Η *Salmonella* είναι Gram+ προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα σε ποικίλα περιβάλλοντα, ακόμα και στο ψυγείο καθώς είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός (2-4°C) (Doyle and Benchat, 2007). Έχουν καταγραφεί αρκετά περιστατικά ασθενειών που οφείλονται στην *Salmonella* μετά από κατανάλωση τυριών, ακόμα και όταν βρισκόταν σε μικρές δόσεις (Hedberg et al., 1992). Η ασθένεια εκδηλώνεται με ναυτία, εμετό και διάρροια κ.α. (D'Aoust et al., 2001).

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση της φέτας είναι οι ζύμες, οι οποίες όταν αυξάνονται σε αριθμό  $> 10^4 - 10^6$  CFU/g επιδρούν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά της (Laslo and György, 2018; Tokak et al., 2019). Η ανάπτυξη των αλλοιωγόνων ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα εξαρτάται από τις συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας κατά την αποθήκευση καθώς και από την σύσταση του γάλακτος, την περιεκτικότητα σε αλάτι, την ενεργότητα νερού, το pH, αλλά και την παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών (Carrasco et al., 2006). Στην φέτα και σε άλλα τυριά άλμης οι ζύμες προκαλούν αλλοιώσεις που χαρακτηρίζονται από την απελευθέρωση δυσάρεστων οσμών και γεύσεων (ταγκή γεύση, πικράδα, φρουτώδη γεύση κτλ), από παραγωγή CO<sub>2</sub>, αποχρωματισμό καθώς και αλλαγή στην υφή (Geronikou et al., 2020).

## **1.3 Βιοσυντήρηση**

### **1.3.1 Βιοσυντήρηση των τροφίμων**

#### **1.3.1.1 Βιοσυντήρηση μέσω της χρήσης βιοπροστατευτικών LAB καλλιιεργειών**

Ο όρος βιοσυντήρηση αναφέρεται στην παρατεταμένη διάρκεια ζωής και στην ενισχυμένη ασφάλεια των τροφίμων μέσω της φυσικής ή προστιθέμενης μικροχλωρίδας, ή των αντιμικροβιακών προϊόντων της (Schnürer and Magnusson, 2005) και αποτελεί έναν φυσικό τρόπο προστασίας των τροφίμων έναντι της

ανάπτυξης αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Settani, and Moschetti, 2010), χωρίς να μεταβάλλει ουσιαστικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Souza et al., 2022). Η βιοσυντήρηση επιτυγχάνεται με την χρήση βιοπροστατευτικών βακτηριακών καλλιεργειών που αφορούν κατά κόρων τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και κυρίως αυτά του γένους *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, και *Enterococcus* (Souza et al., 2022). Τα βακτήρια αυτά για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες σε εμπορική κλίμακα στα τρόφιμα θα πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις, όπως να είναι γενετικά σταθερά, να έχουν αποτελεσματική παρεμποδιστική δράση όταν βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις έναντι παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε διάφορα τρόφιμα, να έχουν μικρές διατροφικές απαιτήσεις, να αντέχουν σε δυσμενή περιβάλλοντα και κατά την επεξεργασία καθώς και να μην προκαλούν τοξικότητα ή ασθένεια στον ξενιστή τους (Holzapfel et al., 1995). Χρησιμοποιούνται για την βιοσυντήρηση πολλών τροφίμων και ζωοτροφών λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που κατέχουν, όπως ο ανταγωνισμός σχετικά με την απόκτηση θρεπτικών, η μείωση του pH λόγω του ζυμωτικού μεταβολισμού τους, καθώς και η παραγωγή παρεμποδιστικών (αντιμικροβιακών) μεταβολιτών (Delavenne et al., 2013). Συγκεκριμένα μεταβολίτες όπως αλκοόλες, οργανικά οξέα, διοξείδιο του άνθρακα, διακετύλιο, υπεροξείδιο του υδρογόνου, βακτηριοσύνες κ.α., επιδρούν αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Helander et al., 1997). Αποτελούν κυρίαρχη μικροχλωρίδα σε πολλά τρόφιμα κατά την αποθήκευση και είναι ασφαλή (GRAS, Generally Recognized as Safe) για κατανάλωση ,ενώ έχει αποδειχθεί ότι κάποια από αυτά έχουν θετική επίδραση στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων (προβιοτικά) (Stiles, 1996). Η προβιοτική τους δράση οφείλεται στην παραγωγή ωφέλιμων για την υγεία ουσιών, όπως βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και βιοενεργά πεπτίδια (Favaro et al., 2015). Έτσι αποτελούν ιδανικό υποκατάστατο των χημικών συντηρητικών όπως το βενζοϊκό και το σορβικό οξύ, γεγονός που συμβαδίζει με τις σημερινές προτιμήσεις των καταναλωτών (Ortiz-Rivera et al., 2017).

### 1.3.1.2 Βιοσυντήρηση μέσω της χρήσης CFCs (Cell-Free Supernatants) των LAB

Αν και η προσθήκη των ίδιων των βακτηριακών καλλιιεργειών στα τρόφιμα έχει πολλά οφέλη συγκριτικά με τα χημικά συντηρητικά (Sidler et al., 2020), προκύπτουν σημαντικά προβλήματα από την εφαρμογή τους. Ένα από αυτά αφορά την συμβατότητα μεταξύ τροφίμου και καλλιέργειας εκκίνησης που επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση και την ανάπτυξη της στο τρόφιμο (Moradi et al., 2020). Επιπλέον είναι πιθανή η ανάπτυξη αρνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των καλλιιεργειών εκκίνησης και των συμπληρωματικών καλλιιεργειών όταν προστίθενται στα τρόφιμα (Pujato et al., 2014). Ακόμα έχει αναφερθεί ότι οι προβιοτικές καλλιέργειες χάνουν πολλές φορές την ζωτικότητα τους καθώς επηρεάζονται σημαντικά από την επεξεργασία που υφίστανται τα τρόφιμα ως προς την σύστασή τους (pH, λίπος, ενεργότητα νερού κ.α.) κατά την βιομηχανική μεταχείριση και από τις συνθήκες αποθήκευσής τους (χρόνος, θερμοκρασία, συσκευασία κ.α.) επιδρώντας αρνητικά στις τεχνολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες των τροφίμων (Collado et al., 2019). Τέλος η προσθήκη των μικροοργανισμών αυτών στα τρόφιμα μπορεί να μεταβάλλει σημαντικά τα μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου το οποίο δεν είναι επιθυμητό (Moradi et al., 2020). Ωστόσο οι αντιμικροβιακές ουσίες που εκκρίνονται από τις καλλιέργειες αυτές είναι αποτελεσματικές έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και εμφανίζουν σημαντικές προοπτικές ως προς την χρήση τους για την ενίσχυση της ασφάλειας και συντήρησης των τροφίμων καθώς και της υγείας των καταναλωτών (Barros et al., 2020; Moradi et al., 2020). Πιο αναλυτικά οι αντιμικροβιακές ουσίες αυτές αναφέρονται ως “postbiotics” και ορίζονται ως : « α) βιοδραστικοί διαλυτοί παράγοντες (προϊόντα ή μεταβολικά παραπροϊόντα) που παράγονται από μικροοργανισμούς κατάλληλους για τρόφιμα κατά την διάρκεια της ανάπτυξης ή της ζύμωσης σε σύνθετη μικροβιακή καλλιέργεια (Υπερκείμενο διάλυμα απαλλαγμένο από κύτταρα, Cell-Free Supernatant, CFS), β) κυτταρικές ενώσεις, γ) ουσίες που παράγονται από την δράση των μικροοργανισμών σε συστατικά των τροφίμων (πχ βιοδραστικά πεπτίδια)» (Moradi et al., 2020). Τα “postbiotics” που εκκρίνουν τα LAB αφορούν αντιμικροβιακούς μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους όπως οργανικά οξέα, ακεταλδεΐδες, υπεροξειδίο του υδρογόνου κ.α. καθώς και μεγάλου μοριακού βάρους όπως βακτηριοσύνες (Moradi et al., 2020). Οι βιοδραστικοί αυτοί μεταβολίτες προστίθενται στα τρόφιμα μέσω των CFSs αφότου έχει προηγηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο θρεπτικό μέσο, κατόπιν η έκκριση των



μεταβολιτών του στο μέσο αυτό, η φυγοκέντρωση και τέλος το φιλτράρισμα για τον καθαρισμό του διαλύματος. Έτσι προκύπτει ένα υγρό μέσο απαλλαγμένο από τα κύτταρα του μικροοργανισμού, ικανό να χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας. Στα CFSs τελικά περιέχονται κυρίως οργανικά οξέα, δευτερογενείς μεταβολίτες από την ανάπτυξη των βακτηρίων καθώς και υπολείμματα από το θρεπτικό μέσο, ενώ η αντιμικροβιακή τους δράση οφείλεται κυρίως στο γαλακτικό και οξικό οξύ, που δρουν αποτελεσματικά κατά των βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών. Η χρήση τους συγκριτικά με την χρήση μεμονωμένων μεταβολιτών είτε μεταβολιτών που έχουν προηγουμένως εξευγενιστεί εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς τα CFSs αποτελούν ένα σύνολο μεταβολιτών με ευρύ αντιμικροβιακό πεδίο (Mani-Lopez et al., 2020). Επιπλέον οι μεμονωμένοι εξευγενισμένοι μεταβολίτες χάνουν άμεσα την ικανότητά τους να συμβάλλουν στην συντήρηση των τροφίμων (Einarsson and Lauzon, 1995). Η χρήση των CFSs αποτελεί πιο αποτελεσματικό μέσο για την αύξηση της συντήρησης και της ασφάλειας των τροφίμων σε σχέση με την χρήση προβιοτικών καλλιιεργειών, καθώς τα CFSs έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα όπως τα εξής:

1. Δεν αλληλοεπιδρούν με τα συστατικά του τροφίμου αυξάνοντας την διάρκεια ζωής του (de Almada et al., 2016)
2. Δεν επηρεάζονται από την μεταβολή του pH ή της θερμοκρασίας (de Almada et al., 2016; Aguilar-Toala et al., 2018)
3. Δεν αλλάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Swigwedha et al., 2014; de Almada et al., 2016 ; Aguilar-Toala et al., 2018)
4. Πιθανόν μετά τη προσθήκη τους να μην απαιτείται χρήση της ψυκτικής αλυσίδας για την αποθήκευση και μεταφορά των τροφίμων (Swigwedha et al., 2014)

### **1.3.2 Βιοσυντήρηση των τυριών**

Τα τυριά αν και χαρακτηρίζονται ως ασφαλή προϊόντα (Little et al., 2008), λόγω των πρόσφατων περιστατικών τροφιμογενών ασθενειών που συνδέθηκαν με την κατανάλωσή τους (EFSA 2015), είναι απαραίτητη η ενίσχυση της ασφάλειάς τους έναντι διαφόρων αλλοιωγόνων και κυρίως παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Listeria monocytogenes* (Papadopoulou et al., 2018). Μέχρι τώρα οι συμβατικές μέθοδοι συντήρησης αφορούσαν την προσθήκη συντηρητικών όπωςθειώδη, οξικό οξύ, προπιονικά, βενζοϊκά, εξαμεθυλενοτετραμίνες, βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) κ.α., εγκεκριμένα από την ΕΕ

(EU1129/2011, 2011), σε αυστηρά πλαίσια. Ωστόσο η προσθήκη χημικών συντηρητικών δεν ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των καταναλωτών για πιο φυσικά και ασφαλή για την υγεία συντηρητικά (Moula et al., 2022). Η προσθήκη βιοπροστατευτικών βακτηριακών καλλιέργειών ή των αντιμικροβιακών μεταβολιτών τους, αποτελεί φυσική και αποτελεσματική στρατηγική για την αντιμετώπιση αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών στα τυριά, ενισχύοντας την ασφάλεια και την χρόνο ζωής τους. Οι καλλιέργειες αυτές αφορούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και μεταβολικά παράγωγά τους όπως οι βακτηριόσυνες. Οι βιοπροστατευτικές καλλιέργειες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της ασφάλειας των τυριών περιλαμβάνουν διάφορα είδη των LAB, όπως *Lc. lactis*, *Lpb. plantarum*, *Lcb. paracasei*, *Lcb. rhamnosus*, *Lvb. brevis*, *Lb. sakei*, *E. faecium* και *Carnobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* και *Propionibacterium spp* (Bintsis and Papadima, 2024). Πιο αναλυτικά η βιοσυντήρηση των τυριών μέσω των βιοπροστατευτικών καλλιέργειών των LAB μπορεί να επιτευχθεί με 3 αντιμικροβιακούς μηχανισμούς (Bintsis and Papadima, 2024):

#### **A) Παραγωγή μεταβολιτών**

Τα LAB εκκρίνουν μεταβολίτες οι οποίοι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων και μυκήτων. Τα οργανικά οξέα που προκύπτουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δραστηριότητας των LAB κατά την ανάπτυξή τους (Izco et al., 2002) με κυριότερα από αυτά το γαλακτικό, το οξικό και το προπιονικό οξύ (Haylaloglu, 2016). Το επίπεδο του κάθε οργανικού οξέος επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι οι εκκινητήριες καλλιέργειες, οι συμπληρωματικές καλλιέργειες, καθώς και οι καλλιέργειες των NSLAB που αναπτύσσονται κατά την ωρίμανση (Manolaki et al., 2006). Η δράση τους οφείλεται είτε στην μείωση του pH παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη ανεπιθύμητων αλλοιογόνων μικροοργανισμών, είτε στην όξυνση του κυτταροπλάσματος μέσω της διάχυσης στο κυτταρόπλασμα και της έκκρισης ιόντων H<sup>+</sup>, είτε στην αδρανοποίηση του κυτταρικού μεταβολισμού μέσω της μετουσίωσης των πρωτεϊνών των κυτταρικών μεμβρανών. Τα οξέα αυτά εμφανίζουν σημαντικές προοπτικές ως προς την χρήση τους για την ενίσχυση της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων ενώ παράλληλα συμβάλλουν σημαντικά βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους (Ahansaz et al., 2023). Άλλοι μεταβολίτες όπως η ακετοΐνη και το διακετύλιο, αλληλοεπιδρούν με την αργινίνη εμποδίζοντας των σχηματισμό

διαφόρων πρωτεϊνών, ενώ το διακετύλιο εμπλέκεται επίσης στην αποδιάταξη του DNA. Τέλος άλλοι μεταβολίτες με παρεμποδιστική δράση αποτελούν το υπεροξειδίο του υδρογόνου, λιπαρά οξέα όπως το δεκανοϊκό οξύ και οι βακτηριοσύνες (Souza et al., 2022).

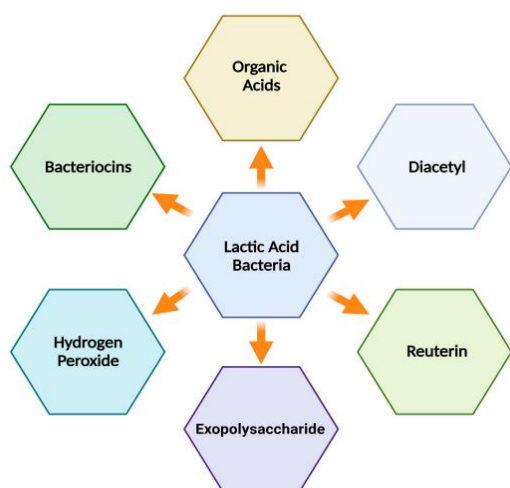
## **B) Παραγωγή βακτηριοσινών**

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν πεπτίδια ή πρωτεΐνες που συντίθενται από τα ριβοσώματα των LAB αλλά και άλλων Gram+ βακτηρίων. Η δράση τους διακρίνεται σε βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατική (Silva et al., 2018), ενώ διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, την Κλάση I (μικρά πεπτίδια), την Κλάση II (μη τροποποιημένες βακτηριοσίνες) και την Κλάση III (μεγάλα πεπτίδια >10 kDa, θερμικά ασταθείς). Στην Κλάση I περιλαμβάνονται γνωστά αντιβιοτικά όπως η νισίνη και η λακτικίνη 3147, στην Κλάση II περιλαμβάνονται κυκλοποιημένα πεπτίδια όπως εντεροσίνη AS-48 και πεδιοκίνες που παράγονται από το γένος *Pediococcus spp*, ενώ στην Κλάση III κατατάσσεται μια νέα βακτηριοσίνη Helveticin-M, που παράγεται από τον *Lactobacillus crispatus* (Young and Sullivan, 2011). Η αντιβακτηριακή δράση τους βασίζεται στην επίδραση του κυτταρικού περιβλήματος και στην δημιουργία πόρων, διαταράσσοντας την μεταφορά των πρωτονίων μέσω των μεμβρανών και προκαλώντας έτσι το θάνατο του κυττάρου. Η νισίνη αποτελεί κλασικό παράδειγμα εφαρμογής των παραπάνω μηχανισμών καθώς προκαλεί την δημιουργία πόρων και παρεμποδίζει την βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Bintsis and Papadima, 2024). Επιπλέον κάποιες βακτηριοσίνες προκαλούν τον θάνατο των κυττάρων μέσω της παρεμπόδισης της γονιδιακής έκφρασης και έτσι της παραγωγής πρωτεϊνών (Silva et al., 2018). Η νισίνη, η λακτικίνη 3147 και 481, η πεδιοκίνη AcH, η θερμοφιλίνη, η μακεδοκίνη, η ρευτερίνη και η εντεροκίνη AS-38 and KP είναι κάποιες από τις βακτηριοσίνες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα τυριά (Gratterpanche et al., 2008; Favaro et al., 2015; Silva et al., 2018). Οι βακτηριοσίνες εισάγονται στα τρόφιμα μετά τον εξευγενισμό τους, συμβάλλοντας στην εκτεταμένη συντήρηση αλλά και ασφάλειά τους. Η εφαρμογή τους όμως στα τρόφιμα δεν είναι τόσο αποτελεσματική λόγω των προβλημάτων που προκύπτουν, όπως η απορρόφησή τους από τα συστατικά του τροφίμου, η διάσπασή τους από διάφορα ένζυμα, το μεγάλο κόστος για τον εξευγενισμό τους κτλ. και για τον λόγο αυτό η χρήση τους είναι περιορισμένη. Ωστόσο έρευνες έχουν δείξει ότι η ενσωμάτωσή τους σε τυριά έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

ενισχύοντας σημαντικά την ασφάλειά τους. Επιπλέον συμβάλλουν τόσο στην βελτίωση της γεύσης όσο και της ωρίμανσής των τυριών. Έως τώρα η νομοθεσία είναι ιδιαίτερα αυστηρή και επιτρέπει την εμπορική χρήση μόνο της νισίνης και της πεδιοκίνης ως φυσικά συντηρητικά στα τρόφιμα (Silva et al., 2018).

### Γ) Οικολογικός ανταγωνισμός

Οι προστατευτικές καλλιέργειες των LAB ανταγωνίζονται τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς ως τους την απόκτηση θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου από το περιβάλλον του τροφίμου. Ο μηχανισμός των λακτοβακίλλων αποτελεί καθοριστικό παράδειγμα αποκλεισμού θρεπτικών συστατικών από αλλοιογόνους μύκητες στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, προάγοντας έτσι την συντήρησή τους (Siedler et al., 2020).



**Εικόνα.1.2:** Αντιμικροβιακοί μεταβολίτες των LAB παραγόμενοι κατά την ζύμωση των γαλακτοκομικών προϊόντων (Ahanzar et al., 2023).

Πολλές από τις βιοπροστατευτικές καλλιέργειες των LAB που προστίθενται στα τυριά, είναι γνωστές για την προβιοτική τους δράση επιδρώντας ευεργετικά στην υγεία του καταναλωτή (Gratterpanche et al., 2008). Σύμφωνα με τον FAO/WHO << προβιοτικοί αναφέρονται οι ζώντες μικροοργανισμοί, που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν όφελος στην υγεία του ξενιστή >>. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα στελέχη των εντερόκοκκων, των γαλακτοβάκιλων καθώς και των προπιονικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των τυριών και προσαρμόζονται εύκολα στο περιβάλλον αυτό (Foulquié Moreno et al., 2006). Σύμφωνα με έρευνες τα τυριά αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα ενσωμάτωση των προβιοτικών μικροοργανισμών

καθώς ο πληθυσμός τους παραμένει σχετικά σταθερός κατά την διάρκεια της αποθήκευσης τους (Gratteranche et al., 2008). Οι προβιοτικές καλλιέργειες αποδίδουν τις ιδιότητές τους στον ξενιστή τους εφόσον καταφέρουν να επιβιώσει κατά το πέρασμα από τον πεπτικό σωλήνα και ερευνητικά αποδίδεται στην αντοχή των μικροοργανισμών αυτών στο χαμηλό pH, στα πρωτεολυτικά ένζυμα και στα χολικά άλατα (Du Toit et al., 1998; Jacobsen et al., 1999). Οι θετικές επιπτώσεις των προβιοτικών βακτηρίων στην υγεία του ξενιστή, σχετίζονται με την παραγωγή βιταμινών (LeBlanc et al., 2011), την μείωση της χοληστερόλης (Choi and Chang, 2015), την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Shraf and Shah, 2014), την μείωση της δυσανεξίας στην λακτόζη (He et al., 2007) κ.α.

### **1.3.3 Χρήση του γένους *Lactobacillus* στα γαλακτοκομικά προϊόντα**

Το γένος *Lactobacillus* ή *Lactiplantibacillus*, χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην γαλακτοβιομηχανία για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων (γιαούρτι, τυρί κτλ.) (Maragoudakis et al., 2006). Τα βακτήρια του γένους αυτού συχνά απομονώνονται από διάφορα ζυμούμενα τρόφιμα και προστίθενται ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Burns et al., 2012; Zago et al., 2011). Τα γένη αυτά αφορούν κυρίως μη εκκινητήριες καλλιέργειες των LAB όπως τα στελέχη *Lb. casei*, *Lb. paracasei* και *Lb. plantarum* (NSLAB) και διακρίνονται για τις προβιοτικές τους ιδιότητες (Burns et al., 2012 ; Pavli et al., 2016).

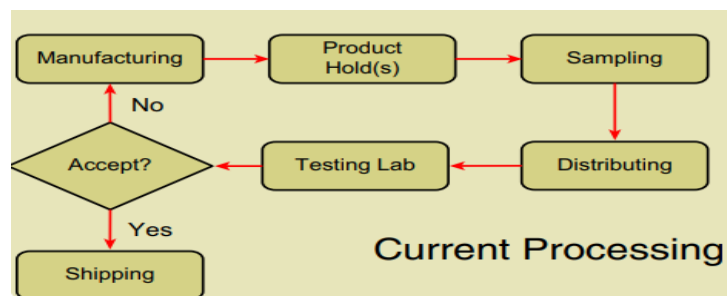
Από το γένος αυτό, ο *Lactobacillus plantarum* έχει μεγάλο γονιδίωμα, είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον αλλά και στα ζυμούμενα τρόφιμα είτε ως εκκινητήρια (SLAB) είτε ως μη εκκινητήρια καλλιέργεια (NSLAB). Διακρίνεται για την αντοχή του σε όξινα περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση σε αλάτι και χρησιμοποιείται συχνά ως συμπληρωματική καλλιέργεια στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Ciocia et al., 2023). Πολλά από τα στελέχη του έχουν διακριθεί για τις προβιοτικές τους ιδιότητες και έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων (Shah 2007). Επιπλέον ο *Lactobacillus plantarum* όπως και άλλα στελέχη του ίδιου είδους παράγουν μεταβολίτες όπως ακετοΐνη, διακετύλιο και 2,3-βουτανοδιόλη που συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη της γεύσης των γαλακτοκομικών προϊόντων (Corsetti and Valmorri, 2011). Ο *Lactobacillus pentosus* είναι φαινοτυπικά και γονιδιακά πανομοιότυπος με τον *Lactobacillus plantarum* καθώς έχουν 99% ταυτόσημη αλληλουχία γονιδίων στο rRNA τους (Bringel et al., 2005). Σύμφωνα με Papadopoulou

et al. (2018), η προσθήκη του στελέχους *Lactobacillus plantarum* T571 ως συμπληρωματική καλλιέργεια για την παρασκευή τυριού φέτας, βελτίωσε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, μείωσε τον πληθυσμό του παθογόνου *Listeria monocytogenes* στα επιμολυσμένα δείγματα και παρέμεινε πληθυσμιακά σταθερό κατά την συντήρηση, δίνοντας θετικά ερεθίσματα για εφαρμογή του συγκεκριμένου στελέχους στην παρασκευή προβιοτικής φέτας στο μέλλον. Ο *Lactobacillus plantarum* ανήκει στην κατηγορία των προαιρετικά ετεροζυμωτικών LAB. Πιο αναλυτικά όταν μεταβολίζει εξόξες όπως η γλυκόζη είτε ακολουθεί την οδό EMP κάνοντας ομοζυμωτική ζύμωση και παράγοντας κυρίως γαλακτικό οξύ, είτε ακολουθεί την οδό της φωσφοκεταλάσης, κάνοντας ετεροζυμωτική ζύμωση παράγοντας γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και CO<sub>2</sub>. Η επιλογή της μεταβολικής οδού που θα ακολουθήσει τελικά επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως το pH και τα επίπεδα του οξυγόνου, οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος και η γενετική προδιάθεση του στελέχους (Ahansaz et al., 2023). Αυτή η ευελιξία ως προς την επιλογή της μεταβολικής οδού, προσδίδει προσαρμοστικό πλεονέκτημα στο στέλεχος αυτό και επιδρά στην σημαντικά στην συντήρηση και την γεύση του τελικού προϊόντος (Castillo Martinez et al., 2013; Gänzle et al., 2015).

#### **1.4 Ταχείες μέθοδοι ανάλυσης στην βιομηχανία των τροφίμων**

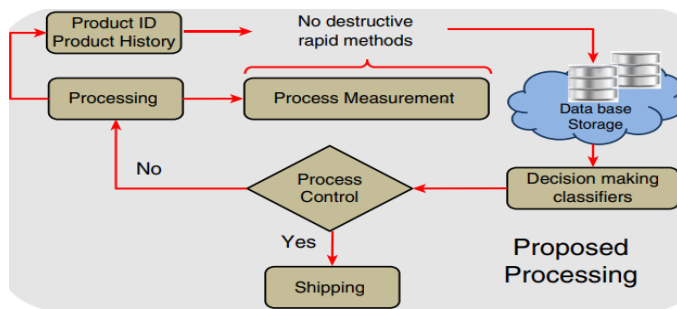
Για την διασφάλιση της ασφάλειας των παραγόμενων προϊόντων, οι βιομηχανίες των τροφίμων επικεντρώθηκαν στον σχεδιασμό ενός συστήματος διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων, βασισμένο στον καλό σχεδιασμό των διεργασιών, των προϊόντων και των διαδικασιών. Ωστόσο στο τρέχον σύστημα, μέτρο ελέγχου της παραγωγικής διαδικασίας είναι ο έλεγχος των τελικών προϊόντων (Nychas et al., 2016; Zwietering et al., 2016). Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται με επιθεωρήσεις και ελέγχους στο τελικό προϊόν, σύμφωνα με τις υποδείξεις της νομοθεσίας μέσω χημικών, μικροβιολογικών και μοριακών αναλύσεων στο εργαστήριο. Ο έλεγχος του τελικού προϊόντος καθώς και η εφαρμογή συμβατικών τεχνικών ανάλυσης παρουσιάζουν κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Αναφορικά με τις συμβατικές αναλύσεις, αποτελούν χρονοβόρες διαδικασίες, με υψηλό κόστος, ανάγκη εφαρμογής από άριστα εκπαιδευμένο προσωπικό, ενώ το προϊόν που εξετάζεται καταστρέφεται κατά την διαδικασία (Ellis et al., 2004; Nychas et al., 2008; Nychas et al., 2016). Από την άλλη, ο έλεγχος του τελικού προϊόντος δεν είναι επαρκής καθώς μια μικρή ποσότητα δείγματος ακόμα και αν βρεθεί απαλλαγμένη από επιβλαβείς μικροοργανισμούς δεν

μπορεί να εγγυηθεί την ασφάλεια όλης της παρτίδας. (Zwietering et al., 2016; Nychas et al., 2016).



**Εικόνα 1.3:** Τρέχουσες δοκιμές και έλεγχος της ασφάλειας των τροφίμων από την Βιομηχανία Τροφίμων (Nychas et al., 2016).

Λόγω των παραπάνω προβλημάτων γεννήθηκε η ανάγκη την εφαρμογή ενός νέου συστήματος διαχείρισης που να εστιάζει στον προληπτικό έλεγχο σε όλο τον κύκλο της ζωής του τροφίμου, μέσω της παρακολούθησης, της καταγραφής και του ελέγχου των κρίσιμων παραμέτρων (Nychas et al., 2016). Έτσι η προσοχή στράφηκε προς την προσέγγιση PAT (Process Analytical Technology), όπου σύμφωνα με τον FDA (2004), ορίζεται ως << Τα Συστήματα ανάλυσης και ελέγχου της παραγωγικής διαδικασίας βασισμένα σε παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο των κρίσιμων παραμέτρων ποιότητας και των χαρακτηριστικών της απόδοσης των πρώτων υλών και προϊόντων κατά την διεργασία, για την διασφάλιση αποδεκτής ποιότητας του τελικού προϊόντος κατά την ολοκλήρωση της διεργασίας >>. Η εφαρμογή της προσέγγισης αυτής στην βιομηχανία των τροφίμων έχει στόχο στην βελτιστοποίηση της ποιότητας, στη μείωση της σπατάλης (αποτελεσματικότερος έλεγχος των διεργασιών με εφαρμογή αισθητήρων στα κρίσιμα σημεία ελέγχου, κ.α.) και στην μείωση του κινδύνου των καταναλωτών (Nychas et al., 2016). Με βάση την προσέγγιση αυτή, οι παρασκευαστές τροφίμων θα μπορούν να παραδίδουν τρόφιμα με τις απαιτούμενες προδιαγραφές τα οποία δεν θα χρειάζονται έλεγχο με το τέλος της παραγωγικής διαδικασίας, αφού θα έχουν ελεγχθεί καθ' όλη την διάρκεια της παραγωγής τους (Van den Berg et al., 2013).



**Εικόνα 1.4:** Εφαρμογή ταχείων, μη επεμβατικών τεχνικών μέσω της προσέγγισης PAT στην παραγωγική διαδικασία (Nychas et al., 2016).

Μέχρι σήμερα η εφαρμογή της προσέγγισης PAT στη βιομηχανία τροφίμων περιορίζεται στην εφαρμογή μη επεμβατικών αναλυτικών και αυτοματοποιημένων τεχνικών που δεν καταστρέφουν το δείγμα και είναι πολλά υποσχόμενες ως προς την παρακολούθηση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων (Argyri et al., 2014; Ropodi et al., 2016). Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην φασματοσκοπία των δονήσεων όπως NIR (Near Infrared), φθορισμός (Front Face Fluorescent Spectroscopy, FFFS), Raman, FTIR (Fourier Transformation Infrared), μέσω φασματοσκοπικών αισθητήρων, στην υπερφασματική (Hyperspectral imaging) ή πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral imaging), μέσω συσκευών ανάλυσης της εικόνας, με προηγμένη δυνατότητα υπολογιστικής επεξεργασίας, καθώς και στην εφαρμογή βιοαισθητήρων και της ηλεκτρονικής μύτης (Electric Nose, EN) (Nychas et al., 2016). Η εφαρμογή των αισθητήρων βασίζεται στην αρχή ότι τα παραπροϊόντα είτε της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών είτε/και του ίδιου του ιστορικού του προϊόντος και της προέλευσής του, εμφανίζουν διαφορετικά βιοχημικά προφίλ αποδίδοντας ένα διαφορετικό φασματικό αποτύπωμα, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της ποιότητας (Ellis and Goodacre, 2001; Nychas et al., 2008; Ropodi et al., 2016).

Τα βασικά πλεονεκτήματα των τεχνικών αυτών και κυρίως αυτών που βασίζονται στην φασματοσκοπία των δονήσεων, είναι η ταχύτητά τους, η μη επεμβατική τους δράση στο δείγμα, η ελάχιστη ή καθόλου ανάγκη για προ-επεξεργασία του δείγματος, το χαμηλό κόστος εφαρμογής τους καθώς και η εφαρμογή τους στα κρίσιμα σημεία ελέγχου κατά την παραγωγική διαδικασία. Έτσι τα όργανα που εφαρμόζουν τις τεχνικές αυτές μπορούν να προσαρμοστούν στις δομές οποιασδήποτε βιομηχανίας τροφίμων ενισχύοντας έτσι την ασφάλεια αλλά και ποιότητα του προϊόντος, σε ελάχιστο χρόνο και μειώνοντας τις απώλειες (Argyri et al., 2014). Επειδή ο αριθμός δεδομένων που



συλλέγεται από τα όργανα αυτά είναι πολύ μεγάλος (πολυμεταβλητά δεδομένα) και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων δεν είναι δυνατή με απλές συμβατικές μεθόδους, τα όργανα αυτά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με προηγμένες στατιστικές μεθόδους (πολυμεταβλητή ανάλυση) για την μείωση της διάστασης των αρχικών μεταβλητών και σε μικρότερο αριθμό παραγόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες της ποιότητας και ασφάλειας (Ellis et al., 2012; Rorodi et al., 2015).

#### **1.4.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis- MSI)**

Η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης αποτελεί συνδυασμό της φασματοσκοπίας των δονήσεων (Vibrational Spectroscopy, VS) και της υπολογιστικής όρασης (Computer Vision) (Rorodi et al., 2016). Η φασματοσκοπία των δονήσεων βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του μορίου και της προσπίπτουσας σε αυτό ακτινοβολίας, προσδιορίζοντας την ενέργεια που απορροφάται από τα δονούμενα μόρια του προς εξέταση δείγματος (Dufour 2009). Από την άλλη η υπολογιστική όραση βασίζεται στο φάσμα του ορατού φωτός (350-800 nm) για την απόδοση των χαρακτηριστικών του δείγματος, όπως το σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος και η υφή. Τα φασματοφωτόμετρα που εφαρμόζουν την VS δεν δίνουν επαρκείς πληροφορίες για ολόκληρο το δείγμα καθώς δίνουν το φάσμα ενός μέρους του δείγματος, ενώ η υπολογιστική όραση δεν είναι αποτελεσματική για την μέτρηση χημικών και βιολογικών παραμέτρων. Ο συνδυασμός αυτών των δύο μεθόδων έχει σαν αποτέλεσμα την παροχή χωρικών και φασματικών πληροφοριών σχετικά με τα χημικά μόρια στόχους του δείγματος (Rorodi et al., 2016). Δεδομένου ότι τα κυριότερα συστατικά των τροφίμων αποτελούνται από δεσμούς C-H (οργανικές ενώσεις), N-H (πρωτεΐνες, αμινοξέα) και O-H (νερό, λίπος, υδατάνθρακες), η φασματοσκοπία στο εγγύς υπέρυθρο (NIR) και ορατό φάσμα (Vis) χρησιμοποιείται κατά κόρων στην ανάλυση των αγρό-διατροφικών προϊόντων, καθώς έχει παρατηρηθεί δονήσεις των μορίων αυτών σε αυτές τις περιοχές του φάσματος (Magwaza et al., 2011, Pu et al., 2015; Feng et al., 2017). Συγκεκριμένα τα εύρη του φάσματος από 380 έως 800 nm ή 400 έως 1000nm ,είναι αυτά που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε εφαρμογές ανάλυσης των τροφίμων (Elmasry et al., 2012).

Η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης είναι πολύ αποτελεσματική και ταχεία μέθοδος για την παρακολούθηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων (Wu and Sun, 2013),έχει προοπτικές για την αξιολόγηση του συστήματος διαχείρισης της

ποιότητας των τροφίμων κατά την μεταχείριση, την επεξεργασία και την αποθήκευση (Løkke et al., 2013) και αποτελεί αποτελεσματική τεχνική για την ανίχνευση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Rahi et al., 2018) και γενικότερα για την ασφάλεια των τροφίμων (Gowen et al., 2015; Daugaard et al., 2010).

Κάθε όργανο πολυφασματικής απεικόνισης αποτελείται από (Feng et al., 2018):

- **Φωτεινή πηγή**
- **Αισθητήρα φωτός**
- **Φασματογράφο**
- **Φωτογραφική μηχανή**
- **Μετατροπέα σήματος**
- **Ηλεκτρονικό υπολογιστή με εγκατεστημένο λογισμικό επεξεργασίας της εικόνας**

Μετά την λήψη των εικόνων γίνεται απομάκρυνση των περιοχών που δεν αφορούν το δείγμα έτσι ώστε να μείνει μόνο η περιοχή ενδιαφέροντος (Region Of Interest, ROI) για την διεξαγωγή των φασματικών δεδομένων (Daugaard et al., 2010). Οι πολυφασματικές εικόνες που προκύπτουν, παρέχουν πολυδιάστατα και μαζικά δεδομένα, τα οποία απαιτούν περαιτέρω ανάλυση για να ερμηνευτούν μέσω διαφόρων στατιστικών και αριθμητικών μεθόδων (PLS-R κ.α.). Οι στατιστικές αυτές μέθοδοι μπορούν να συνδυαστούν με την ανάλυση των πολυφασματικών εικόνων, συσχετίζοντας έτσι τις πολυφασματικές εικόνες με τα χημικά αποτελέσματα ή τις οργανοληπτικές ετικέτες (Dissing et al., 2013).

#### **1.4.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)**

Σύμφωνα με τους Davis και Mauer (2010), η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), στηρίζεται στις μετρήσεις των δονήσεων των μορίων, ως αποτέλεσμα της διέγερσης τους από την υπέρυθρη ακτινοβολία (IR) σε συγκεκριμένο εύρος μήκους κύματος. Η ακτινοβολία είναι συνήθως στο εύρος του MIR (Mid Infrared) που κυμαίνεται μεταξύ  $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$  και τα μόρια που την απορροφούν μεταπίπτουν σε υψηλότερα επίπεδα ενέργειας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η απορρόφηση αυτή να δημιουργεί ένα συγκεκριμένο υπέρυθρο φάσμα (Ellis and Goodacre, 2001; Nikolaou and Goodacre, 2008). Το φάσμα αυτό αποτελεί αποτύπωμα οποιασδήποτε βιοχημικής και χημικής ουσίας που συσσωρεύεται στο προϊόν ως

αποτέλεσμα της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών, δίνοντας έτσι πληροφορίες για τον τύπο και τον βαθμό της αλλοίωσης στο τρόφιμο.(Ellis and Goodacre, 2001; Papadopoulou et al., 2011).

Πιο αναλυτικά, αυτή η μέθοδος φασματοσκοπίας, έχει πολλές προοπτικές εφαρμογής στην μικροβιολογία και τεχνολογία των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των τροφίμων (πχ. ανίχνευση επιβλαβών ουσιών, αναγνώριση της αυθεντικότητάς, αναγνώριση μεταχειρίσεων όσον αφορά την ασφάλεια και παραβιάσεις της σχετικής νομοθεσίας) (Esslinger et al., 2014), για την αξιολόγηση των βιολογικών επιδράσεων και βελτιστοποίηση των εφαρμοσμένων τεχνολογιών επεξεργασίας (Prieto-Calvo et al., 2014), καθώς και για την ανίχνευση , ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση της αλλοίωσης ή/και των παθογόνων βακτηρίων (Nikolaou et al., 2011). Σύμφωνα με Maraey et al. (2001) η φασματοσκοπία του FTIR έχει χρησιμοποιηθεί σε τουλάχιστον 50 έρευνες για την διάκριση, ταξινόμηση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών που σχετίζονται ή όχι με τα τρόφιμα, όπως του *Baccillus*, της Ψευδομονάδας, των γαλακτικών βακτηρίων, των ζυμών καθώς και παθογόνων όπως *Listeria*, *Salmonella* και *E. coli*. Αν και δεν υπάρχουν πολλές έρευνες που να αναφέρονται στην χρήση της φασματοσκοπίας FTIR για τον προσδιορισμό του μικροβιακού καθεστώτος των γαλακτοκομικών προϊόντων. Αποτελέσματα από τις έρευνες των Lianou et al. (2017) και Nikolaou and Goodacre (2008) έδειξαν ότι είναι πολλά υποσχόμενη για την ανίχνευση και καταμέτρηση των βακτηρίων στα προϊόντα αυτά. Βασικά πλεονεκτήματά της αποτελούν η ταχύτητα της διεξαγωγής του φάσματος, η ευκολία στην χρήση, η υψηλή ευαισθησία και το χαμηλό κόστος για την εφαρμογή της (Nikolaou and Goodacre, 2008).

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προκύπτουν, υφίστανται περαιτέρω ανάλυση με την χρήση χημειομετρικών τεχνικών ή άλλων υπολογιστικών μοντέλων έτσι ώστε να παρέχουν ουσιαστικές πληροφορίες σχετικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται κατά κόρων σήμερα περιλαμβάνουν γραμμικές (partial least square, discriminant analysis) και μη γραμμικές (artificial neural networks, kernel discriminant analysis, kernel partial least squares) τεχνικές παλινδρόμησης (Berrueta et al., 2007).

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού κατά Fourier (FTIR) αποτελείται κυρίως από τα εξής τμήματα (Ταραντίλης & Παππάς Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2005):

- **Πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας:** η λυχνία νικελίου-χρωμίου (Nicrome) είναι η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους. Είναι μικρής ισχύος και αερόψυκτη. Η θερμοκρασία που αναπτύσσει είναι 1200-1250 °C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή μέσο-υπέρυθρου.
- **Πηγή λέιζερ:** η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ γίνεται με τη διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (HeNe).
- **Συμβολόμετρο Michelson:** τα φασματοφωτόμετρα FTIR είναι χωρίς επιλογή μήκους κύματος αλλά λειτουργούν με το φαινόμενο της συμβολής. Το συμβολόμετρο αποτελείται από μία ημιδιαφανή πλάκα-διαχωριστή κατασκευασμένη από βρωμιούχο κάλιο (KBr) που δεν απορροφά στο υπέρυθρο, και δύο κάτοπτρα. Το ένα είναι σταθερό και το άλλο κινείται με σταθερή ταχύτητα.
- **Δείγμα:** η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας μέσω κατόπτρου εισέρχεται στο χώρο του υπό εξέταση δείγματος. Ένα μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται, ενώ το υπόλοιπο εξέρχεται, εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο και κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή. Δημιουργούνται λοιπόν έτσι μοριακά αποτυπώματα στα δείγματα όπου είναι μοναδικό για κάθε μοριακή δομή.
- **Ανιχνευτής:** ο σκοπός του ανιχνευτή είναι να « αισθανθεί» την υπέρυθρη ακτινοβολία, που έχει διέλθει μέσα από το δείγμα
- **Υπολογιστής:** το σήμα της μέτρησης μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό και στέλνεται στον υπολογιστή για να λάβει χώρα ο μετασχηματισμός Fourier.

#### 1.4.3 Ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων στην βιομηχανία των τροφίμων

Η συχνή εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών ως αποτέλεσμα της δράσης παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Shigella* κ.α., αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για την δημόσια υγεία παγκοσμίως καθώς μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στον θάνατο των καταναλωτών (Havelaar et al., 2015). Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων στα

τρόφιμα βασίζονται σε τεχνικές όπως η ανάπτυξη μικροβιακών καλλιιεργειών, η χρώση Gram και βιοχημικές τεχνικές, οι οποίες αν και αποτελεσματικές είναι εξαιρετικά χρονοβόρες (Hussain et al., 2022). Άλλες πιο σύγχρονες μέθοδοι που εφαρμόζονται στην βιομηχανία των τροφίμων αφορούν μοριακές τεχνικές όπως η PCR (Polymerase Chain Reaction), ανοσολογικές μεθόδους όπως η ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) καθώς και τεχνικές φασματομετρία όπως η μέθοδος MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight) (Hameed et al., 2018; Li et al., 2018; Xiong et al., 2020; Chen et al., 2021). Ωστόσο και οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω του υψηλού κόστους τους, της ανάγκης εφαρμογής τους από εξειδικευμένο προσωπικό, καθώς και του χρόνου που απαιτείτε για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων. Η ανάγκη για ταχύτερη ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών, με όσο το δυνατόν μικρότερο κόστος και ευκολία στην χρήση οδήγησε στην εφαρμογή των μεθόδων της φασματοσκοπίας (Hussain et al., 2022). Οι μέθοδοι αυτοί είναι αποτελεσματικοί για την ταχεία ανίχνευση των παθογόνων στα τρόφιμα, με κάποιες από αυτές έχουν εκτεταμένη χρήση στην ανίχνευση της μικροβιακής επιμόλυνσης στα τρόφιμα όπως η φασματοσκοπία του FTIR, η φασματοσκοπία Raman και η υπερφασματική απεικόνιση (HIS) (Rahman et al., 2016). Όσον αφορά την φασματοσκοπία του FTIR, το φάσμα απορρόφησης που προκύπτει από τις δονήσεις των μορίων του τροφίμου στα οποία προσπίπτει υπέρυθρη ακτινοβολία, αντιπροσωπεύει μια βιοχημική ή χημική ουσία. Το φάσμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση των βιοχημικών μεταβολών και κατ' επέκταση τον έλεγχο της παρουσία μικροβιακών μεταβολιτών στα τρόφιμα (Argyri et al., 2013). Η ικανότητα του FTIR να διαχωρίζει, να κατηγοριοποιεί και να ανιχνεύει μικροοργανισμούς στα τρόφιμα συμπεριλαμβανομένων διαφόρων στελεχών Gram+ και Gram- βακτηρίων, έχει αποδειχθεί επανειλημμένα σε πολλές έρευνες σε συνδυασμό πάντα με την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση (Mariey et al., 2001; Beutin et al., 2007; Colabella et al., 2017; Potocki et al., 2019; Rustam et al., 2020; Cordovana et al., 2021). Η φασματοσκοπία την πολυφασματικής απεικόνισης (MSI), αποτελεί επίσης αποτελεσματική μέθοδο για την ανίχνευση των παθογόνων στα τρόφιμα καθώς συνδυάζοντας τις αρχές της όρασης με την τεχνολογία της επεξεργασία των εικόνων, μπορεί να ανιχνεύει τα φασματικά χαρακτηριστικά τους στην επιφάνεια των τροφίμων (Liu and Huang, 2023). Ωστόσο δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αναφορές σχετικά με την εφαρμογή τους στα τρόφιμα ως προς αυτήν την ιδιότητα.

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της επίδρασης του υπερκείμενου διαλύματος δύο στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactiplantibacillus plantarum* L125 και *Lactiplantibacillus pentosus* L33) στα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας, προσδοκώντας την μελλοντική χρήση του για την αύξηση της ασφάλειας και συντήρησής της, καθώς και την βελτίωση της ποιότητάς της. Επιπλέον, σκοπό αποτελεί η εκτίμηση της δυνατότητας των μεθόδων της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) να προβλέπουν την μικροβιακή αλλοίωση της φέτας καθώς και να ανιχνεύουν την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Listeria monocytogenes* σε αυτήν, δίνοντας έτσι το έναυσμα για μελλοντική χρήση των μεθόδων αυτών για ταχύτερη και εγκυρότερη εκτίμηση της ασφάλειάς τους.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Προετοιμασία πειράματος

Για την επιλογή των καταλληλότερων στελεχών τεχνολογικών βακτηρίων με την καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι επιλεγμένων ζυμών και παθογόνων βακτηρίων ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία.

Αρχικά, επιλέχθηκαν 9 τεχνολογικά βακτήρια με πιθανή βιοπροστατευτική δράση, για να ελεγχθεί η επίδρασή τους έναντι της ζύμης *Candida zeylanoides* απομονωμένη από τυρί φέτα, με κωδικό όνομα KZ4, του παθογόνου στελέχους της *Listeria monocytogenes* με κωδικό όνομα FMCC B133 απομονωμένο από μαλακό τυρί, καθώς και του παθογόνου στελέχους του *Staphylococcus aureus* με κωδικό όνομα FMCC B134. Η ζύμη και τα τεχνολογικά βακτήρια προήλθαν από τον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό ΔΗΜΗΤΡΑ (Λυκόβρυση, Αττική, Ελλάδα), ενώ οι παθογόνοι από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Food Microbiology Culture Collection - FMCC). Τα τεχνολογικά βακτήρια ήταν τα εξής:

1. B-281 (*Lactiplantibacillus plantarum*, Πηγή απομόνωσης: Ελιές μετά από ζύμωση) (Doulgeraki et al., 2013).
2. B-282 (*Lactiplanibacillus pentosus*, Πηγή απομόνωσης: Ελιές μετά από ζύμωση) (Doulgeraki et al., 2013).
3. T571 (1) (*Lactiplanibacillus plantarum*, Πηγή απομόνωσης: Άλμη φέτας) (Pavli et al., 2016).
4. T571 (2) (*Lactiplanibacillus plantarum*, Πηγή απομόνωσης: Άλμη φέτας) (Pavli et al., 2016).
5. FMX3 (*Leuconostoc mesenteroides*, Πηγή απομόνωσης: Λευκό τυρί άλμης) (Kamarinou et al., 2022).
6. SMX2 (*Lactococcus lactis*, Πηγή απομόνωσης: Ημίσκληρο τυρί) (Kamarinou et al., 2022).
7. L125 (*Lactiplantibacillus plantarum*, Πηγή απομόνωσης: Κρέας που υπέστη ζύμωση) (Pavli et al., 2016).
8. L33 (*Lactiplantibacillus pentosus*, Πηγή απομόνωσης: Κρέας που υπέστη ζύμωση) (Pavli et al., 2016).
9. *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis*, Πηγή απομόνωσης: Προβιοτικός).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη των παραπάνω μικροοργανισμών σε UHT (Ultra High Temperature) γάλα και με την βοήθεια της φυγοκεντρικής έγινε διαχωρισμός μεταξύ της μάζας των μικροοργανισμών και του υπερκείμενου διαλύματος που έφερε τις αντιμικροβιακές ουσίες. Πιο αναλυτικά, κατόπιν ανάπτυξης του εκάστοτε μικροοργανισμού σε 10 ml θρεπτικού διαλύματος MRS broth (de Man, Rogosa and Sharpe, 4017292, Biolife, Milano, Italy) πραγματοποιήθηκε μεταφορά 20 μl από το διάλυμα αυτό σε σωληνάκια φυγοκέντρου των 14 ml στα οποία είχαν προστεθεί 5 ml UHT γάλακτος. Μετά από 24 ώρες επώασης στους 30 °C τα σωληνάκια φυγοκεντρήθηκαν δύο φορές με βοήθεια φυγοκέντρου (Heraeus Multifuge 1S-R, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) (Πρόγραμμα 2: 6000 rpm, 10 min, 4 °C), όπου κάθε φορά το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο σωληνάκι, ενώ το ίζημα (βιομάζα μικροοργανισμού) απορριπτόταν. Το τελικό υπερκείμενο διάλυμα φιλτραρίστηκε για περαιτέρω απομάκρυνση υπολειμμάτων του μικροοργανισμού με την βοήθεια αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 0,2 mm και γυάλινου χωνιού. Έτσι, προέκυψαν τελικά 9 σωληνάκια υπερκείμενου διαλύματος γάλακτος, καθένα από τα οποία έφερε όλες τις αντιμικροβιακές ουσίες του εκάστοτε μικροοργανισμού. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και η ανάπτυξη της ζύμης KZ4 σε 10 ml θρεπτικού διαλύματος YPD broth (Yeast Peptone Dextrose Broth, Neogen, Michigan, U.S) μετά από επώασης για 24 ώρες στους 25 °C και κατόπιν ακολούθησε η επίστρωσή της με την μεταφορά 100 μl από το θρεπτικό διάλυμα σε τρυβλία με YPD agar (Yeast Peptone Dextrose Broth, Neogen, Michigan, U.S). Όσον αφορά τα παθογόνα στελέχη B133 και B134 μετά από ανάπτυξή τους σε 10 ml θρεπτικού υποστρώματος TSB (Tryptone Soy Broth, 145 NCM0019A, Neogen, Missouri, USA) για 24 ώρες στους 37 °C, ακολούθησε η επίστρωση τους με την μεταφορά 100 μl σε τρυβλία TSA (Tryptone Soy Agar, 145 NCM0019A, Neogen, Missouri, USA). Όλοι οι μικροοργανισμοί (τεχνολογικά βακτήρια, ζύμη KZ4, παθογόνοι FMCC B133 και FMCC B134) προήλθαν από καθαρές καλλιέργειες αποθηκευμένες στους -80 °C με 20 % γλυκερόλη, ενώ η αναγέννηση τους πραγματοποιούνταν κάθε φορά μετά από επώασή τους σε 10 ml θρεπτικού διαλύματος κατάλληλου για την ανάπτυξη τους και στην ιδανικότερη θερμοκρασία, για περίπου 24 ώρες.

Για να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της επίδρασης του υπερκείμενου διαλύματος των 9 τεχνολογικών βακτηρίων έναντι της ζύμης και του παθογόνου που επιλέχθηκαν έγινε η εξής διαδικασία:



Αρχικά, έλαβε χώρα η επίστρωση της ζύμης σε 9 τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα YPD agar καθώς και των παθογόνων στελεχών σε 9 τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSA για τον καθένα, υπό ασηπτικές πάντοτε συνθήκες. Στην συνέχεια σε κάθε ένα από τα παραπάνω τρυβλία έγινε εμβολιασμός δύο spot των 5 μl / spot με το υπερκείμενο διάλυμα του εκάστοτε τεχνολογικού βακτηρίου σε δύο αντιδιαμετρικές θέσεις και υπό ασηπτικές συνθήκες. Συγκεκριμένα κάθε τρυβλίο όπου είχε επιστρωθεί η ζύμη ή ο εκάστοτε παθογόνος δέχτηκε δύο spot από το υπερκείμενο του εκάστοτε τεχνολογικού μικροοργανισμού και επώαστηκε για 48 ώρες στους 25 °C ή για 24 ώρες 37 °C αντίστοιχα. Μετά το πέρας της επώασης παρατηρήθηκε ότι το υπερκείμενο διάλυμα γάλακτος των τεχνολογικών βακτηρίων L33 (*Lactiplantibacillus pentosus*) και L125 (*Lactiplanibacillus plantarum*) είχε καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης της ζύμης KZ4 και των παθογόνων στελεχών FMCC B133 και FMCC B134, σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια. Αυτό διαπιστώθηκε καθώς γύρω από την περιοχή που έγιναν τα δύο spot τόσο η ανάπτυξη της ζύμης όσο και του παθογόνου είχε περιοριστεί. Αυτό αποτέλεσε και καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή ενσωμάτωσης του συγκεκριμένου ζεύγους βακτηρίων στο περιβάλλον της φέτας αλλά και στον εμβολιασμό της με το στέλεχος της B133 της *Listeria monocytogenes*.

## 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Φέτα χαμηλής αλατότητας (4%) υποβλήθηκε σε 4 διακριτές μεταχειρίσεις οι οποίες αφορούσαν την θερμοκρασία συντήρησης στους 4 °C ή 10 °C, καθώς και το περιβάλλον της συσκευασίας σε άλμη ή κενό. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 29 δειγματοληψίες σε διάστημα ~ 80 ημερών και χρησιμοποιήθηκαν 256 δείγματα. Από τις 29 δειγματοληψίες, η πρώτη αποτέλεσε την δειγματοληψία αναφοράς (day 0) και έλαβε χώρα την ημέρα παραλαβής της φέτας. Σε κάθε δειγματοληψία για κάθε μία από τις 4 μεταχειρίσεις, λαμβάνονταν 4 δείγματα καθώς και οι επαναλήψεις τους, δηλαδή συνολικά 8 δείγματα, από τα οποία τα μισά είχαν εμβολιαστεί με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, ή/και ψεκάστη με υπερκείμενο διάλυμα από τα επιλεγμένα τεχνολογικά βακτήρια. Παράλληλα με τις μικροβιακές αναλύσεις, πραγματοποιούνταν μετρήσεις των δειγμάτων με την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισής (MSI), με την μέθοδο φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) καθώς και μετρήσεις pH (από την 1<sup>η</sup> δεκαδική αραιώση) και ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ). Επιπλέον πραγματοποιούνταν οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων

ως προς την εμφάνιση, οσμή, υφή και τέλος γεύση, μόνο σε αυτά όπου απουσίαζε η *Listeria monocytogenes*.

### 2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Ωριμασμένη φέτα από την Ελληνική Γαλακτοβιομηχανία FAMILY FARM, μεταφέρθηκε σε μεταλλικούς περιέκτες των 20 kg (14 kg καθαρό προϊόν) με άλμη χαμηλής αλατότητας (4% w/v), στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η φέτα αφαιρέθηκε από το δοχείο με ασηπτικές διαδικασίες και κόπηκε αρχικά σε κομμάτια των 150g, τα οποία διακρίθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας και εμβολιασμού. Αρχικά, κάποια από τα κομμάτια αυτά εμβολιάστηκαν με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* μετά από ανάμειξη των δύο στελεχών της (FMCC B127 και FMCC B133) με τελικό φορτίο  $10^3$  κύτταρα (150 ml από αραιώση  $10^6$  log CFU/ml) ή 3 log CFU/g προϊόντος. Στην συνέχεια όλα τα δείγματα ψεκάστηκαν είτε με σκέτο γάλα UHT, είτε με υπερκείμενο διάλυμα UHT γάλακτος στο οποίο είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί τα τεχνολογικά βακτήρια *Lactiplantibacillus plantarum* L125 και *Lactiplantibacillus pentosus* L33, με τελικό φορτίο  $10^5$  κύτταρα (150 ml από αραιώση  $10^8$  log CFU/ml) ή 5 log CFU/g προϊόντος. Κατόπιν, διαχωρίστηκαν σε μικρότερα κομμάτια των 30g (σύνολο 256 δείγματα) και συσκευάστηκαν τα μισά σε περιβάλλον κενού και τα άλλα μισά σε άλμη αλατότητας 4%. Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση της συσκευασίας κενού χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες πλαστικές σακούλες τροφίμων (Flexorack S.A., Athens), ενώ ακολουθούσε ερμητικό κλείσιμο της συσκευασίας με την βοήθεια του μηχανήματος συσκευασίας κενού Henkonac 1900 (Howden Food 50 Equipment B.V., The Netherlands). Στην περίπτωση της συσκευασίας της άλμης τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά Falcon των 50ml και πληρώθηκαν με άλμη 4 % υπό ασηπτικές συνθήκες, έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η φέτα. Η άλμη παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με προσθήκη 40 g αλάτι σε 1L αποστειρωμένο νερό κατόπιν ανάδευσης με μεταλλικό μαγνήτη, με την χρήση θερμαινόμενου τροχιακού αναδευτήρα (Stuart CB162 Magnetic Stirring Hotplate, England). Τέλος, μετά την συσκευασία τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θαλάμους συντήρησης των 4 °C ή 10 °C (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan).



**Εικόνα 2.1:** Κοπή της φέτας σε κομμάτια των 150g.

Με βάση τα παραπάνω, προέκυψαν 4 διακριτές μεταχειρίσεις στα δείγματα της φέτας, για κάθε μία από τις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό) οι οποίες ήταν οι εξής :

- Δείγματα ψεκασμένα με σκέτο UHT γάλα (Control, C)
- Δείγματα ψεκασμένα με υπερκείμενο διάλυμα UHT γάλακτος των *Lactiplantibacillus plantarum* και *Lactiplantibacillus pentosus*, απαλλαγμένο από κύτταρα (Supernatant, S ή Cell Free Supernatant, CFS)
- Δείγματα ψεκασμένα με σκέτο UHT γάλα και εμβολιασμένα με στελέχη του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* (Control και *Listeria* , CL)
- Δείγματα ψεκασμένα με υπερκείμενο διάλυμα UHT γάλακτος των *Lactiplantibacillus plantarum* και *Lactiplantibacillus pentosus*, απαλλαγμένο από κύτταρα και εμβολιασμένα με στελέχη του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* (Supernatant ή Cell Free Supernatant και *Listeria*, SL)

### **2.3.1 Παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος και ψεκασμός δειγμάτων**

Δύο μέρες πριν την έναρξη του πειράματος, 50 ml από το εκάστοτε τεχνολογικό βακτήριο (*Lactiplantibacillus plantarum* L125 και *Lactiplantibacillus pentosus* L33) τοποθετήθηκε ασηπτικά σε Falcon των 50 ml που περιείχε 50 ml θρεπτικού διαλύματος MRS broth και επώαστηκε στους 30 °C για 24 ώρες. Τα 50 ml λήφθηκαν από προηγούμενη ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας του κάθε μικροοργανισμού σε 10 ml MRS Broth όπως έχει αναφερθεί στην **Παράγραφο 2.1**. Κατόπιν, λήφθηκε 1ml από τον εκάστοτε μικροοργανισμό και μεταφέρθηκε σε 3 Falcon των 50 ml (σύνολο 6) που περιείχαν 50 ml UHT γάλα και αφέθηκε πάλι στους 30 °C για επώαση 24 ώρες. Μετά

το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, όπου κάθε φορά παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο διάλυμα γάλακτος και απορριπτόταν το ίζημα, το οποίο αποτελούσε την βιομάζα του μικροοργανισμού. Τέλος, τα υπερκείμενα διαλύματα από όλα τα Falcon μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο ψεκαστικό δοχείο κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Παράλληλα με την μεταφορά του υπερκείμενου γάλακτος στο ψεκαστικό δοχείο, μεταφέρθηκε ασηπτικά σε ένα άλλο ψεκαστικό δοχείο σκέτο UHT γάλα. Με τα δοχεία αυτά πραγματοποιούνταν ψεκασμοί, είτε με το υπερκείμενο διάλυμα των τεχνολογικών βακτηρίων, είτε με το σκέτο γάλα σε κάθε κομμάτι φέτας των 150g. Σε κάθε κομμάτι πραγματοποιούνταν 4 ψεκασμοί με 0.8 ml/ψεκασμό, δηλαδή συνολικά προστίθονταν στο κάθε κομμάτι 3.13 ml ψεκαστικού διαλύματος. Το τελικό φορτίο των τεχνολογικών βακτηρίων για κάθε κομμάτι φέτας 150 g ήταν  $10^5$  κύτταρα ή 5 log CFU/g.

### **2.3.2 Απομόνωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και εμβολιασμός των δειγμάτων**

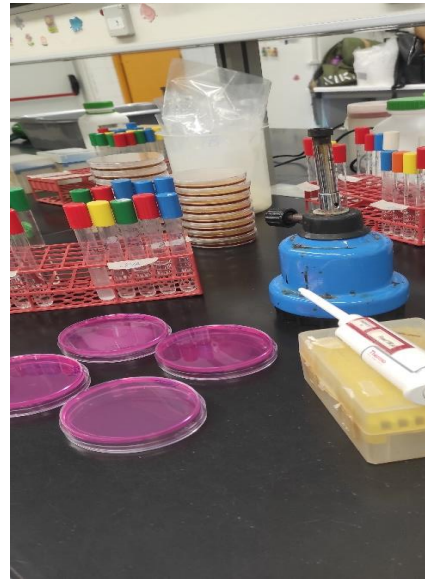
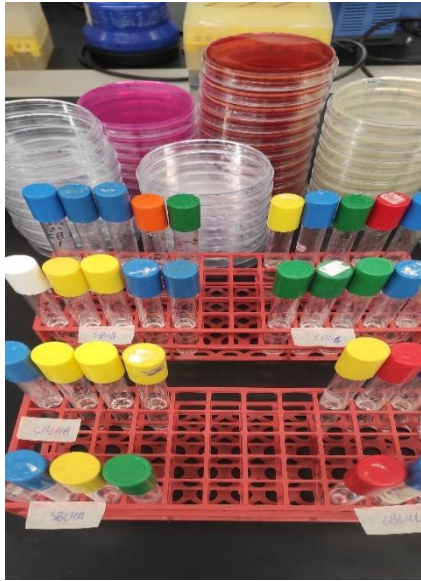
Μία μέρα πριν την έναρξη του πειράματος 20 ml από το εκάστοτε στέλεχος της *L. monocytogenes* (FMCC B127 και FMCC B133) τοποθετήθηκε ασηπτικά σε Falcon των 15 ml με 10 ml θρεπτικό διάλυμα TSB και επώαστηκε στους 37 °C για 24 ώρες. Τα 20 ml λήφθηκαν από προηγούμενη ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας του κάθε στελέχους σε 10 ml TSB όπως έχει αναφερθεί στην **Παράγραφο 2.1**. Στην συνέχεια ακολούθησαν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις για την απομάκρυνση του TSB. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση ακολουθούσε απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, προσθήκη 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (Neogen, Lansing, Michigan, U.S.) και τέλος ανάδευση με την βοήθεια τροχιακού αναδευτήρα (Vortex Genius 3, IKA-Werke GmbH & amp; Co., Staufen, Germany). Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάμειξη των διαλυμάτων των δύο στελεχών, ενώ ακολούθησαν δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με μεταφορά 1 ml δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Από την τελική αραιώση με  $10^6$  κύτταρα μικροβιακό φορτίο, μεταφέρθηκαν 150 ml σε 150 g φέτα και έτσι το τελικό μικροβιολογικό φορτίο με το οποίο εμβολιάστηκε η φέτα ήταν  $10^3$  κύτταρα ή 3 log CFU/g προϊόντος.

## 2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις



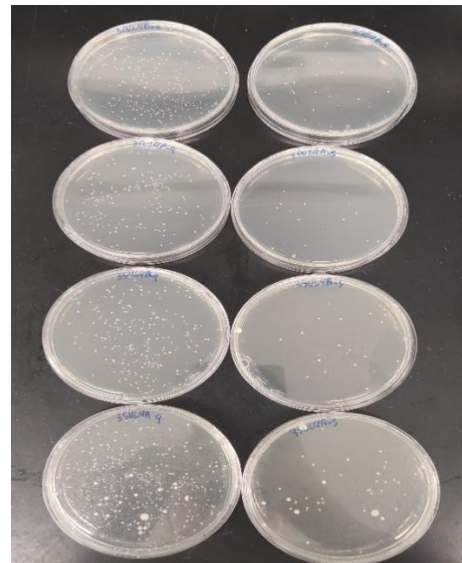
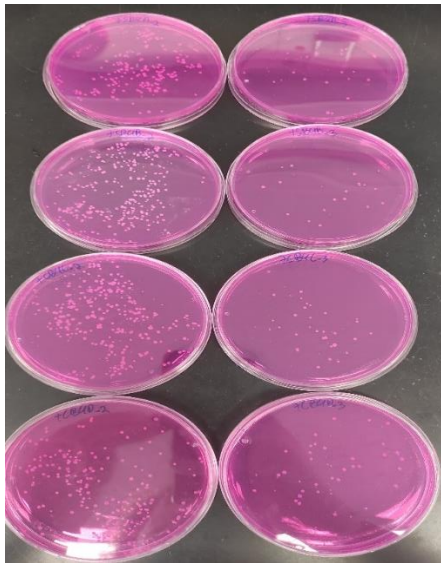
**Εικόνα 2.2:** Έναρξη δειγματοληψίας στα δείγματα της φέτας, συσκευασίας κενού(αριστερά), συσκευασίας άλμης(δεξιά).

Κατά την δειγματοληψία, ζυγίζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες 30 g φέτας σε αποστειρωμένη πλαστική σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, France) των 400 ml, με την χρήση νυστεριού και λαβίδας. Κατόπιν προστίθονταν 90 ml αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος Ringer και ακολουθούσε ομογενοποίηση με την χρήση της συσκευής Stomacher (StomacherLab Blender 400, Seward Medical, London) για 1 min. Στην συνέχεια πραγματοποιούνταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer.



**Εικόνα 2.3:** Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και προετοιμασία τρυβλίων (αριστερά). Εμβολιασμός τρυβλίων με αντίστοιχες δεκαδικές αραιώσεις (δεξιά).

Ο εμβολιασμός των τρυβλίων πραγματοποιούνταν υπό ασηπτικές συνθήκες στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα. Τα υποστρώματα επιφανειακής επίστρωσης εμβολιάζονταν με 0,1 ml δείγματος από την επιλεγμένη αραιώση και ύστερα πραγματοποιούνταν διασπορά στην επιφάνεια του υποστρώματος με χρήση αποστειρωμένου τριγώνου. Όσον αφορά την τεχνική της ενσωμάτωσης, πραγματοποιούνταν με την μεταφορά 1 ml εμβολίου σε ένα κενό τρυβλίο, ενώ ακολουθούσε προσθήκη του υποστρώματος σε υγρή μορφή και τέλος ανάδευση. Εφόσον στερεοποιούνταν το υλικό, προστίθονταν και δεύτερη στρώση του υγρού υποστρώματος για την μεγιστοποίηση της επίτευξης αναερόβιων συνθηκών στο περιβάλλον ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Μετά την ολοκλήρωση του εμβολιασμού, τα τρυβλία αποθηκεύονταν για επώαση σε ειδικούς κλιβάνους, ενώ ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης σχετίζονταν με της ανάγκες ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού. Μετά το πέρας του απαραίτητου για την ανάπτυξη διαστήματος, γινόταν καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών στα τρυβλία της κάθε αραιώσης.



**Εικόνα 2.4:** Καταμέτρηση αποικιών. Ζύμες/Μύκητες (αριστερά), OMX(δεξιά).

Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν σχετικά με την επίδρασή τους στην αλλοίωση της φέτας ήταν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι και οι κόκκοι τους, καθώς και οι ζύμες/μύκητες. Στην περίπτωση των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, η μελέτη περιορίστηκε στον μικροοργανισμό αυτό και την OMX. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των παραπάνω μικροοργανισμών ήταν τα εξής:

*Τεχνική Επιφανειακής Επίστρωσης:*

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

Τεχνική Ενσωμάτωσης:

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

## 2.5 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Πριν την έναρξη της μικροβιολογικής ανάλυσης πραγματοποιούνταν οργανοληπτικός έλεγχος στα αρχικά δείγματα φέτας, που αφορούσε την εμφάνιση (χρώμα, μηχανικά ανοίγματα), την υφή (σκληρότητα), το άρωμα και την γεύση (όξινη, ταγγή) στα οποία όμως απουσίαζε η *Listeria monocytogenes*. Ο οργανοληπτικός αυτός έλεγχος πραγματοποιούνταν από τέσσερα ημι-εκπαιδευμένα μέλη του εργαστηρίου, μετά από συναίνεσή τους για συμμετοχή στην έρευνα. Για την οργανοληπτική αξιολόγηση δημιουργήθηκε κλίμακα βαθμολόγησης από το 1-3, με το 1 να αντιπροσωπεύει το αποδεκτό δείγμα (φρέσκο), το 2 το οριακά αποδεκτό δείγμα (οριακά φρέσκο) και το 3 το απορριπτέο δείγμα (αλλοιωμένο).

## 2.6 Μέτρηση pH

Κάθε φορά μετά το τέλος των μικροβιολογικών αναλύσεων πραγματοποιούνταν μέτρηση του pH στα αρχικά δείγματα κατά την 1<sup>η</sup> δεκαδική αραιώση (25 g φέτας σε 225 g Ringer). Η μέτρηση γινόταν με χρήση του ψηφιακού οργάνου μέτρησης pH Russell RL150 (Russell Inc., Cork, Ireland) με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). Πριν την έναρξη της μέτρησης γινόταν βαθμονόμηση του οργάνου μέσω της βύθισης του ηλεκτροδίου σε πρότυπα διαλύματα με pH 4, 7 και 10.





*Εικόνα 2.5.* Μέτρηση pH με το όργανο RL150, Russell (Cork, Ireland).

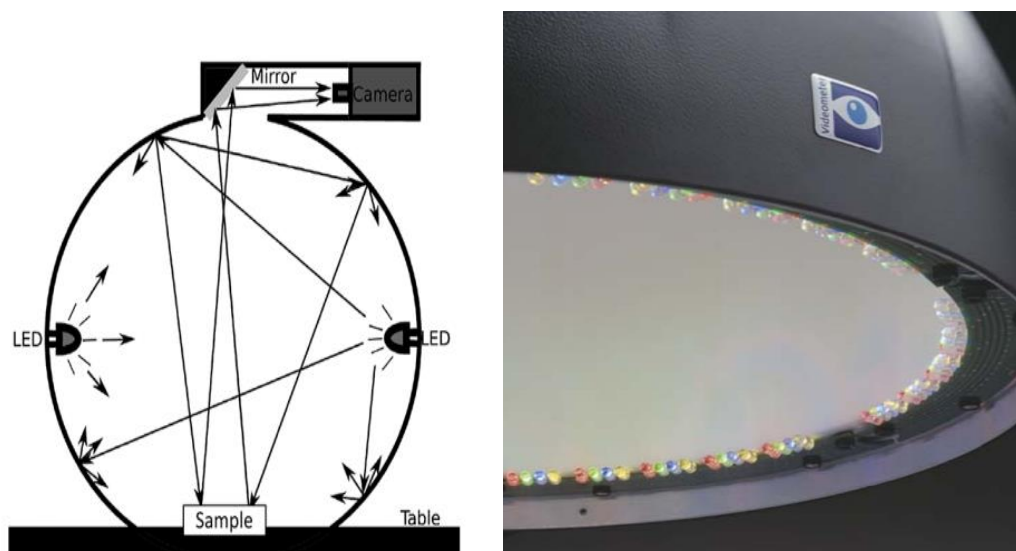
## **2.7 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging, MSI)**

### **2.7.1 Videometer Lab**

Για την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης στα εκάστοτε δείγματα έγινε χρήση του οργάνου VideometerLab (Videometer A/S, Denmark) μέσω του οποίου γίνεται λήψη πολυφασματικών εικόνων σε 18 διαφορετικά, μη ομοιόμορφα κατανομημένα μήκη κύματος με εύρος 405-970 nm (405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940, 970 nm). Το σύστημα αυτό αναπτύχθηκε από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο της Δανίας (Carstensen and Hansen, 2003) και βασίζεται στην καταγραφή της ανάκλασης της επιφάνειας των δειγμάτων με την βοήθεια μιας τυπικής μονοχρωματικής συσκευής συζευγμένου φορτίου, ενσωματωμένη στο εσωτερικό της μιας κάμερας Point Grey Scorpion. Κατά την μέτρηση, το δείγμα τοποθετείται στο εσωτερικό μιας σφαίρας Ulbricht στην κορυφή της οποίας βρίσκεται η κάμερα. Το εσωτερικό της σφαίρας έχει λευκό χρώμα και καμπυλότητα τέτοια, ώστε να πραγματοποιείται ομοιογενή ανάκλιση του φωτός. Στην περίμετρο της σφαίρας, βρίσκονται αντιδιαμετρικά μεταξύ τους δίοδοι εκπομπής του φωτός (Light emitting diodes, LEDs) των 18 μηκών κύματος. Κατά την λήψη μιας εικόνας, οι δίοδοι εκπομπής φωτός ανάβουν διαδοχικά και η ανάκλαση του κάθε μήκους κύματος καταγράφεται από την κάμερα στην κορυφή της σφαίρας. Το αποτέλεσμα της λήψης είναι μια μονόχρωμη εικόνα με 32-Bit ακρίβεια για κάθε τύπο LED, καταλήγοντας σε ένα υπερ-φασματικό κύβο με διαστάσεις 1280×960×18 (Panagou et al., 2014).

Κάθε φορά πριν από την χρήση του οργάνου πρέπει να πραγματοποιείται η διαδικασία του light set up, για την κατάλληλη γεωμετρική και ραδιομετρική βαθμονόμηση του

οργάνου ανάλογα με το είδος του αντικειμένου προς απεικόνιση (Folm-Hansen, 1999). Η κατάλληλη βαθμονόμηση σε συνδυασμό με την ομοιογενή ανάκλαση του φωτός διασφαλίζουν ένα μέσο δυναμικό εύρος φωτός και ελαχιστοποιούν φαινόμενα όπως σκιές και παραμόρφωση των ειδώλων κ.α. (Dissing et al., 2012, Panagou et al., 2014).



**Εικόνα 2.6.** Απεικόνιση του εσωτερικού του οργάνου VideometerLab(αριστερά) (Tsakanikas et al., 2015) και απεικόνιση του εσωτερικού της σφαίρας Ulbricht με τα LED των 18 μηκών κυμάτων γύρω από την περίμετρό της (δεξιά) ( Carstensen et al., 2006).

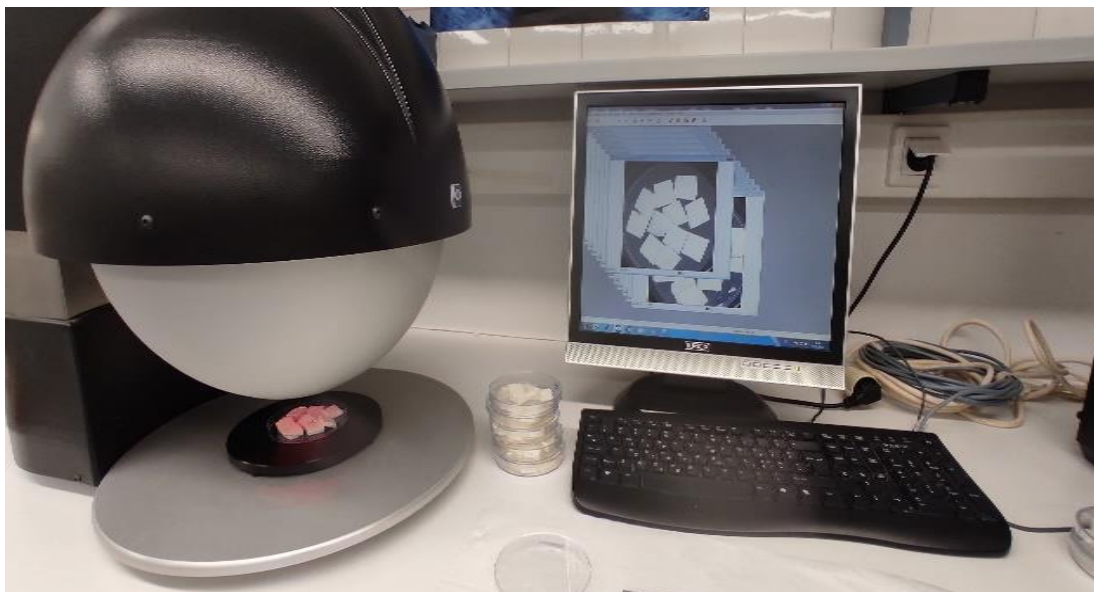
Μετά τη λήψη, οι εικόνες περιλαμβάνουν πληροφορίες που αφορούν εκτός από το δείγμα, περιοχές όπως η επιφάνεια του τρυβλίου κ.α. Για την αποφυγή της ανάλυσης αντικειμένων που δεν αφορούν στο δείγμα, πραγματοποιείται μια προ-επεξεργασία για την απομάκρυνση των τμημάτων αυτών. Η διαδικασία αυτή γίνεται μέσω της μεγιστοποίησης της αντίθεσης της περιοχής ενδιαφέροντος των δειγμάτων (Region Of Interest, ROI) και των ξένων αντικειμένων προκειμένου να διαχωριστούν μεταξύ τους (segmentation) (Tsakanikas et al., 2015; Ropodi et al.2015). Για την επεξεργασία αυτή χρησιμοποιείται το λογισμικό πρόγραμμα του VideometerLab (version 2.12.39) με βάση την αρχή της κανονικής διακριτής ανάλυσης (Canonical Discriminant Analysis, CDA). Η ανάλυση αυτή είναι γνωστή και ως διακριτή ανάλυση κατά Fisher και μέσω αυτής επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή διάκριση μεταξύ δύο ή περισσότερων κλάσεων με βάση τις ανεξάρτητες μεταβλητές (Daugaard et al., 2010). Η ανάλυση αυτή ακολουθεί την ακόλουθη εξίσωση:

$$R(a) = \frac{a^T \sum_s a}{a^T \sum_N a}$$

,όπου  $\sum_s$  είναι η διασπορά μεταξύ των κλάσεων και  $\sum_N$  η διασπορά μέσα στις κλάσεις (Carstensen and Hansen, 2003, Spirelli et al., 2020)

Μετά την διαδικασία του διαχωρισμού, σε κάθε απεικόνιση υπολογίζεται η μέση φασματοσκοπική ανάκλαση κάθε μήκους κύματος της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI), που προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των εικονοστοιχείων (pixels), ενώ πραγματοποιείται παράλληλα και ο υπολογισμός των αντίστοιχων τυπικών αποκλίσεων (Fengou et al., 2019). Τέλος γίνεται εξαγωγή των 36 μεταβλητών που προέκυψαν (18 μέσοι όροι και 18 τυπικές αποκλίσεις) για περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις (Ropodi et al., 2017).

Για τη λήψη των πολυφασματικών εικόνων τα δείγματα της φέτας που δεν χρησιμοποιήθηκαν κατά την μικροβιολογική ανάλυση (~ 20 g / δείγμα), τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν σε κενά τρυβλία, ούτως ώστε να καλυφθεί όσο το δυνατόν η επιφάνειά τους. Κατόπιν το κάθε τρυβλίο με το δείγμα τοποθετούνταν στην βάση του οργάνου και η σφαίρα Ulbricht χαμήλωνε έτσι ώστε να απομονώσει φωτογραφία του δείγματος. Με την χρήση του Videometer Lab πάρθηκαν n= 463 φάσματα.



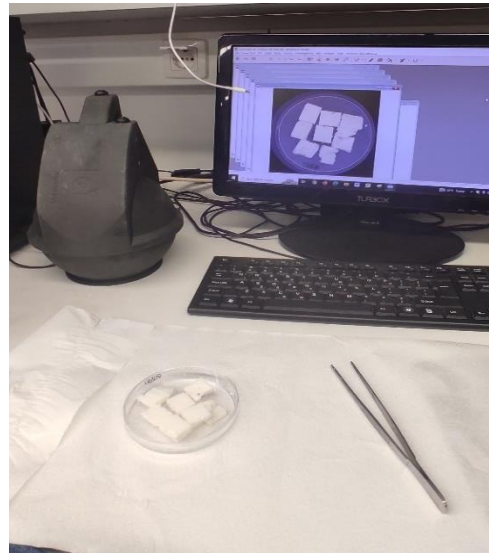
**Εικόνα 2.7:** Απεικόνιση του οργάνου VideometerLab την στιγμή της λήψης των απεικονίσεων των δειγμάτων.



*Εικόνα 2.8:* Απεικόνιση δειγμάτων φέτας μετά την χρήση του VideometerLab και κατόπιν απομόνωσης της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI).

### **2.7.2 Videometer Lite**

Για την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης στα εκάστοτε δείγματα έγινε επίσης χρήση του οργάνου VideometerLite (VIDEOMETER, Herlev, Denmark). Το όργανο αυτό είναι ασύρματο, φορητό και διαθέτει ενσωματωμένο σύστημα διόδων εκπομπής του φωτός (Light emitting diodes, LEDs), 10 διαφορετικών μηκών κύματος με εύρος 405-850 nm. Πιο συγκεκριμένα αυτά τα μήκη κύματος είναι τα εξής: 405 nm (Βιολετί), 430 nm (Λιλά), 450 nm (Μπλε), 490 nm (Κυανό), 515 nm (Green), 590 nm (Πορτοκαλί), 630 nm (Κόκκινο), 660 nm (Κόκκινο), 690 nm (Κόκκινο), 850 nm (Εγγύς Υπέρυθρο, NIR). Η σφαίρα του οργάνου έχει διάμετρο 130 mm και διαθέτει στην κορυφή της κουμπί για την λήψη των εικόνων που καθιστά εύκολη την χρήση του. Επιπλέον η λήψη των εικόνων γίνεται σε 7-10 sec, ενώ μπορεί να συνδεθεί με το λογισμικό του VideometerLab. Ομοίως όπως και στην περίπτωση του VideometerLab πραγματοποιείται προ-επεξεργασία των εικόνων για την απομάκρυνση των απεικονίσεων των ξένων σωμάτων από τις περιοχές ενδιαφέροντος έτσι ώστε τα δεδομένα που θα ληφθούν από τις τελικές εικόνες να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση. Με την χρήση του Videometer Lite πάρθηκαν  $n= 304$  φάσματα.



***Εικόνα 2.8:** Εξωτερική απεικόνιση του οργάνου VideometerLite (VIDEOMETER, Herlev, Denmark) ([www.videometer.com](http://www.videometer.com)) (αριστερά). Λήψη πολυφασματικής εικόνας με χρήση του οργάνου VideometerLite (VIDEOMETER, Herlev, Denmark) (δεξιά).*



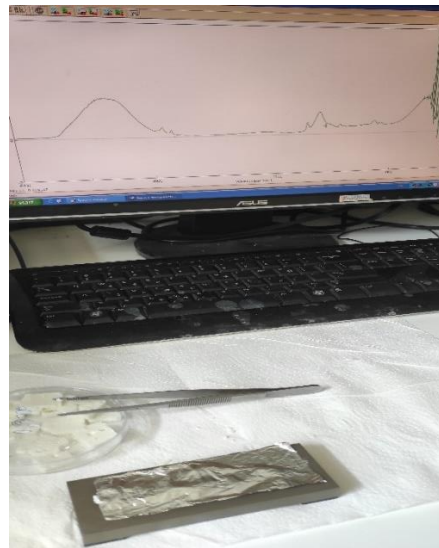
***Εικόνα 2.9:** Απεικόνιση δειγμάτων φέτας μετά τη χρήση του VideometerLab και κατόπιν απομόνωσης της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI).*

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

Για την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier στα δείγματα της φέτας, έγινε χρήση του φασματόμετρου FTIR- 6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan), με κρύσταλλο ZnSe 45° HATR – Horizontal Attenuated Total Reflectance (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, Ηνωμένες Πολιτείες), ανιχνευτή DLaTGS και διαχωριστή Ge/KBr. Ο δείκτης διάθλασης του κρυστάλλου ήταν 2.4  $\mu\text{m}$  και το βάθος διείσδυσης 2.0  $\mu\text{m}$  στα 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Κατά την διαδικασία συλλογής φασματοσκοπικών δεδομένων, τα δείγματα της φέτας που είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί για την συλλογή δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης, τοποθετούνταν πάνω στην κρυσταλλική πλάκα έτσι ώστε να καλύπτεται όσο το δυνατόν περισσότερο η επιφάνεια του κρυστάλλου. Στην συνέχεια τοποθετούνταν πάνω στην πλάκα φύλλο αλουμινόχαρτου και ασκούνταν σε αυτό πίεση έτσι ώστε το δείγμα να έρθει σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του κρυστάλλου. Πριν την έναρξη της μέτρησης και ανά 4 δείγματα, πραγματοποιούνταν λήψη φάσματος αναφοράς (background) με τοποθέτηση του κενού κρυστάλλου (απουσία δείγματος), στο εσωτερικό του οργάνου. Μεταξύ των μετρήσεων των δειγμάτων ο κρύσταλλος καθαριζόταν σχολαστικά με απορρυπαντικό, απιονισμένο νερό και τέλος με ακετόνη, με χρήση μπατονέτας (απομάκρυνση των υπολειμμάτων του δείγματος, γρήγορο στέγνωμα επιφάνειας κρυστάλλου).

Για την λήψη των φασμάτων χρησιμοποιούνταν το λογισμικό Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) software version 2 (Jasco Corp.), σε μήκη κύματος εύρους 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  με 100 σαρώσεις ανάλυσης 4  $\text{cm}^{-1}$ , ανά συνολικό χρόνο 2 min. Συνολικά πάρθηκαν n=462 φάσματα με την χρήση του FTIR, ενώ τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν περιλάμβαναν την περιοχή 900-1800  $\text{cm}^{-1}$ , η οποία είναι μια πολύ χρήσιμη περιοχή για τα μοντέλα πρόβλεψης της αλλοίωσης διαφόρων τροφίμων, κυρίως προϊόντων κρέατος (Fengou et al., 2019) αλλά και γαλακτοκομικών (Papadopoulou et al., 2021). Στην περιοχή αυτή συγκεκριμένα λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την βιοχημική σύσταση των τροφίμων καθώς και τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών (Fengou et al., 2019).



**Εικόνα 2.10:** Εξωτερική απεικόνιση του οργάνου FTIR- 6200 JASCO (αριστερά). Δείγμα τοποθετημένο στην κρύσταλλο ZnSe 45° HATR, καλυμμένο με φύλλο αλουμινίου, έτοιμο για την μέτρηση (δεξιά).

## 2.9 Μέτρηση ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ )

Μετά το τέλος των μετρήσεων των δειγμάτων με τις μεθόδους MSI και FTIR πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ), με χρήση ψηφιακού οργάνου (Dew Point Water Activity Meter 4TE, Aqualab, Pullman, Washington, U.S.). Για την λήψη της μέτρησης, ένα τεμαχισμένο μικρό κομμάτι φέτας από κάθε δείγμα, τοποθετούνταν κάθε φορά σε μικρή πλαστική βάση και στην συνέχεια μέσα στο όργανο.



**Εικόνα 2.11:** Μέτρηση ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ) με χρήση του οργάνου Dew Point Water Activity Meter 4TE.

## 2.10 Ανάλυση Δεδομένων

Για την εκτίμηση της αλλοίωσης των δειγμάτων φέτας έγινε συλλογή των φασματοσκοπικών δεδομένων από τα παραπάνω όργανα (Videometer Lab, Videometer Lite και το FTIR- 6200 JASCO) και πραγματοποιήθηκαν περεταίρω αναλύσεις.

### 2.10.1 Κατασκευή μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R) για την ποσοτική εκτίμηση της OMX.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) στα δείγματα της φέτας, κατασκευάστηκαν μοντέλα με την γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R), η οποία έχει ευρεία εφαρμογή στο πεδίο της έρευνας των τροφίμων για ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων (Cheng and Sun, 2015). Χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι, αντίθετα με άλλες, έχει την δυνατότητα να αναλύει πολλαπλά δεδομένα με θόρυβο και υψηλή συσχέτιση μεταξύ τους (X-μεταβλητές), ενώ παράλληλα μοντελοποιεί διάφορες μεταβλητές απόκρισης (Y-μεταβλητές). Πιο αναλυτικά η μέθοδος αυτή δημιουργεί μια νέα γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (εξαρτημένες μεταβλητές), δημιουργώντας ένα νέο χώρο ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X-scores) με ορθογώνια διάταξη, ενώ παράλληλα ορίζει νέο αριθμό κύριων συνιστωσών (Latent variables, LVs) για τον νέο αυτό χώρο (Wold et al., 2001; Romia and Bernardez, 2009). Το μοντέλο που κατασκευάζεται είναι απαλλαγμένο από το overfitting που προκύπτει συχνά στις πολυάριθμες και συσχετιζόμενες μεταβλητές καθώς εκπαιδεύεται και προβλέπει την σημαντικότητα κάθε παράγοντα κατά την διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation). Με την διασταυρούμενη επικύρωση, τα δεδομένα διακρίνονται σε ομάδες που χρησιμοποιούνται διαδοχικά και έτσι δημιουργούνται μοντέλα με τα εναπομείναντα δεδομένα. Ύστερα από την δημιουργία ενός μοντέλου πραγματοποιείται καταμέτρηση των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών Y. Πριν από την εφαρμογή ενός μοντέλου για την πρόβλεψη του μικροβιακού φορτίου πρέπει να πραγματοποιείται η επικύρωσή του με ανεξάρτητα και αντιπροσωπευτικά δείγματα. Αν δεν υφίστανται τέτοια δείγματα το μοντέλο επανεκτιμάται μετά από τυχαιοποίηση των δεδομένων (Wold et al., 2001). Αντίθετα από άλλες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης η PLS-R διατηρεί την συμμετρία μεταξύ προβλεπόμενων και ανεξάρτητων μεταβλητών (Abdi, 2003).



Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις φασματοσκοπικές μετρήσεις των δειγμάτων της φέτας μέσω των οργάνων Videometer Lab, Videometer Lite και FTIR - 6200 JASCO αξιολογήθηκαν με τα αντίστοιχα δεδομένα της OMX, με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Στην μέθοδο αυτή τα φασματοσκοπικά δεδομένα του Videometer Lab (18 Mean, 18 SD), Videometer Lite (13 Mean, 13 SD) και του FTIR ( $900-1800\text{ cm}^{-1}$ ) χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά ως ανεξάρτητες μεταβλητές X, ενώ τα δεδομένα της OMX ως εξαρτημένες μεταβλητές Y. Η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) πραγματοποιήθηκε μέσω της χρήσης του λογισμικού προγράμματος XLSTAT (version 2023.3.1, Addinsoft, New York, NY, USA) καθώς και του The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway) στις περιπτώσεις όπου ήταν απαραίτητη η προεπεξεργασία των αρχικών δεδομένων. Συνολικά κατασκευάστηκαν 6 μοντέλα με διαφορετική προεπεξεργασία των αρχικών δεδομένων τους, σε κάποια από τα οποία εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι μετασχηματισμού 1ης παραγώγου Savitzky-Golay Derivatives (παράθυρο 13 σημείων) ή SNV (Standard Normal Variate), ενώ σε κάποια άλλα δεν έγινε κανένας μετασχηματισμός. Οι μετασχηματισμοί που επιλέχθηκαν για το κάθε μοντέλο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.1**.

Στην περίπτωση των δεδομένων που εξάχθηκαν από το Videometer:

- i. **Συνθήκη συντήρησης υπό κενό:** Το 70 % περίπου των δειγμάτων ( $n=161$ ) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και την επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30 % ( $n=70$ ) για την πρόβλεψη (prediction). Οι μεταβλητές X ( $n=36$ ) που επιλέχθηκαν τροποποιήθηκαν με τον μετασχηματισμό της τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV). Ο μετασχηματισμός αυτός χρησιμοποιήθηκε καθώς παρέχει την δυνατότητα μείωσης των παρεμβολών και αλληλοεπικαλύψεων που μπορεί να προκύψουν στα φασματοσκοπικά δεδομένα, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητά τους (Sinelli et. al., 2005; Tsakanikas et al., 2016). Τις μεταβλητές Y ( $n=1$ ) αποτέλεσαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.
- ii. **Συνθήκη συντήρησης σε άλμη:** Το 70 % περίπου των δειγμάτων ( $n=162$ ) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και την επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30 % ( $n=70$ ) για την πρόβλεψη (prediction). Οι μεταβλητές X ( $n=36$ ) που επιλέχθηκαν δεν τροποποιήθηκαν με κάποιο

μετασχηματισμό, ενώ τις μεταβλητές  $Y(n=1)$  αποτέλεσαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.

Στην περίπτωση των δεδομένων που εξάχθηκαν από το Videometer Lite:

- i. **Συνθήκη συντήρησης υπό κενό:** Το 70 % περίπου των δειγμάτων ( $n=106$ ) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και την επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30% ( $n=46$ ) για την πρόβλεψη (prediction). Οι μεταβλητές  $X$  ( $n=26$ ) που επιλέχθηκαν δεν τροποποιήθηκαν με κάποιο μετασχηματισμό, ενώ τις μεταβλητές  $Y$  ( $n=1$ ) αποτέλεσαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.
- ii. **Συνθήκη συντήρησης σε άλμη:** Το 70 % περίπου των δειγμάτων ( $n=106$ ) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και την επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30 % ( $n=46$ ) για την πρόβλεψη(prediction). Οι μεταβλητές  $X$  ( $n=26$ ) που επιλέχθηκαν τροποποιήθηκαν με τον μετασχηματισμό της τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV) ενώ τις μεταβλητές  $Y$  ( $n=1$ ) αποτέλεσαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.

Στην περίπτωση των δεδομένων που εξάχθηκαν από το FTIR- 6200 JASCO :

- i. **Συνθήκη συντήρησης υπό κενό:** Το 70% περίπου των δειγμάτων ( $n=161$ ) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και την επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30% ( $n=70$ ) για την πρόβλεψη (prediction). Οι μεταβλητές  $X$  ( $n=934$ ) που επιλέχθηκαν τροποποιήθηκαν με τον μετασχηματισμό της τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV) ενώ τις μεταβλητές  $Y$  ( $n=1$ ) αποτέλεσαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.
- ii. **Συνθήκη συντήρησης σε άλμη:** Το 70 % περίπου των δειγμάτων ( $n=161$ ) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (training) και την επικύρωση (validation) του μοντέλου, ενώ το υπόλοιπο 30% ( $n=70$ ) για την πρόβλεψη (prediction). Οι μεταβλητές  $X$  ( $n=934$ ) που επιλέχθηκαν μετασχηματίστηκαν με την 1<sup>η</sup> παράγωγο Savitzky-Golay Derivatives για την εξομάλυνση των δειγμάτων, ενώ τις μεταβλητές  $Y$  ( $n=1$ ) αποτέλεσαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.

Για τον αποτελεσματικό προσδιορισμό της OMX, η επιλογή κάθε μοντέλου πραγματοποιούνταν με βάση τις τιμές του συντελεστής συσχέτισης ( $R^2$ ) και της ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE). Μετά την σύγκριση των τιμών των συντελεστών αυτών για κάθε πιθανό μετασχηματισμό, επιλεγόταν ο πιο αποτελεσματικός.

**Πίνακας 2.1:** Μετασχηματισμοί των φασματοσκοπικών δεδομένων.

ΟΡΓΑΝΑ	ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ
VideometerLab	KENO	SNV
	ΑΛΜΗ	Όχι μετασχηματισμός
VideometerLite	KENO	Όχι μετασχηματισμός
	ΑΛΜΗ	SNV
FTIR- 6200 JASCO	KENO	SNV
	ΑΛΜΗ	Savitzky-Golay Derivatives (1η παράγωγος)

### 2.10.2 Κατασκευή Μοντέλων Διακριτής Ανάλυσης με την μέθοδο Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis-PLS-DA) για την ανίχνευση της *L. monocytogenes*.

Η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis- PLS-DA) χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή μοντέλων που επιτρέπουν τον διαχωρισμό των δειγμάτων τις φέτας σε διακριτές κλάσεις ποιότητας όπως για παράδειγμα ως προς την απουσία (Control) ή την παρουσία (*Listeria*) της *Listeria monocytogenes*. Στην μέθοδο αυτή, ο αλγόριθμος στοχεύει στην δημιουργία μια νέας νοητής γραμμικής περιοχής X και Y (περιοχή X και Y μεταβλητών που διαχωρίζει τις επιμέρους κλάσεις), ενώ προβάλλει την ίδια στιγμή τα αρχικά δεδομένα εισόδου-εξόδου σε έναν λανθάνοντα χώρο. Με τον τρόπο αυτό εξάγει μια σειρά από κύρια στοιχεία, τις λεγόμενες λανθάνουσες μεταβλητές (LVs) με ορθογώνια δομή (Panagou et al., 2014). Οι πληροφορίες των LVs προβλέπουν την συμπεριφορά των εξαρτημένων μεταβλητών Y καθώς και την θέση που θα έχουν οι ανεξάρτητες X μεταβλητές στον χώρο (Brereton & Lloyd, 2014; Gromski et al., 2015). Μέσω των υπολειπόμενων διακυμάνσεων μπορεί να προσδιοριστεί ο βέλτιστος αριθμός των LVs, για την

μοντελοποίηση χρήσιμων πληροφοριών και την αποφυγή της υπερβολικής προσαρμογής των δεδομένων (Brereton, 2006).

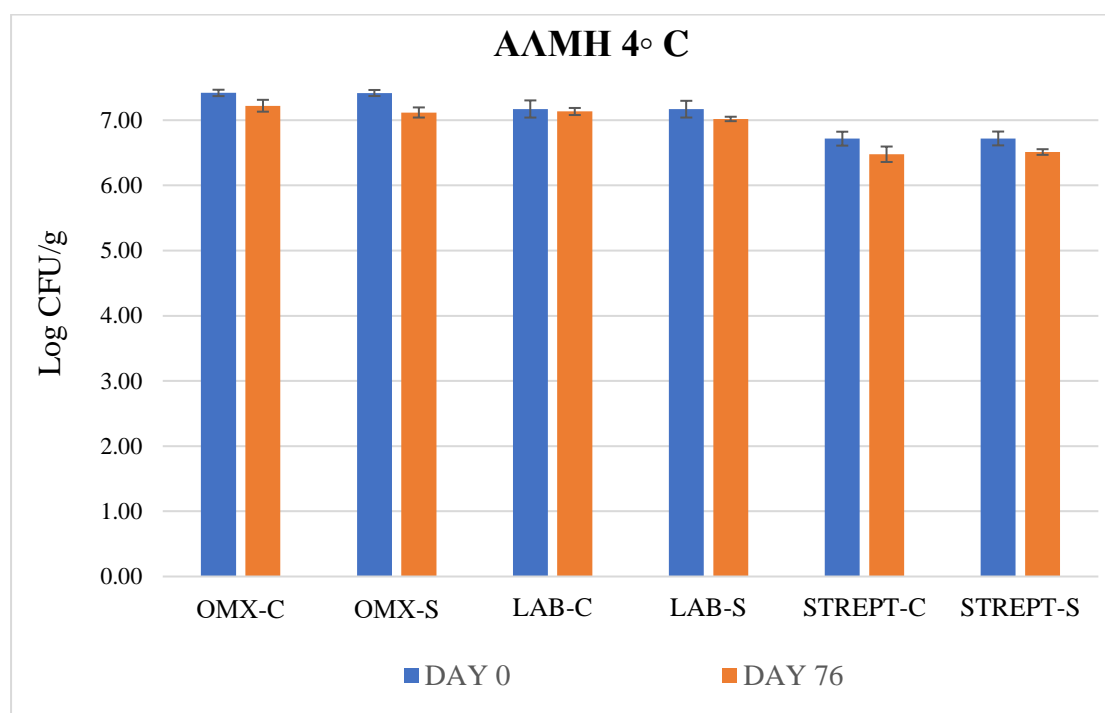
Στη συγκεκριμένη μελέτη τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από κάθε ένα από τα τρία όργανα ξεχωριστά (Videometer Lab , Videometer Lite, FTIR - 6200 JASCO) ταξινομήθηκαν αρχικά σε έναν διδιάστατο πίνακα (X), όπου οι σειρές αντιπροσώπευαν τα δείγματα της φέτας που αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές συσκευασίες, θερμοκρασίες συντήρησης και χρονικά διαστήματα, ενώ οι στήλες αντιπροσώπευαν τις μεταβλητές (μήκη κύματος για τα Videometer Lab/Lite, κυματάρια για FTIR). Επίσης στον πίνακα αυτό έγινε εισαγωγή μια στήλης Y που περιείχε την εξαρτημένη μεταβλητή (δείγματα με απουσία ή παρουσία *L.monocytogenes*). Για μπορεί να πραγματοποιηθεί διάκριση μεταξύ των κλάσεων, έγινε κωδικοποίηση της μεταβλητής Y με αριθμητική μορφή , θέτοντας το -1 στην <<κλάση 1>> (απουσία *L.monocytogenes*) και το 1 στην <<κλάση 2 >> (παρουσία *L.monocytogenes*). Η ευαισθησία ταξινόμησης του μοντέλου PLS-DA (sensitivity %) προσδιορίστηκε από τον αριθμό των σωστά ταξινομημένων δειγμάτων φέτας σε κάθε κλάση ποιότητας, διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων της αρχικής κλάσης. Η ακρίβεια του μοντέλου (precision %) υπολογίστηκε από τον αριθμό των σωστά ταξινομημένων δειγμάτων φέτας σε κάθε κλάση ποιότητας, διαιρεμένο με τον αριθμό των δειγμάτων που προβλέφθηκαν θετικά από το μοντέλο σε κάθε κλάση ποιότητας και τέλος η συνολικά σωστή ακρίβεια ταξινόμησης (accuracy %) του μοντέλου προσδιορίστηκε ως ο αριθμός των σωστών ταξινόμησεων σε όλες τις κλάσεις διαιρεμένος με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν (Sokolova & Lapalme, 2009).

Για την εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) έγινε χρήση του λογισμικού προγράμματος XLSTAT και του The Unscrambler© ver.9.7 στις περιπτώσεις όπου ήταν απαραίτητη η προεπεξεργασία των αρχικών δεδομένων. Συνολικά κατασκευάστηκαν 6 μοντέλα με ίδιες μεθόδους προεπεξεργασία των αρχικών δεδομένων όπου ήταν απαραίτητο, όπως και στην περίπτωση της PLS-R (**Πίνακας 2.1**).

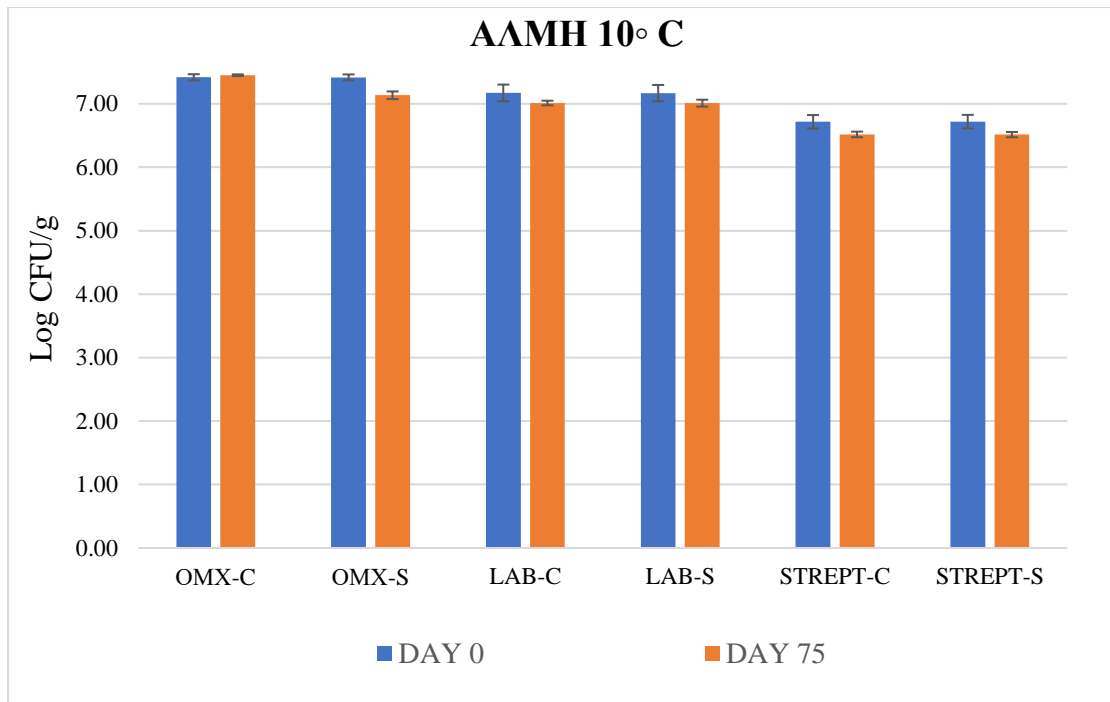
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων

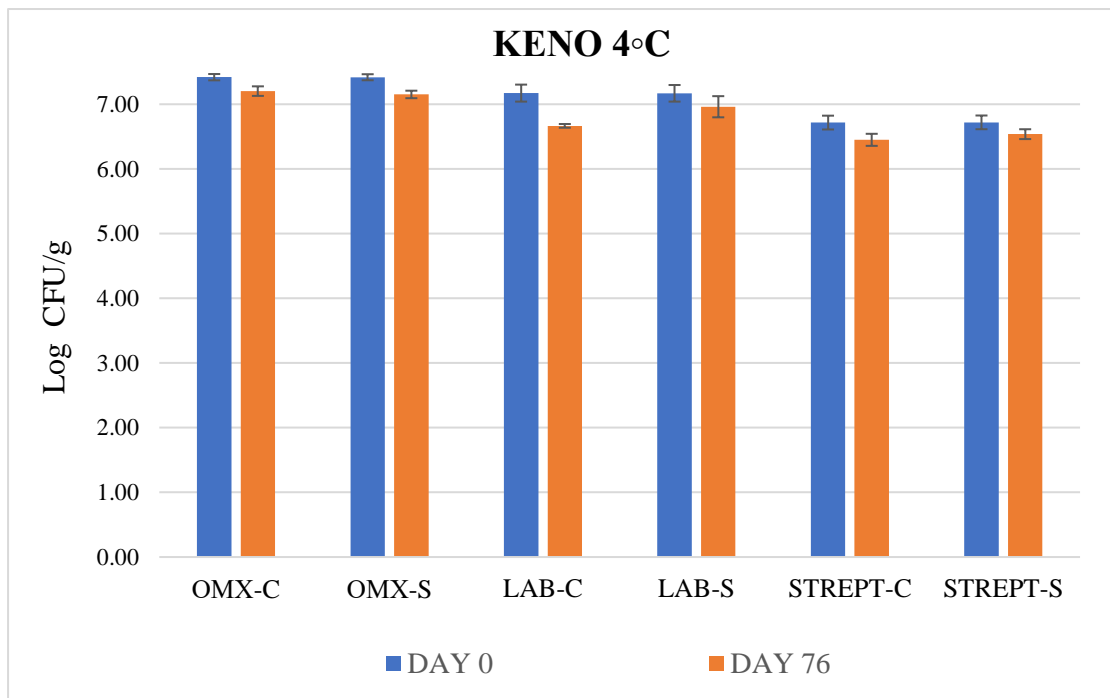
Στα παρακάτω **Διαγράμματα (3.1-3.4)** παρουσιάζονται οι πληθυσμοί (log CFU/g) της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων στα δείγματα της φέτας για τις μεταχειρίσεις Control (C) και Supernatant (S) την πρώτη και την τελευταία μέρα της συντήρησης, σε συσκευασία άλμης και κενού για τις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C). Κατόπιν στα **Διαγράμματα 3.5-3.6** απεικονίζεται η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού (log CFU/g) των ζυμών/μυκήτων (**Διάγραμμα 3.5**) και της *Listeria monocytogenes* (**Διάγραμμα 3.6**), καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τους στην εκάστοτε συνθήκη. Σε όλα τα διαγράμματα παρατίθενται οι μέσοι όροι του πληθυσμού των μικροοργανισμών (log CFU/g) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις των επαναλήψεων του κάθε δείγματος.



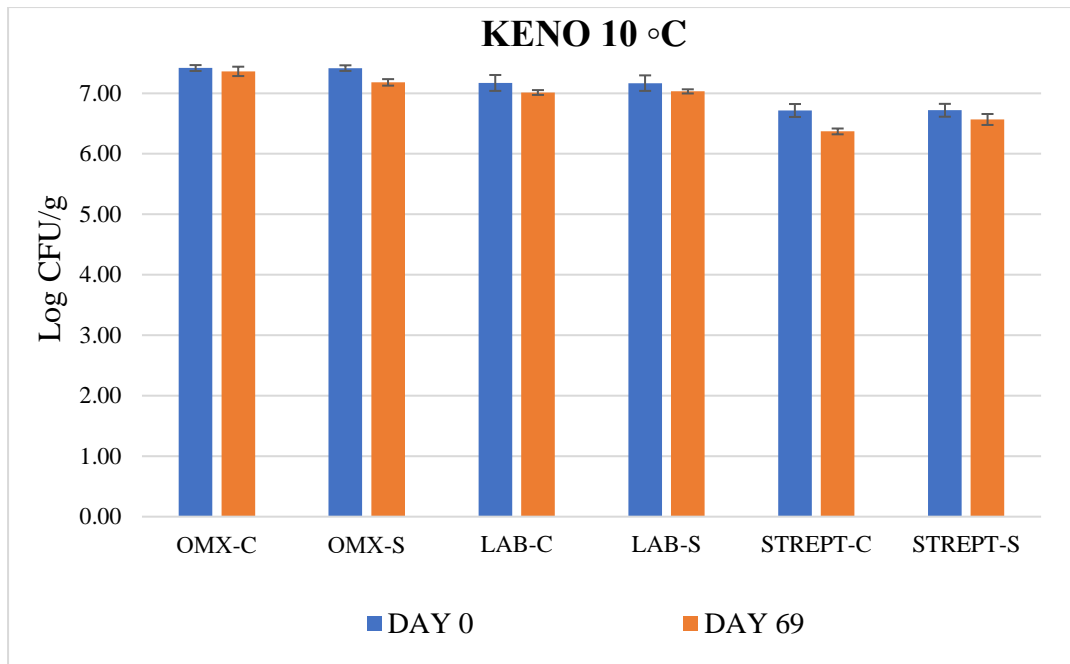
**Διάγραμμα 3.1:** Ραβδόγραμμα μετρήσεων του μικροβιολογικού φορτίου (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) των δειγμάτων της φέτας (Control, C/ Supernatant, S) στους 4 °C στην άλμη, την πρώτη (●) και την τελευταία (●) μέρα της συντήρησης, όσον αφορά την OMX, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους (STREPT.).



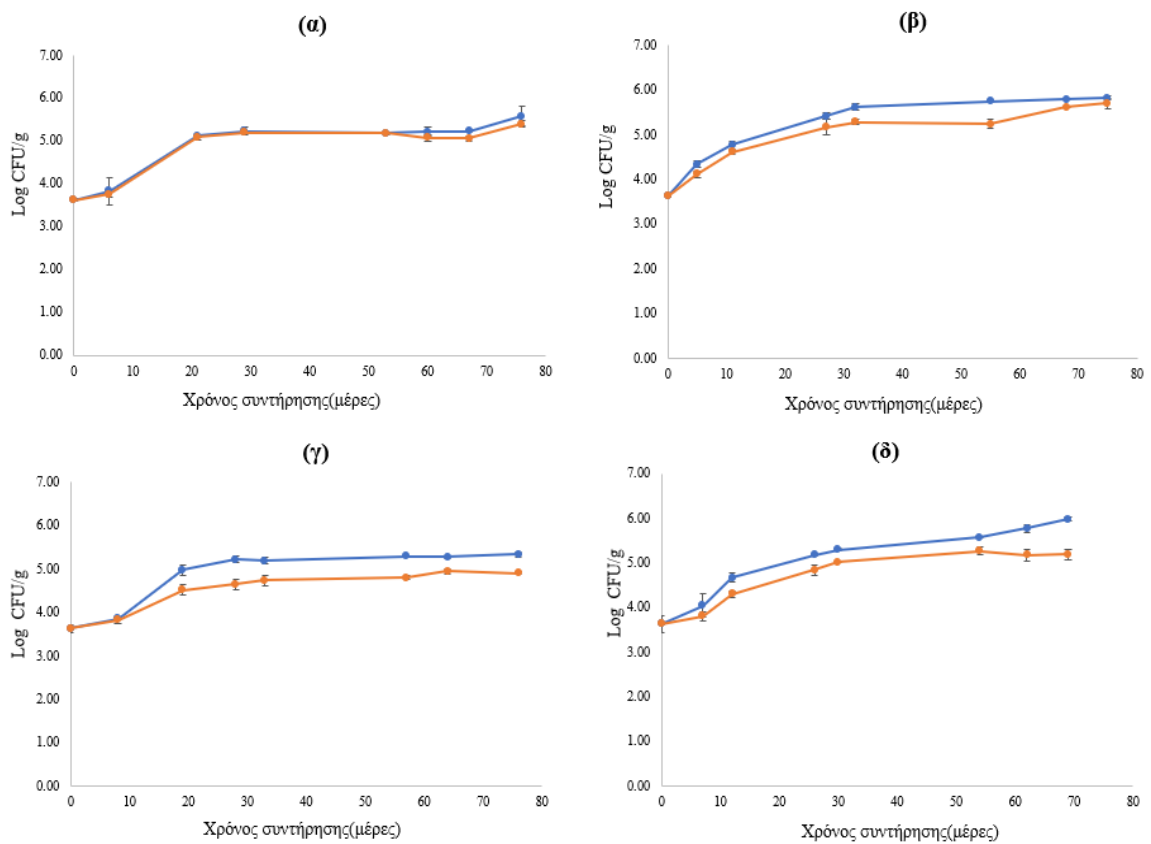
**Διάγραμμα 3.2** Ραβδόγραμμα μετρήσεων του μικροβιολογικού φορτίου (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) των δειγμάτων της φέτας (Control, C/Supernatant, S) στους 10 °C στην άλμη την πρώτη (●) και την τελευταία (●) μέρα της συντήρησης, όσον αφορά την OMX, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους (STREPT.).



**Διάγραμμα 3.3:** Ραβδόγραμμα μετρήσεων του μικροβιολογικού φορτίου (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) των δειγμάτων της φέτας (Control, C/ Supernatant, S) στους 4 °C υπό κενό την πρώτη (●) και την τελευταία (●) μέρα της συντήρησης, όσον αφορά την OMX, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους (STREPT.).

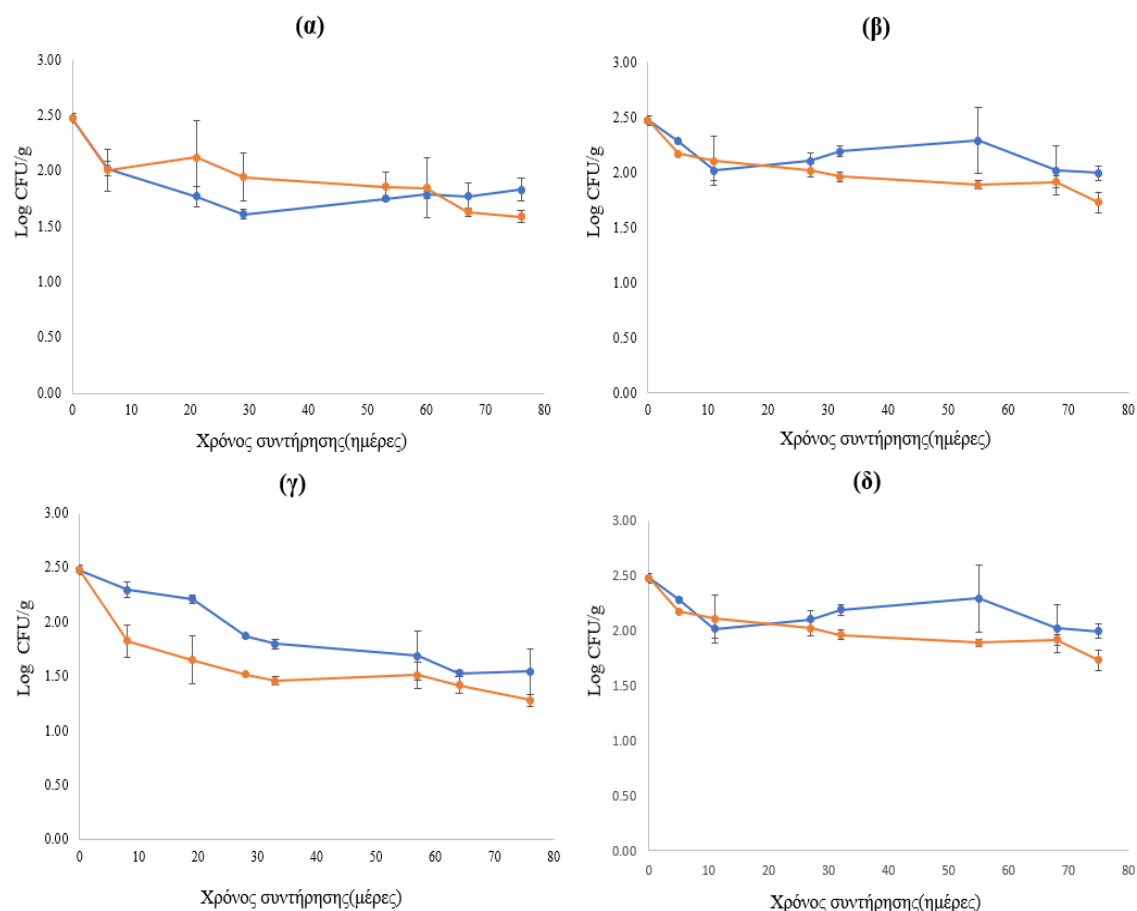


**Διάγραμμα 3.4:** Ραβδόγραμμα μετρήσεων του μικροβιολογικού φορτίου (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) των δειγμάτων της φέτας (Control, C/ Supernatant, S) στους 10 °C υπό κενό την πρώτη (●) και την τελευταία (●) μέρα της συντήρησης, όσον αφορά την OMX, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους (STREPT.).



**Διάγραμμα 3.5:** Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών/μυκήτων κατά την συντήρηση των δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) στην άλμη στους α) 4 °C και β) 10 °C

καθώς και σε κενό στους γ) 4 °C και δ) στους 10 °C. Σε όλα τα διαγράμματα απεικονίζονται με (●) τα δείγματα του Control, ενώ με (●) τα δείγματα του Supernatant.



**Διάγραμμα 3.6:** Μεταβολή του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* κατά την συντήρηση των δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι  $\pm$  τυπικές αποκλίσεις) στην άλμη στους α) 4 °C και β) 10 °C καθώς και σε κενό στους γ) 4 °C και δ) στους 10 °C. Σε όλα τα διαγράμματα απεικονίζονται με (●) τα δείγματα του Control, ενώ με (●) τα δείγματα του Supernatant.

Σύμφωνα με τα παραπάνω **Διαγράμματα (3.1 - 3.6)**, κυρίαρχο μικροοργανισμό στην φέτα και για τις δύο θερμοκρασίες συντήρησης (4 °C/10 °C) αποτέλεσαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), ακολουθούμενα από τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους και τέλος τις ζύμες/μύκητες. Την πρώτη μέρα συντήρησης (DAY 0), ο πληθυσμός της OMX ήταν  $7.42 \pm 0.05$  log CFU/g, των οξυγαλακτικών (LAB)  $7.17 \pm 0.13$  log CFU/g, των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων  $6.72 \pm 0.10$  log CFU/g και των ζυμών/μυκήτων  $3.63 \pm 0.02$  log CFU/g.

Στην περίπτωση των δειγμάτων της άλμης (**Διαγράμματα 3.1, 3.2, 3.5α-β, 3.6α-β**) η OMX δεν εμφάνισε ιδιαίτερη μεταβολή (ελάχιστη μείωση) σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) καθώς την τελευταία μέρα της συντήρησης το φορτίο της ήταν  $7.22 \pm 0.09$  log CFU/g (4 °C) και  $7.45 \pm 0.01$  log CFU/g (10 °C) στα δείγματα του



Control και  $7.12 \pm 0.07 \log \text{CFU/g}$  ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) και  $7.13 \pm 0.06 \log \text{CFU/g}$  ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) στα τα δείγματα του Supernatant (**Διαγράμματα 3.1 - 3.2**). Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους, στο τέλος της συντήρησης στους  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  ο πληθυσμός τους ήταν παρόμοιος στα δείγματα του Control ( $7.13 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$  για LAB,  $6.48 \pm 0.11 \log \text{CFU/g}$ ,  $6.48 \pm 0.11$  για γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους) και του Supernatant ( $7.01 \pm 0.03 \log \text{CFU/g}$  για LAB,  $6.51 \pm 0.04 \log \text{CFU/g}$  για γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους) (**Διάγραμμα 3.1**). Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισαν και τα δείγματα των  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  για τα δείγματα του Control ( $7.01 \pm 0.03 \log \text{CFU/g}$  για LAB,  $6.51 \pm 0.04 \log \text{CFU/g}$  για γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους) και του Supernatant ( $7.01 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$  για LAB,  $6.51 \pm 0.04 \log \text{CFU/g}$  για γαλακτικούς στρεπτόκοκκους/κόκκους) (**Διάγραμμα 3.2**). Ο πληθυσμός των LAB σχετικά σταθερός και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης (**Διάγραμμα 3.1-3.2**), ενώ των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων φάνηκε να μειώνεται ελάχιστα κατά την συντήρηση στους  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (**Διάγραμμα 3.1**), ενώ οι ζύμες/μύκητες αυξήθηκαν και στις δύο θερμοκρασίες (**Διάγραμμα 3.5α-β**). Στα δείγματα του Control ο πληθυσμός των ζυμών/μυκήτων έφτασε  $5.59 \pm 0.22 \log \text{CFU/g}$  στους  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  και  $5.83 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$  στους  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , ενώ στα δείγματα του Supernatant έφτασε  $5.40 \pm 0.07 \log \text{CFU/g}$  στους  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  και  $5.70 \pm 0.11 \log \text{CFU/g}$  στους  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Αναφορικά με τον παθογόνο *Listeria monocytogenes* (**Διάγραμμα 3.6α-β**) στο τέλος της συντήρησης και στις δύο θερμοκρασίες ( $4 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ }^\circ\text{C}$ ), τα δείγματα του Supernatant ( $1.59 \pm 0.11 \log \text{CFU/g}$ ,  $1.73 \pm 0.09 \log \text{CFU/g}$ ) εμφάνισαν χαμηλότερο πληθυσμό σε σχέση με αυτά του Control ( $1.83 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ ,  $1.99 \pm 0.06 \log \text{CFU/g}$ ).

Στα δείγματα του κενού (**Διαγράμματα 3.3, 3.4, 3.5γ-δ, 3.6γ-δ**), όπως και στην περίπτωση της άλμης, η OMX δεν εμφάνισε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες συντήρησης ( $4 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Παρόμοια συμπεριφορά είχε και ο πληθυσμός της κυρίαρχης μικροβιακής χλωρίδας (LAB) καθώς παρέμεινε σχετικά σταθερός (**Διάγραμμα 3.3-3.4**). Πιο συγκεκριμένα στο τέλος της συντήρησης ο πληθυσμός τους ήταν  $6.66 \pm 0.03$  ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ )  $\log \text{CFU/g}$  και  $7.01 \pm 0.04$  ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ )  $\log \text{CFU/g}$  στα δείγματα του Control και  $6.96 \pm 0.16$  ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ )  $\log \text{CFU/g}$  και  $7.03 \pm 0.03$  ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ )  $\log \text{CFU/g}$  στα τα δείγματα του Supernatant. Αντίθετα, ο πληθυσμός των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων μειώθηκε ελάχιστα και στις δύο θερμοκρασίες ( $4 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (**Διάγραμμα 3.3-3.4**). Τόσο στην περίπτωση των LAB όσο και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στους πληθυσμούς μεταξύ των δειγμάτων του Control και του Supernatant. Σχετικά με τον πληθυσμό των ζυμών/μυκήτων (**Διάγραμμα 3.5γ-δ**) παρουσιάστηκε αύξηση, με τα δείγματα του

Supernatant να εμφανίζουν χαμηλότερο πληθυσμό συγκριτικά με αυτά του Control. Πιο αναλυτικά ο πληθυσμός τους στα δείγματα του Control ήταν  $5.55 \pm 0.06 \log \text{CFU/g}$  ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) και  $5.98 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$  στους ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ), ενώ στα δείγματα του Supernatant ήταν  $4.91 \pm 0.03 \log \text{CFU/g}$  ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) και  $5.19 \pm 0.11 \log \text{CFU/g}$  ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Όσον αφορά τον παθογόνο μικροοργανισμό (**Διάγραμμα 3.6γ-δ**), παρατηρήθηκε μείωση καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις δύο θερμοκρασίες ( $4 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ }^\circ\text{C}$ ), ενώ στο τέλος της συντήρησης τα δείγματα του Supernatant ( $1.28 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$ ,  $1.35 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$ ) είχαν χαμηλότερο πληθυσμό συγκριτικά με αυτά του Control ( $1.54 \pm 0.21 \log \text{CFU/g}$ ,  $1.92 \pm 0.06 \log \text{CFU/g}$ ).

### 3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων pH και ενεργότητας ύδατος (aw)

Στον παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι τιμές του pH (**Πίνακας 3.1**) και της ενεργότητας ύδατος (**Πίνακας 3.2**) στα δείγματα της φέτας την πρώτη και την τελευταία μέρα της συντήρησης τους. Στους πίνακες συμπεριλαμβάνονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών τους για τις δύο επαναλήψεις του κάθε δείγματος.

**Πίνακας 3.1:** Τιμές του pH την πρώτη και την τελευταία μέρα της συντήρησης στους  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  και  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  στην άλμη και σε κενό, όπου C: Control, S:Supernatant, CL: Control και *Listeria*, SL: Supernatant και *Listeria*.

<b>PH</b>				
<b>ΆΛΜΗ</b>				
<b>4 °C</b>				
ΗΜΕΡΑ	C	S	CL	SL
0	$4.295 \pm 0.035$	$4.325 \pm 0.035$	$4.280 \pm 0.010$	$4.355 \pm 0.035$
76	$4.321 \pm 0.014$	$4.4215 \pm 0.035$	$4.304 \pm 0.025$	$4.276 \pm 0.018$
<b>10 °C</b>				
ΗΜΕΡΑ	C	S	CL	SL
0	$4.295 \pm 0.035$	$4.325 \pm 0.035$	$4.280 \pm 0.010$	$4.355 \pm 0.035$
75	$4.027 \pm 0.011$	$4.113 \pm 0.031$	$4.027 \pm 0.012$	$4.001 \pm 0.013$
<b>KENO</b>				
<b>4 °C</b>				
ΗΜΕΡΑ	C	S	CL	SL
0	$4.295 \pm 0.035$	$4.325 \pm 0.035$	$4.280 \pm 0.010$	$4.355 \pm 0.035$
76	$4.389 \pm 0.001$	$4.414 \pm 0.020$	$4.416 \pm 0.014$	$4.457 \pm 0.011$
<b>10 °C</b>				
ΗΜΕΡΑ	C	S	CL	SL
0	$4.295 \pm 0.035$	$4.325 \pm 0.035$	$4.280 \pm 0.010$	$4.355 \pm 0.035$
69	$4.474 \pm 0.042$	$4.514 \pm 0.061$	$4.475 \pm 0.020$	$4.483 \pm 0.022$

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3.1** την πρώτη μέρα της συντήρησης όλα τα δείγματα της φέτας είχαν τιμή pH ~ 4.3 ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας (4 °C/10 °C) ή της συσκευασίας συντήρησης (άλμη/κενό). Παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις των δειγμάτων οι τιμές του pH μεταβάλλονται ελάχιστα από την πρώτη στην τελευταία μέρα της συντήρησης.

**Πίνακας 3.2:** Τιμές της ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ) την πρώτη και την τελευταία μέρα της συντήρησης στους 4 °C και 10 °C στην άλμη και σε κενό, όπου C: Control, S:Supernatant, CL: Control και *Listeria*, SL: Supernatant και *Listeria*.

<b>aw</b>				
<b>ΑΛΜΗ</b>				
<b>4 °C</b>				
<b>ΗΜΕΡΑ</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>CL</b>	<b>SL</b>
0	0.965 ± 0.001	0.956 ± 0.003	0.956 ± 0.001	0.962 ± 0.002
76	0.971 ± 0.001	0.972 ± 0.001	0.972 ± 0.003	0.971 ± 0.001
<b>10 °C</b>				
<b>ΗΜΕΡΑ</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>CL</b>	<b>SL</b>
0	0.965 ± 0.001	0.956 ± 0.003	0.956 ± 0.001	0.962 ± 0.002
75	0.972 ± 0.001	0.972 ± 0.001	0.968 ± 0.001	0.970 ± 0.001
<b>KENO</b>				
<b>4 °C</b>				
<b>ΗΜΕΡΑ</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>CL</b>	<b>SL</b>
0	0.965 ± 0.001	0.956 ± 0.003	0.956 ± 0.001	0.962 ± 0.002
76	0.963 ± 0.004	0.960 ± 0.002	0.965 ± 0.002	0.964 ± 0.003
<b>10 °C</b>				
<b>ΗΜΕΡΑ</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>CL</b>	<b>SL</b>
0	0.965 ± 0.001	0.956 ± 0.003	0.956 ± 0.001	0.962 ± 0.002
69	0.968 ± 0.004	0.960 ± 0.001	0.958 ± 0.002	0.961 ± 0.001

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3.2** την πρώτη μέρα της συντήρησης όλα τα δείγματα της φέτας είχαν τιμή  $a_w$  ~ 0.96 ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας (4 °C/10 °C) ή της συσκευασίας συντήρησης (άλμη/κενό). Τόσο στην άλμη όσο και στο κενό και για τις δύο θερμοκρασίες δεν παρουσιάστηκε ιδιαίτερη μεταβολή καθώς οι τιμές έμεναν σχετικά σταθερές μεταξύ του 0.96-0.97.

### 3.3 Οργανοληπτική Αξιολόγηση

Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης στα δείγματα της φέτας όλων των μεταχειρίσεων (Control, Supernatant, Control και *Listeria*, Supernatant και *Listeria*) για τις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και

συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό), μετά από σύμφωνη συμμετοχή ημι-εκπαιδευμένου εργαστηριακού προσωπικού στον οργανοληπτικό έλεγχο.

**Πίνακας 3.3:** Αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων της φέτας κατά την συντήρηση στους 4 °C και 10 °C στην άλμη και σε κενό, όπου C: Control, S: Supernatant, CL: Control και *Listeria*, SL: Supernatant και *Listeria*. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε ως προς την εμφάνιση (Appearance, Ap), την υφή (Texture, Tx), το άρωμα (Aroma, Ar), την γεύση (Taste, Ts) για τα δείγματα με απουσία *Listeria* καθώς και για το σύνολο των χαρακτηριστικών (Total, Tot)

ΑΛΜΗ																											
	C							S							CL					SL							
	DAY	Ap	Tx	Ar	Ts	Tot		DAY	Ap	Tx	Ar	Ts	Tot		DAY	Ap	Tx	Ar		Tot	DAY	Ap	Tx	Ar	Tot		
4°C	0						0						0					0					0				
	6						6						6					6					6				
	21						21						21					21					21				
	29						29						29					29					29				
	53						53						53					53					53				
	60						60						60					60					60				
	67						67						67					67					67				
	76						76						76					76					76				
10°C	0						0						0					0					0				
	5						5						5					5					5				
	11						11						11					11					11				
	27						27						27					27					27				
	39						39						39					39					39				
	55						55						55					55					55				
	68						68						68					68					68				
	75						75						75					75					75				
ΚΕΝΟ																											
	C							S							CL					SL							
	DAY	Ap	Tx	Ar	Ts	Tot		DAY	Ap	Tx	Ar	Ts	Tot		DAY	Ap	Tx	Ar		Tot	DAY	Ap	Tx	Ar	Tot		
4°C	0						0						0					0					0				
	8						8						8					8					8				
	19						19						19					19					19				
	28						28						28					28					28				
	33						33						33					33					33				
	57						57						57					57					57				
	64						64						64					64					64				
	76						76						76					76					76				
10°C	0						0						0					0					0				
	7						7						7					7					7				
	12						12						12					12					12				
	26						26						26					26					26				
	38						38						38					38					38				
	54						54						54					54					54				
	62						62						62					62					62				
	69						69						69					69					69				

Score key:	<span style="background-color: #4a7ebb; color: white; padding: 2px;">1</span>	<span style="background-color: #ffcc00; color: black; padding: 2px;">2</span>	<span style="background-color: #cc0000; color: white; padding: 2px;">3</span>	Ap= Appearance	C= Control
				Tx = Texture	S= Supernatant
				Ar = Aroma	
				Ts = Taste	
				Tot = Total	

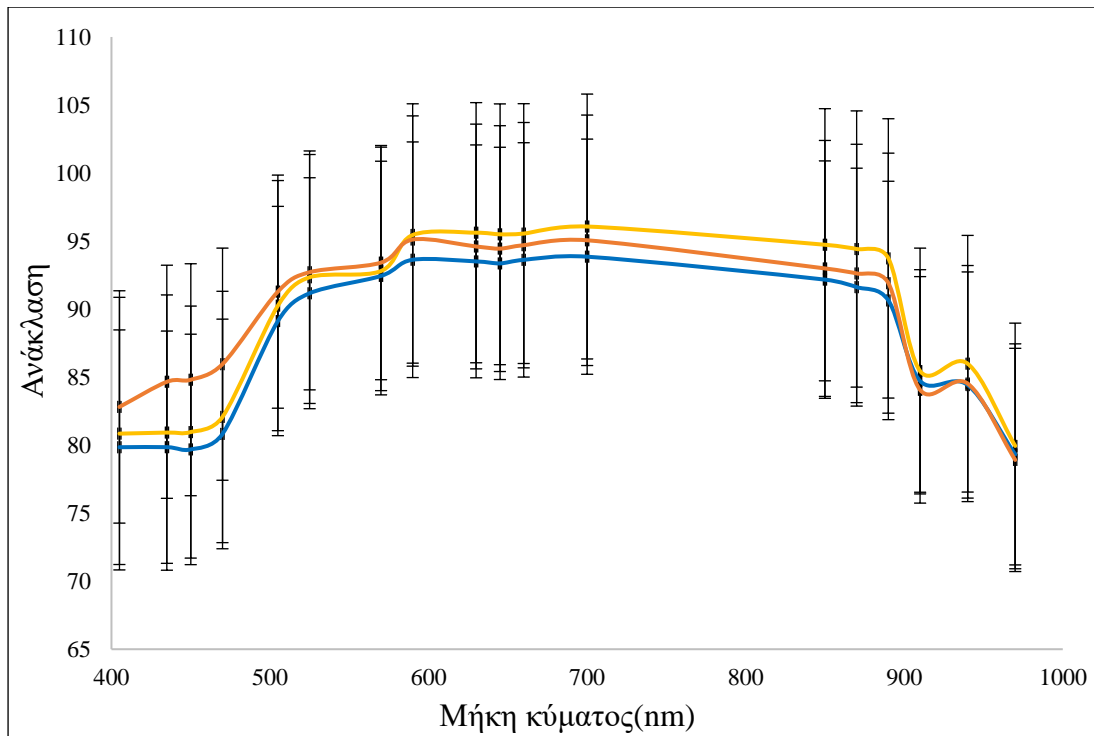
Αρχικά παρατηρήθηκε ότι στην άλμη και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης, τα δείγματα του Supernatant (S) είχαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με αυτά του Control (C). Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα του S εκδήλωσαν την

αλλοίωση ως προς την εμφάνισή τους 10-15 ημέρες αργότερα σε σχέση με τα δείγματα του C, ενώ στα δείγματα του κενού η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της συντήρησης στους 10 °C (16 ημέρες). Η εμφάνιση της αλλοίωσης και στις δύο συσκευασίες συντήρησης έγινε αντιληπτή αρχικά μέσω της μεταβολής της εμφάνισης (κιτρινισμένη επιφάνεια), κατόπιν μέσω της υφής της (μαλακή, εύθρυπτη δομή) και στην περίπτωση των δειγμάτων των 10 °C προς το τέλος της συντήρησης μέσω του αρώματος και της γεύσης της (όξινη, ταγγή). Σχετικά με την παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα δεν φάνηκε να επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, καθώς εκδήλωσαν σχεδόν τα ίδια αποτελέσματα με τα δείγματα στα οποία απουσίαζε η *Listeria*. Στο χρονικό πλαίσιο συντήρησης του πειράματος (69,75 και 76 ημέρες) τα δείγματα της φέτας δεν έφτασαν ποτέ στην απόρριψη και την τελευταία μέρα της συντήρησης χαρακτηρίστηκαν ως οριακά αποδεκτά (οριακά φρέσκα). Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η εμφάνιση της αλλοίωσης ήταν λίγο ταχύτερη στα δείγματα των 10 °C, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις η αλλοίωση των δειγμάτων ως προς την υφή εμφανίστηκε πιο άμεσα στα δείγματα της συσκευασίας κενού ανεξαρτήτως της θερμοκρασία συντήρησης.

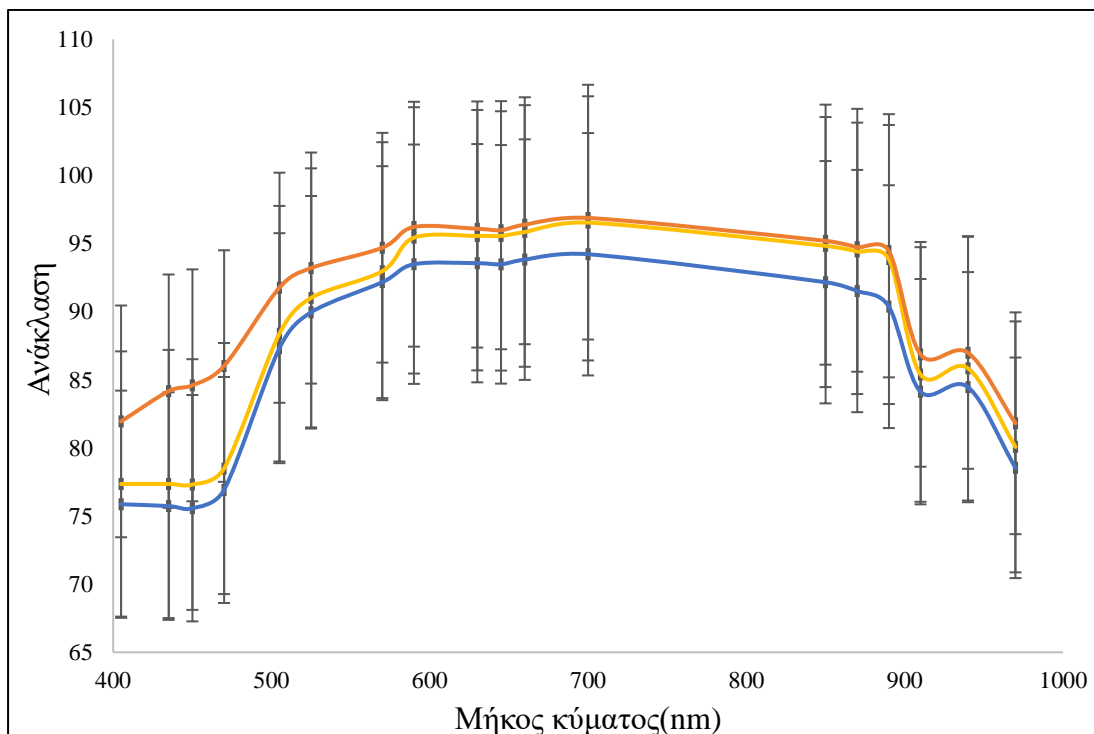
### **3.4 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων**

#### **3.4.1 Αποτελέσματα δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης (MSI)**

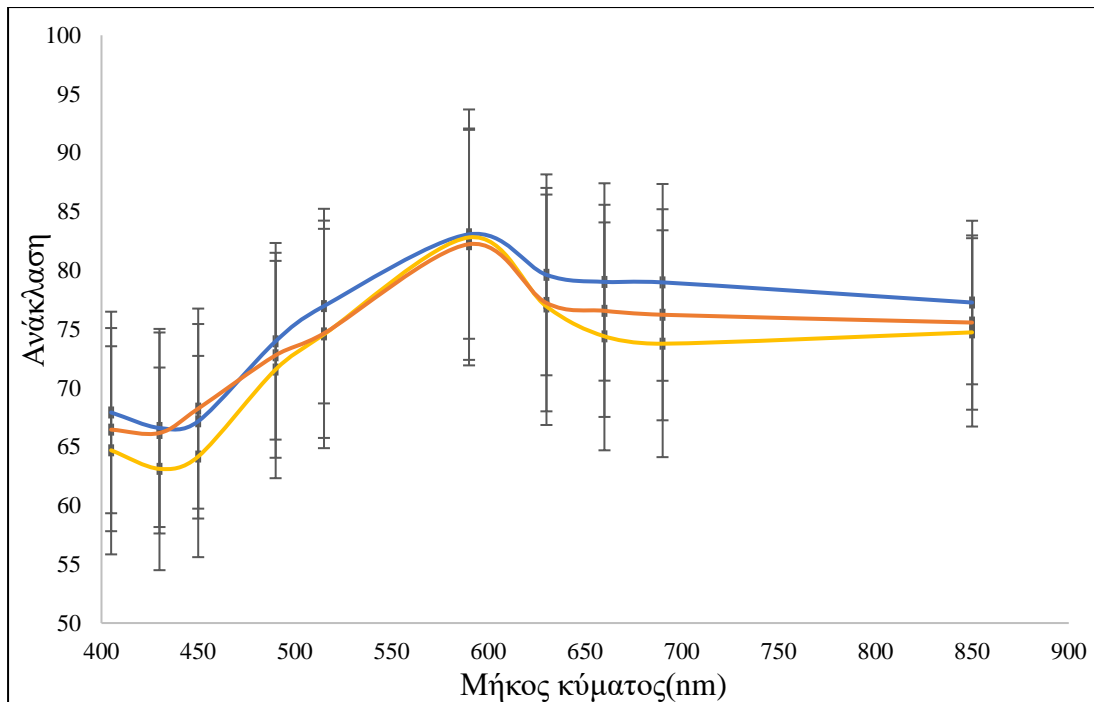
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα φάσματα των φρέσκων (0-2<sup>η</sup> δειγματοληψία) και των αλλοιωμένων (6<sup>η</sup>-7<sup>η</sup> δειγματοληψία) δειγμάτων της φέτας για τα 18 μήκη κύματος του Videometer Lab (**Διαγράμματα 3.7-3.8**) καθώς και για τα 10 μήκη κύματος του Videometer Lite (**Διαγράμματα 3.9-3.10**) στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Τα φάσματα που αφορούν τα φρέσκα και τα αλλοιωμένα δείγματα είναι ανεξάρτητα των μεταχειρίσεων του Control, Supernatant, Control και *Listeria*, Supernatant και *Listeria*. Επιπλέον, σε όλα τα διαγράμματα παρατίθενται οι μέσοι όροι των ανακλάσεων των δειγμάτων για κάθε μήκος κύματος καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των επαναλήψεων.



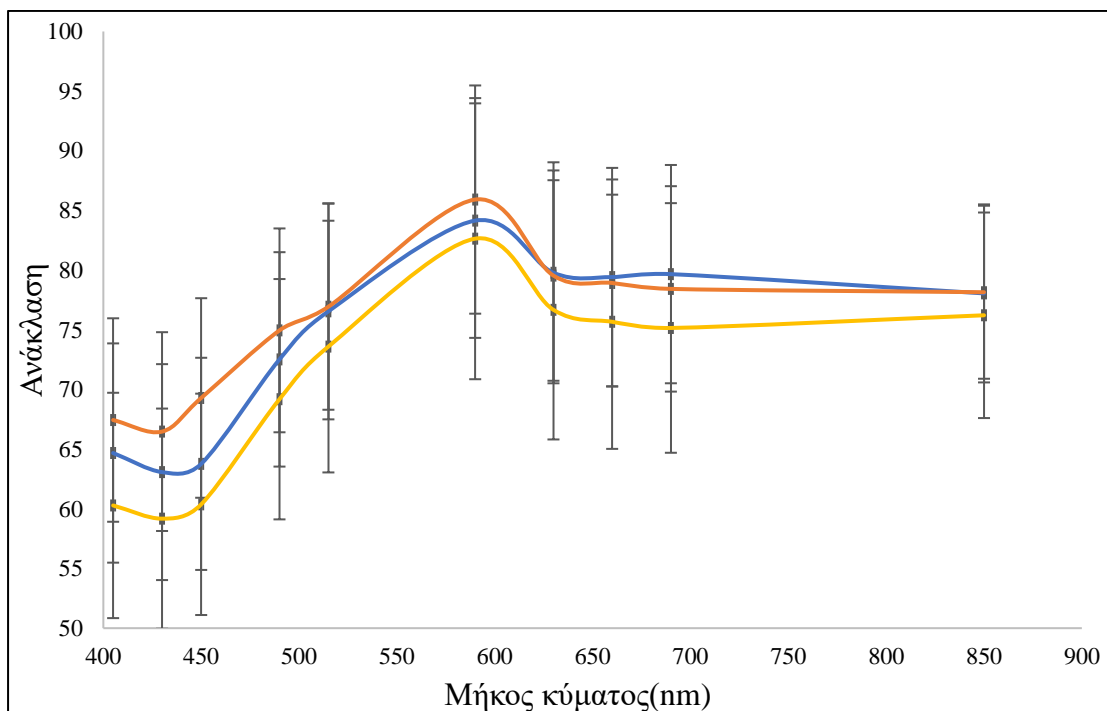
**Διάγραμμα 3.7:** Σύγκριση των φασμάτων των φρέσκων (—), των αλλοιωμένων στους 4 °C (—) και των αλλοιωμένων στους 10 °C (—) δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) κατά την συντήρηση στην άλμη. Τα φάσματα συλλέχθηκαν από το Videometer Lab.



**Διάγραμμα 3.8:** Σύγκριση των φασμάτων των φρέσκων (—), των αλλοιωμένων στους 4 °C (—) και των αλλοιωμένων στους 10 °C (—) δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) κατά την συντήρηση σε κενό. Τα φάσματα συλλέχθηκαν από το Videometer Lab.



**Διάγραμμα 3.9:** Σύγκριση των φασμάτων των φρέσκων (—), των αλλοιωμένων στους 4 °C (—) και των αλλοιωμένων στους 10 °C (—) δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) κατά την συντήρηση στην άλμη. Τα φάσματα συλλέχθηκαν από το Videometer Lite.



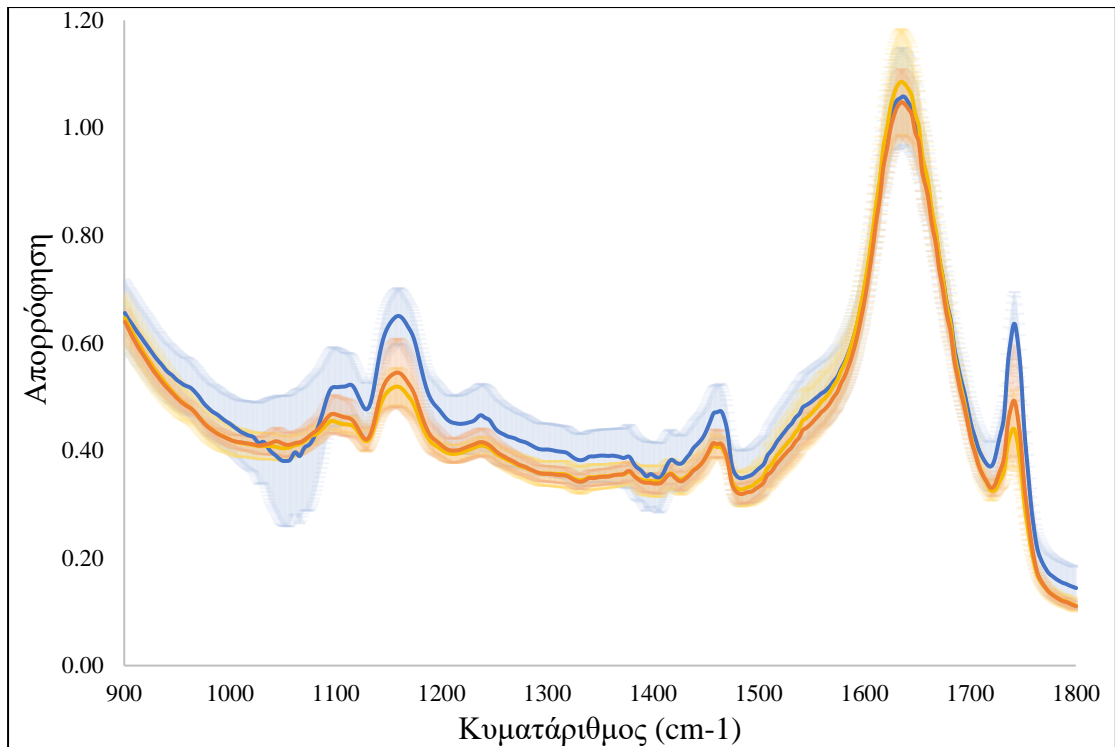
**Διάγραμμα 3.10:** Σύγκριση των φασμάτων των φρέσκων (—), των αλλοιωμένων στους 4 °C (—) και των αλλοιωμένων στους 10 °C (—) δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) κατά την συντήρηση στο κενό. Τα φάσματα συλλέχθηκαν από το Videometer Lite.

Όσον αφορά στα φάσματα που συλλέχθηκαν από το Videometer Lab (**Διαγράμματα 3.7-3.8**), παρατηρήθηκε ότι η ανάκλαση των αλλοιωμένων δειγμάτων ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των φρέσκων και στις δύο συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση της άλμης (**Διάγραμμα 3.7**) η ανάκλαση των αλλοιωμένων δειγμάτων στους 10 °C ήταν μεγαλύτερη από αυτή των αλλοιωμένων στους 4 °C μέχρι τα 600 nm, ενώ από τα 600 nm έως τα 970 nm παρατηρήθηκε το αντίστροφο. Στην περίπτωση του κενού (**Διάγραμμα 3.8**) η ανάκλαση των αλλοιωμένων δειγμάτων στους 10 °C ήταν σταθερά υψηλότερη από αυτή των αλλοιωμένων δειγμάτων στους 4 °C. Σχετικά με τα φάσματα του Videometer Lite (**Διαγράμματα 3.9-3.10**), στην περίπτωση της άλμης (**Διάγραμμα 3.9**) η ανάκλαση των φρέσκων δειγμάτων ήταν υψηλότερη από αυτή των αλλοιωμένων και στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/ 10 °C), ενώ στην περίπτωση του κενού (**Διάγραμμα 3.10**) υψηλότερη ανάκλαση εμφάνισαν τα αλλοιωμένα δείγματα των 10 °C έως τα 630nm και κατόπιν τα φρέσκα από 630-970 nm.

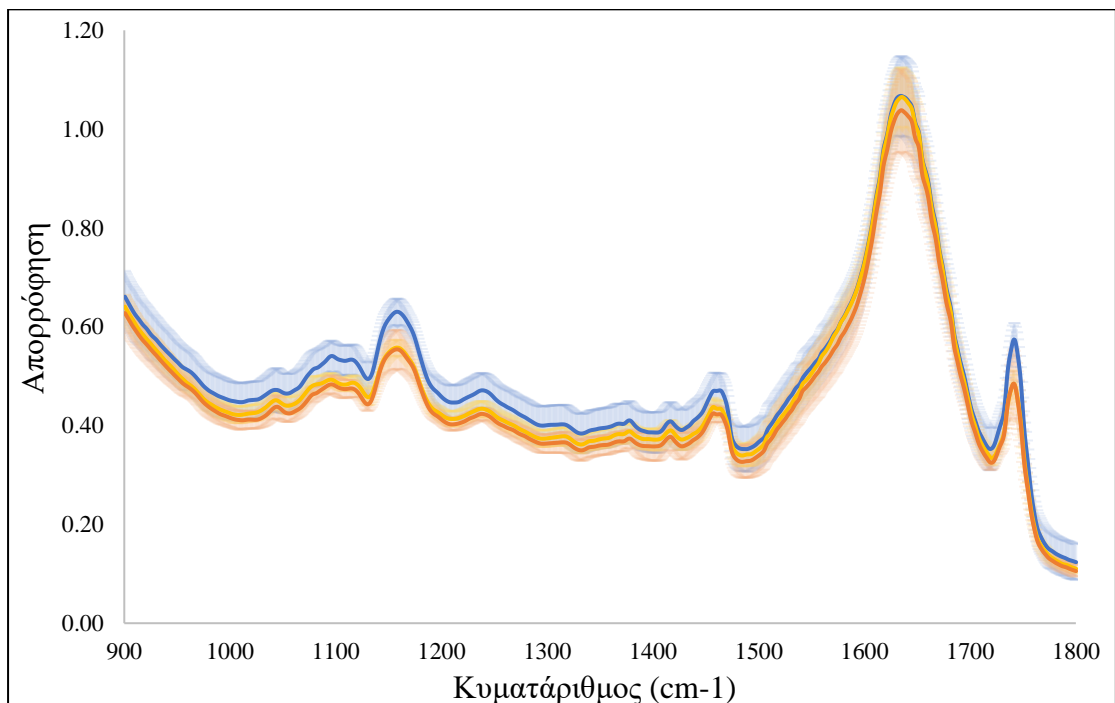
#### **3.4.2 Αποτελέσματα δεδομένων φασματοσκοπίας υπερόθρου (FTIR)**

Στα παρακάτω **Διαγράμματα (3.9 - 3.10)** παρουσιάζονται τα φάσματα των φρέσκων (0-2<sup>η</sup> δειγματοληψία) και των αλλοιωμένων (6<sup>η</sup>-7<sup>η</sup> δειγματοληψία) δειγμάτων της φέτας στην περιοχή 900-1800 cm<sup>-1</sup> του FTIR στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Τα φάσματα που αφορούν τα φρέσκα και τα αλλοιωμένα δείγματα είναι ανεξάρτητα των μεταχειρίσεων του Control, Supernatant, Control και *Listeria*, Supernatant και *Listeria*. Επιπλέον, σε όλα τα διαγράμματα παρατίθενται οι μέσοι όροι των απορροφήσεων των δειγμάτων για κάθε μήκος κύματος καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των επαναλήψεων.





**Διάγραμμα 3.11:** Σύγκριση των φασμάτων των φρέσκων (—), των αλλοιωμένων στους 4 °C (—) και των αλλοιωμένων στους 10 °C (—) δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) κατά τη συντήρηση στην άλμη. Τα φάσματα συλλέχθηκαν από το FTIR.



**Διάγραμμα 3.12:** Σύγκριση των φασμάτων των φρέσκων (—), των αλλοιωμένων στους 4 °C (—) και των αλλοιωμένων στους 10 °C (—) δειγμάτων της φέτας (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις) κατά την συντήρηση στο κενό. Τα φάσματα συλλέχθηκαν από το FTIR.

Μετά από οπτική παρατήρηση των παραπάνω **Διαγραμμάτων (3.11-3.12)** συμπεραίνεται, πως οι σημαντικότερες κορυφές του φάσματος της φέτας που συλλέχθηκαν από το FTIR εντοπίζονται στους κυματάρια 1050, 1100, 1165, 1240, 1320, 1380, 1420, 1465, 1640 και 1745  $\text{cm}^{-1}$  με υψηλότερες απορροφήσεις στα 1100, 1465, 1640 και 1745  $\text{cm}^{-1}$ . Τόσο στην περίπτωση της άλμης (**Διάγραμμα 3.11**) όσο και του κενού (**Διάγραμμα 3.12**), σχεδόν σε όλη την περιοχή του φάσματος, οι απορροφήσεις των αλλοιωμένων δειγμάτων ήταν χαμηλότερες από αυτές των φρέσκων, με τις απορροφήσεις των αλλοιωμένων δειγμάτων στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/ 10 °C) να κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα. Ωστόσο μικρή εξαίρεση αποτέλεσαν τα αποτελέσματα για τις κορυφές στα 1050  $\text{cm}^{-1}$  και 1640  $\text{cm}^{-1}$  όπου παρατηρήθηκε το αντίθετο φαινόμενο, κυρίως στην περίπτωση των δειγμάτων της άλμης καθώς και οι περιοχές από 1575-1620  $\text{cm}^{-1}$  και από 1645-1700  $\text{cm}^{-1}$ , όπου οι απορροφήσεις όλων των δειγμάτων (Φρέσκα, Αλλοιωμένα 4 °C, Αλλοιωμένα 10 °C) ήταν στα ίδια επίπεδα και στις δύο συνθήκες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Το είδος της απορρόφησης που δημιουργεί τις κορυφές αυτές του φάσματος παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.4**.

**Πίνακας 3.4:** Παρατηρούμενες συχνότητες από την εφαρμογή του FTIR στα δείγματα της φέτας και συσχετίσεις με το είδος της απορρόφησης με βάση την έρευνα των Papadopoulou et al. (2018). Στις παρενθέσεις παρατίθενται οι κυματάρια στους οποίους εμφανίστηκαν οι κορυφές απορρόφησης, ενώ οι συμβολισμοί που παρατίθενται εντός του πίνακα αφορούν τα είδη των δονήσεων και είναι οι εξής:  $\nu$ = δονήσεις τάσεως,  $\delta$ = δονήσεις κάμψεως, *asym*= ασύμμετρη, *sym*= συμμετρική.

Κυματάρια ( $\text{cm}^{-1}$ )	Είδος απορρόφησης	Πηγή
1070-1040(1050)	Λιπίδια, πολυσακχαρίτες (C-O, C-O-P $\nu$ )	Bocker et al., 2007
1110-1070(1100)	Νουκλεϊκά οξέα και φωσφολιπίδια (-PO <sub>2</sub> <i>sym</i> $\nu$ /C-O $\nu$ )	Bocker et al., 2007
1195-1130(1165)	Λίπη (C-O $\nu$ ), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O $\nu$ ), -NH <sub>2</sub>	Chen et al., 1998, Bocker et al., 2007, Pappas et al., 2008
1260-1205(1240)	Λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα ( <i>asym</i> -PO <sub>2</sub> $\nu$ ), αμίδιο III (C-N $\nu$ , N-H $\nu$ , C=O-N $\delta$ , P=O $\nu$ ), αμίνες από ελεύθερα αμινοξέα (C-N $\nu$ )	Socrates 2001, Pappas et al., 2008, Pistorius 1995, Chen et al., 1998, Ellis et al., 2002, Bocker et al., 2007
1325-1295(1320)	Αμίδιο III (C-N $\nu$ , N-H $\delta$ , C=O-N $\delta$ )	Bocker et al., 2007

1390-1370(1380)	Αμινοξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες(δεσμός CH δ ή C-O ν) ή ομάδες αζώτου (- NO <sub>2</sub> sym ν)	Pappas et al., 2008, Pistorius 1995, Ellis et al., 200
1425-1400(1420)	Αμίδιο (C-N ν) ή λιπίδια (RCOO- sym ν, -CH <sub>2</sub> -COOR)	Ellis et al., 2004, Socrates 2001
1485-1425(1465)	Λιπίδια (CH <sub>3</sub> - asym, C-H asym δ, CH <sub>2</sub> , C-H δ) ή αμίνες (CH <sub>3</sub> asym), CH <sub>2</sub> δ	Socrates 2001, Chen et al., 1998, Bocker et al., 2007
1715-1570(1640)	νερό (H-O-H) και αμίδια I (80% C=O ν, 10% C-N ν, 10% N-H δ)	Socrates 2001, Wu et al., 2006
1770-1715(1745)	C=O εστέρες και οργανικά οξέα	Martin-del-Campo et al., 2007

### 3.5 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R)

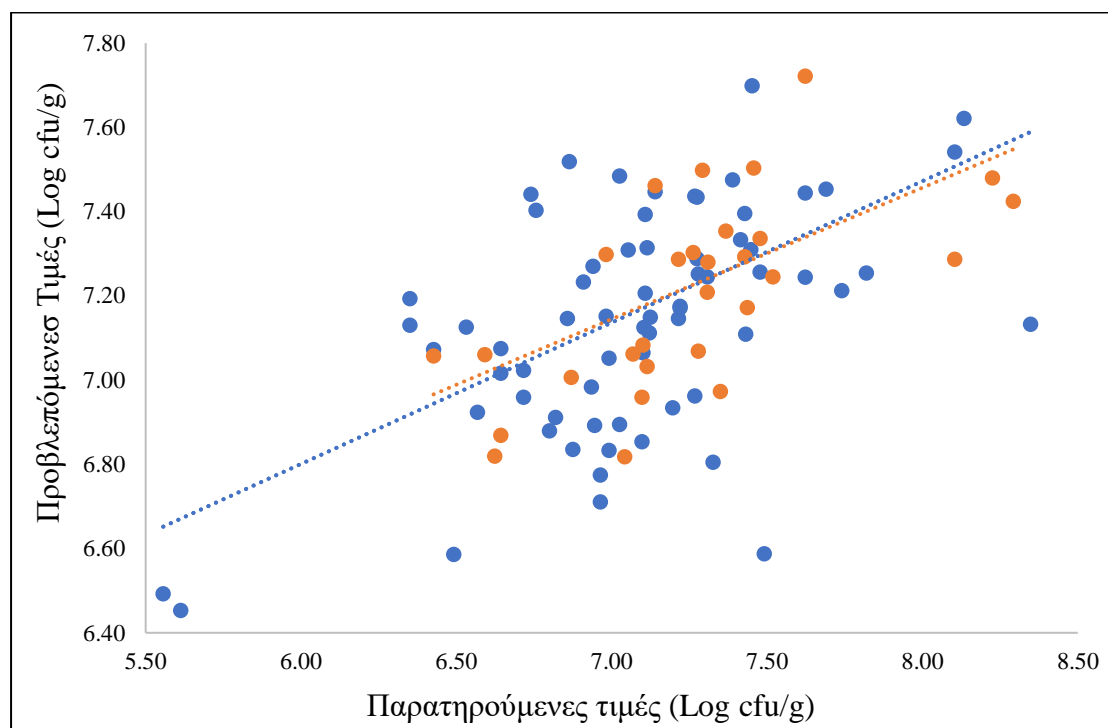
#### 3.5.1 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R) με χρήση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης(MSI)

Για την εκτίμηση του πληθυσμού της OMX κατά την συντήρηση των δειγμάτων της φέτας, κατασκευάστηκαν τέσσερα μοντέλα μέσω γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Τα μοντέλα αυτά κατασκευάστηκαν με δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης από την εφαρμογή του Videometer Lab και του Videometer Lite για τα δείγματα της άλμης και του κενού ξεχωριστά. Στον Πίνακα 3.5 παρατίθενται οι δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη την επικύρωση και την πρόβλεψη των μοντέλων σε περιβάλλον συντήρησης στην άλμη και σε κενό. Σε κάθε μοντέλο από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, το 70% χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και την επικύρωση, ενώ το 30% για την πρόβλεψη.

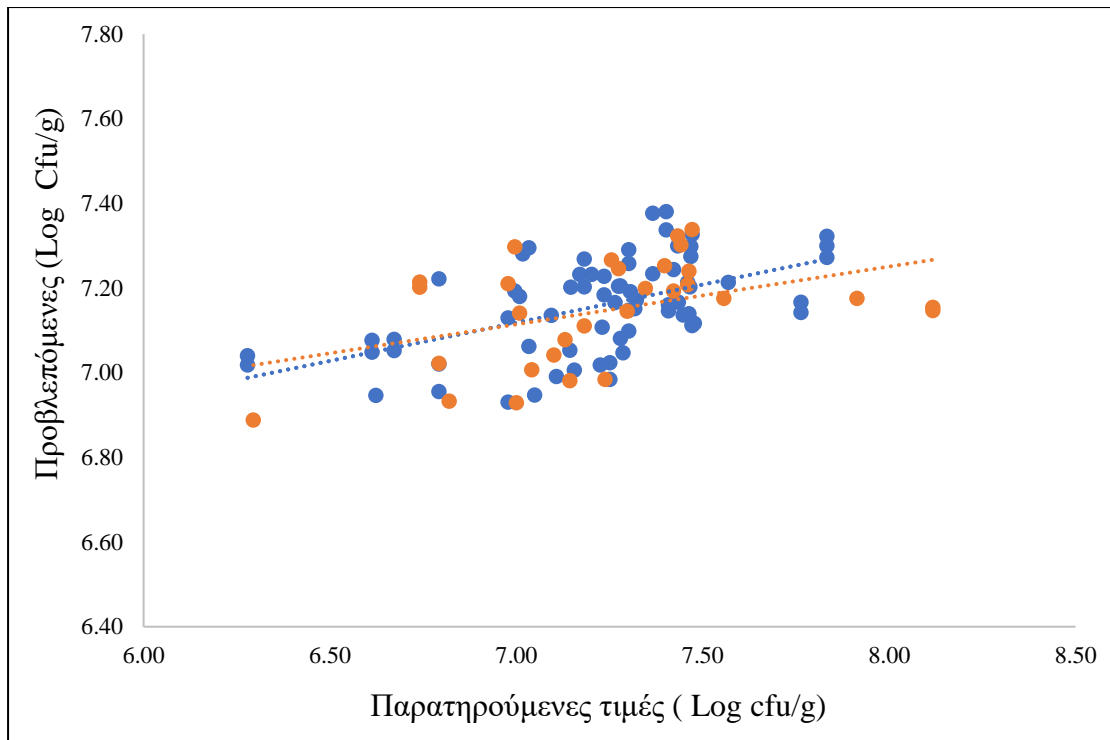
**Πίνακας 3.5:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του Videometer Lab και Videometer Lite στα δείγματα άλμης και κενού.

Όργανο	Συντήρηση	Δεδομένα	Slope	Offset	R <sup>2</sup>	RMSE
Videometer Lab	ΑΛΜΗ	Ανάπτυξη (n=162)	0.394	4.344	0.394	0.350
		Επικύρωση CV	0.312	4.962	0.292	0.358
		Πρόβλεψη (n=70)	0.336	4.787	<b>0.263</b>	<b>0.408</b>
	ΚΕΝΟ	Ανάπτυξη (n=161)	0.139	6.132	0.139	0.290
		Επικύρωση CV	0.136	6.159	0.117	0.364
		Πρόβλεψη (n=70)	0.180	5.855	<b>0.206</b>	<b>0.287</b>
Videometer Lite	ΑΛΜΗ	Ανάπτυξη (n=106)	0.139	6.284	0.139	0.350
		Επικύρωση CV	-0.029	7.471	-0.439	0.380
		Πρόβλεψη (n=46)	0.004	7.268	<b>-0.250</b>	<b>0.334</b>
	ΚΕΝΟ	Ανάπτυξη (n=106)	0.082	6.681	0.082	0.290
		Επικύρωση CV	0.030	7.058	-0.038	0.304
		Πρόβλεψη (n=46)	0.072	6.764	<b>0.048</b>	<b>0.276</b>

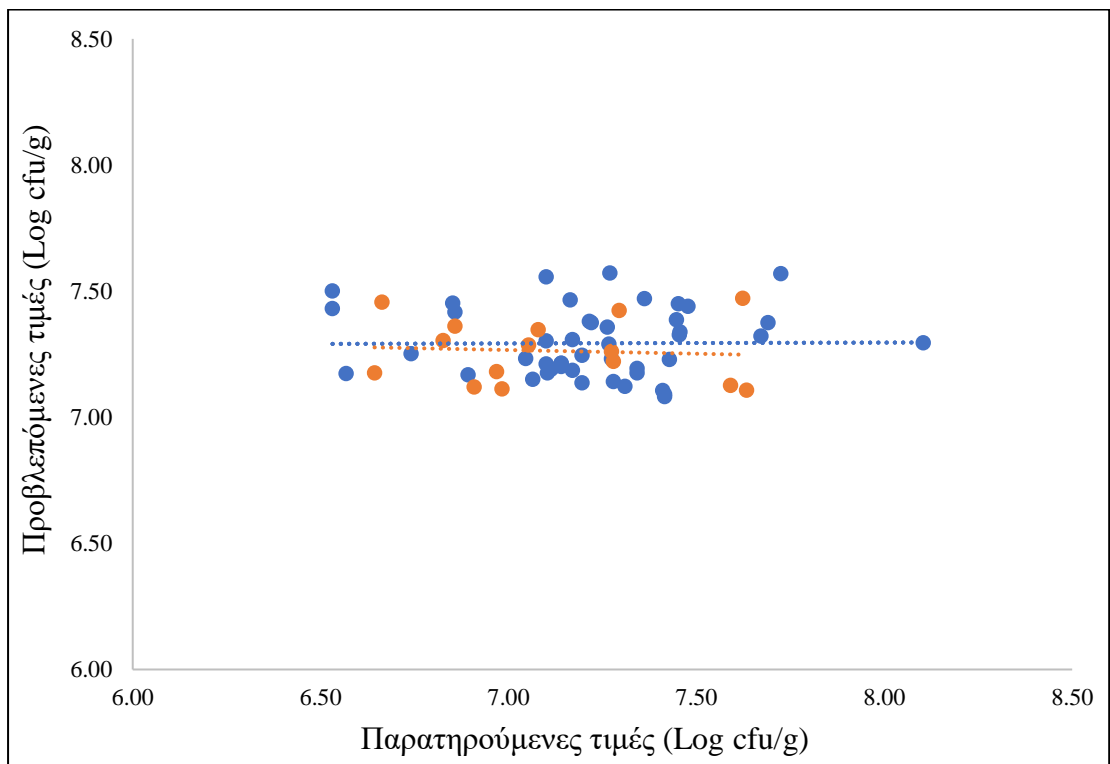
Όσον αφορά τα δεδομένα του Videometer Lab δεν παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση με τα μικροβιολογικά δεδομένα της OMX για καμία από τις δύο συνθήκες συντήρησης, καθώς για την πρόβλεψη των δειγμάτων της άλμης το  $R^2$  είναι 0.263 και το RMSE είναι 0.408, ενώ για την πρόβλεψη των δειγμάτων του κενού το  $R^2$  είναι 0.206 και το RMSE είναι 0.287. Αν και κανένα από τα δύο μοντέλα δεν ήταν ικανοποιητικό, ελάχιστα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το μοντέλο των δειγμάτων της άλμης. Παρομοίως, στα δεδομένα του Videometer Lite και στις δύο περιπτώσεις συντήρησης τα αποτελέσματα δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά ως προς την συσχέτιση με τα μικροβιολογικά δεδομένα καθώς στην περίπτωση της άλμης το  $R^2$  είναι -0.250 και το RMSE είναι 0.334, ενώ στην περίπτωση του κενού το  $R^2$  είναι 0.048 και το RMSE είναι 0.276. Στα διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών (**Διαγράμματα 3.13-3.16**) που ακολουθούν αποτυπώνονται τα προαναφερόμενα αποτελέσματα σε σχέση με την ευθεία  $y = ax + \beta$ , όπου  $a$ =κλίση (slope) και  $\beta$ =σταθερός όρος (offset).



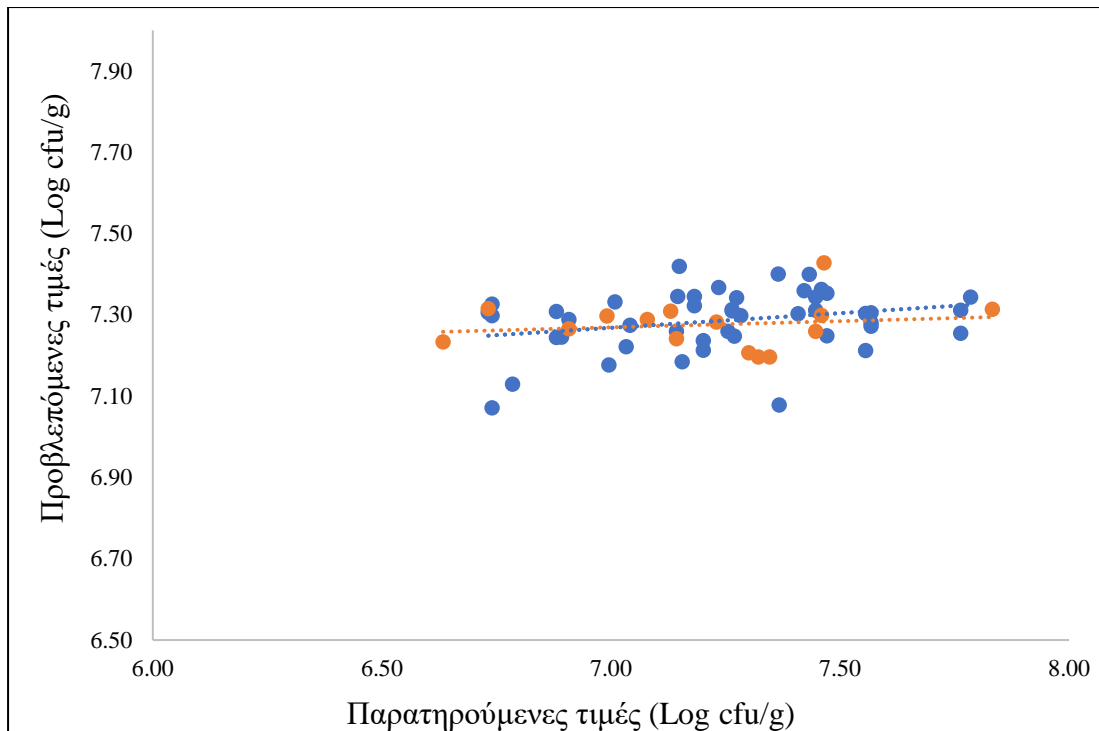
**Διάγραμμα 3.13:** Συσχέτιση των τιμών της πρόβλεψης (●) και των τιμών της επικύρωσης CV (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το Videometer Lab για τα δείγματα της άλμης.



**Διάγραμμα 3.14:** Συσχέτιση των τιμών της πρόβλεψης (●) και των τιμών της επικύρωσης CV (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το Videometer Lab για τα δείγματα του κενού.



**Διάγραμμα 3.15:** Συσχέτιση των τιμών της πρόβλεψης (●) και των τιμών της επικύρωσης CV (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το Videometer Lite για τα δείγματα της άλμης.



**Διάγραμμα 3.16:** Συσχέτιση των τιμών της πρόβλεψης (●) και των τιμών της επικύρωσης CV (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το Videometer Lite για τα δείγματα του κενού.

### 3.5.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Regression-PLS-R) με χρήση των δεδομένων της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

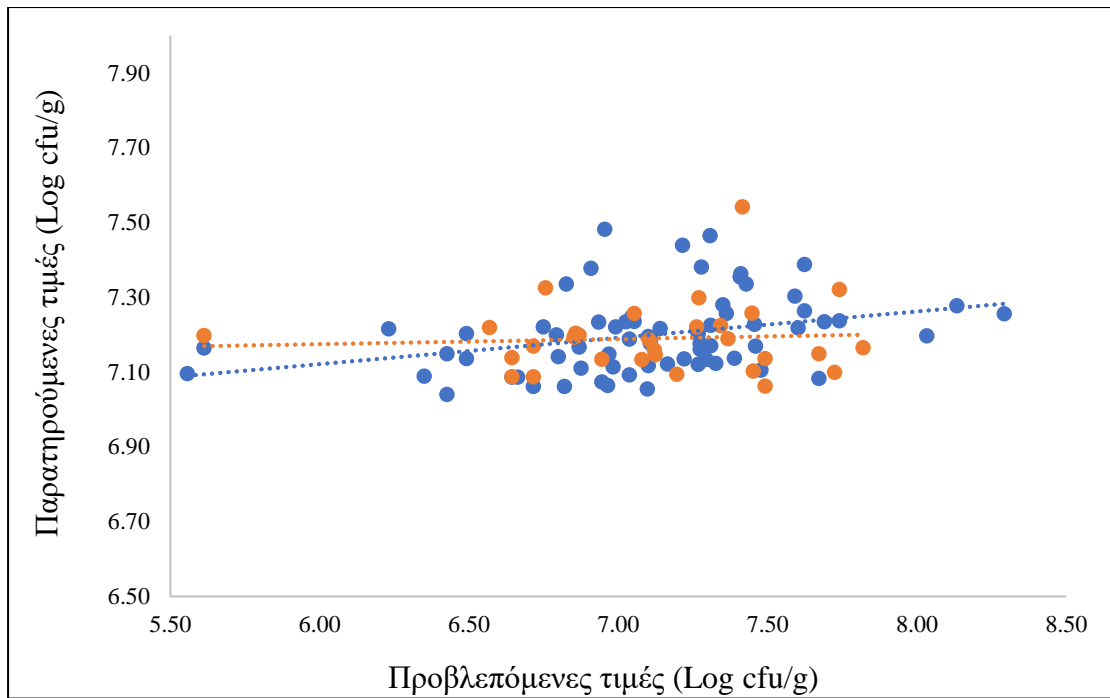
Για την εκτίμηση του πληθυσμού της OMX κατά την συντήρηση των δειγμάτων της φέτας, κατασκευάστηκαν δύο μοντέλα μέσω γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο PLS-R. Τα μοντέλα αυτά κατασκευάστηκαν με δεδομένα της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) για τα δείγματα της άλμης και του κενού ξεχωριστά. Στον **Πίνακα 3.6** παρουσιάζονται οι δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη των μοντέλων αυτών σε περιβάλλον συντήρησης στην άλμη και σε κενό. Σε κάθε μοντέλο από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, το 70% χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και την επικύρωση, ενώ το 30% για την πρόβλεψη.

**Πίνακας 3.6:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για τα δεδομένα του FTIR στα δείγματα άλμης και κενού.

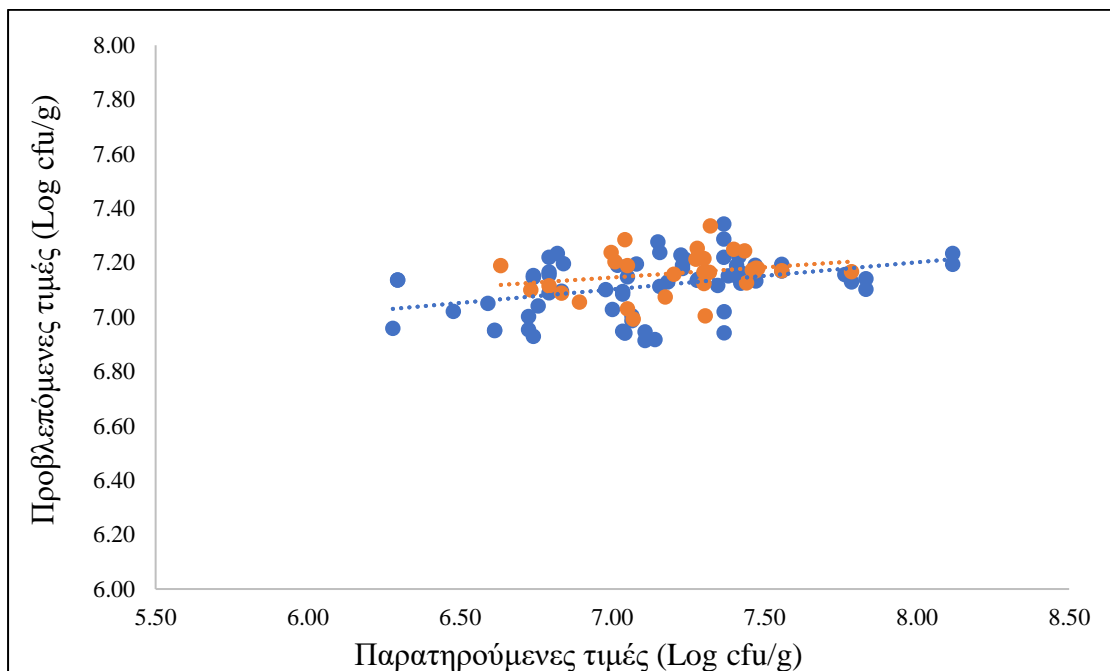
Όργανο	Συντήρηση	Δεδομένα	Slope	Offset	R <sup>2</sup>	RMSE
FTIR	ΑΛΜΗ	Ανάπτυξη (n= 161)	0.053	6.819	0.053	0.435
		Επικύρωση CV	0.014	7.092	-0.047	0.458
		Πρόβλεψη (n=70)	0.070	6.699	<b>0.056</b>	<b>0.460</b>
	ΚΕΝΟ	Ανάπτυξη (n= 161)	0.133	6.194	0.133	0.278
		Επικύρωση CV	0.075	6.624	0.023	0.261
		Πρόβλεψη (n=70)	0.099	6.405	<b>0.129</b>	<b>0.366</b>

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του FTIR, για καμία από της δύο συσκευασίες συντήρησης δεν παρουσιάστηκε ικανοποιητική συσχέτιση των φασματοσκοπικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα. Αυτό συμπεραίνεται καθώς οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης R<sup>2</sup> η και του RMSE για την πρόβλεψη δεν ήταν ικανοποιητικές, ούτε στην περίπτωση της άλμης (R<sup>2</sup>=0.056, RMSE=0.460) αλλά ούτε και στην περίπτωση του κενού (R<sup>2</sup>=0.129, RMSE=0.366). Ωστόσο ελάχιστα καλύτερα αποτελέσματα συσχέτισης με τα μικροβιολογικά δεδομένα, έδειξαν τα αποτελέσματα των δειγμάτων του κενού. Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών (**Διαγράμματα 3.17-3.18**) και επιβεβαιώνουν τους ισχυρισμούς αυτούς σε σχέση με την ευθεία  $y = \alpha x + \beta$ , όπου  $\alpha$ =κλίση και  $\beta$ =σταθερός όρος.





**Διάγραμμα 3.17:** Συσχέτιση των τιμών της πρόβλεψης (●) και των τιμών της επικύρωσης CV (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το FTIR για τα δείγματα της άλμης.



**Διάγραμμα 3.18:** Συσχέτιση των τιμών της πρόβλεψης (●) και των τιμών της επικύρωσης CV (●) για την εκτίμηση της OMX με δεδομένα από το FTIR για τα δείγματα του κενού.

Δεδομένου ότι στα **διαγράμματα 3.13 - 3.18** παρατηρήθηκαν αποκλίσεις από την ευθεία  $y = x$  κατά την πρόβλεψη και την επικύρωση όλων των οργάνων και όλων των δειγμάτων, συμπεραίνεται ότι τα μοντέλα δεν ήταν αποτελεσματικά για την πρόβλεψη της αλλοίωσης.

### **3.6. Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)**

#### **3.6.1 Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA) με χρήση των δεδομένων της πολυφασματικής απεικόνισης(MSI)**

Η εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως δίνει την δυνατότητα διαχωρισμού των δειγμάτων σε διακριτά υποσύνολα-κλάσεις. Στην περίπτωση αυτή ο διαχωρισμός σε δύο κλάσεις αφορούσε την απουσία (Κλάση 1) ή την παρουσία (Κλάση 2) της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα της φέτας και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται αριθμητικά (% ευαισθησία, % ακρίβεια και % συνολική ακρίβεια) στους παρακάτω **Πίνακες (3.7-3.10)**. Συνολικά κατασκευάστηκαν τέσσερα μοντέλα, όπου τα δύο δημιουργήθηκαν με δεδομένα του Videometer Lab (**Πίνακας 3.7-3.8**) για τα δείγματα της άλμης και του κενού ξεχωριστά, ενώ τα άλλα δύο με δεδομένα του Videometer Lite (**Πίνακας 3.9-3.10**), ένα για την κάθε συνθήκη συντήρησης. Σε κάθε μοντέλο από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, το 70% χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και την επικύρωση, ενώ το 30% για την πρόβλεψη. Στους παρακάτω **Πίνακες (3.7-3.10)** παρατίθεται η απόδοση του εκάστοτε μοντέλου.

**Πίνακας 3.7:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), στα δείγματα της φέτας μετά από συντήρηση στην άλμη, ως προς τις δύο κλάσεις (Κλάση 1= Απουσία *L. monocytogenes*, Κλάση 2=Παρουσία *L. monocytogenes*). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση συλλέχθηκαν από το Videometer Lab.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία %	
		Απουσία	Παρουσία			
ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΛΑΣΗΣ	Απουσία	19	13	32	59.37	
	Παρουσία	23	15	38	39.47	
	Δείγματα ανά στήλη	42	28	70		
	Ακρίβεια %	45.24	53.57			
	Συνολική ακρίβεια%					48.57

**Πίνακας 3.8:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA), στα δείγματα της φέτας μετά από συντήρηση σε περιβάλλον κενού, ως προς τις δύο κλάσεις (Κλάση 1 = Απουσία *L. monocytogenes*, Κλάση 2 = Παρουσία *L. monocytogenes*). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση συλλέχθηκαν από το Videometer Lab.

ΠΡΟΒΛΕΨΗ	ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Δείγματα ανά σειρά	Εναισθησία %
		Απουσία	Παρουσία		
		Απουσία	19		
Παρουσία	29	9	38	23.68	
	Δείγματα ανά στήλη	48	22		
	Ακρίβεια %	39.58	40.90		
	Συνολική ακρίβεια %				40.00

**Πίνακας 3.9:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA), στα δείγματα της φέτας μετά από συντήρηση σε άλμη, ως προς τις δύο κλάσεις (Κλάση 1 = Απουσία *L. monocytogenes*, Κλάση 2 = Παρουσία *L. monocytogenes*). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση συλλέχθηκαν από το Videometer Lite.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία %	
		Απουσία	Παρουσία			
ΠΡΟΒΛΕΨΗ	ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	Απουσία	8	11	19	42.10
		Παρουσία	10	17	27	62.96
		Δείγματα ανά στήλη	18	28		
		Ακρίβεια %	44.44	60.71		
		Συνολική ακρίβεια %				54.35

**Πίνακας 3.10:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA), στα δείγματα της φέτας μετά από συντήρηση σε περιβάλλον κενού, ως προς τις δύο κλάσεις (Κλάση 1 = Απουσία *L. monocytogenes*, Κλάση 2 = Παρουσία *L. monocytogenes*). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση συλλέχθηκαν από το Videometer Lite.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία %	
		Απουσία	Παρουσία			
ΠΡΟΒΛΕΨΗ	ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	Απουσία	13	7	20	65
		Παρουσία	14	12	26	46.15
		Δείγματα ανά στήλη	27	19		
		Ακρίβεια %	48.15	63.16		
		Συνολική ακρίβεια %				54.35

Τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν με δεδομένα του Videometer Lab (Πίνακας 3.7-3.8), για τον διαχωρισμό των δειγμάτων ως προς την απουσία ή την παρουσία της *Listeria monocytogenes*, δεν εμφάνισαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ταξινόμησής τους στις δύο κλάσεις, σε καμία από τις δύο συνθήκες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Αυτό διαπιστώνεται καθώς οι τιμές της συνολικής ακρίβειας % τόσο στα δείγματα της άλμης (48.57%) όσο και του κενού (40.00%) ήταν χαμηλές. Επιπλέον, δεδομένου ότι και οι τιμές της ευαισθησίας % ήταν χαμηλές για τα δείγματα της άλμης (39.47%) και του κενού (23.68%), υποδεικνύεται η υψηλή επικινδυνότητα του μοντέλου να προβλέψει λανθασμένα δείγματα με παρουσία *Listeria monocytogenes*, ως δείγματα με απουσία *Listeria monocytogenes*. Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισαν και τα μοντέλα στην περίπτωση του Videometer Lite (Πίνακας 3.9-3.10), καθώς παρουσίασαν χαμηλές τιμές συνολικής ακρίβειας % για τα δείγματα των δύο συσκευασιών (54.35%) αλλά και χαμηλές τιμές ευαισθησίας % για τα δείγματα της άλμης (62.96%) και του κενού (46.15), υποδηλώνοντας την υψηλή επικινδυνότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Συγκρίνοντας τα μοντέλα των δύο οργάνων καλύτερα αποτελέσματα φαίνεται να έχουν αυτά του Videometer Lite, ωστόσο το σύνολο των δεδομένων που συλλέχθηκαν από αυτό ήταν μικρότερο επομένως η σύγκριση δεν μπορεί να είναι αντικειμενική. Συμπερασματικά, κανένα από τα PLS-DA δεν κατάφερε να κατηγοριοποιήσει επιτυχώς τα δείγματα ως προς τις δύο κλάσεις (απουσία ή παρουσία της *Listeria monocytogenes*).

### **3.6.2 Αποτελέσματα διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA) με χρήση των δεδομένων της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)**

Στην περίπτωση αυτή πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από το FTIR. Ο διαχωρισμός σε δύο κλάσεις αφορούσε την απουσία (Κλάση 1) ή την παρουσία (Κλάση 2) της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα της φέτας και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται αριθμητικά (% ευαισθησία, % ακρίβεια και % συνολική ακρίβεια) στους παρακάτω **Πίνακες (3.11-3.12)**. Συνολικά κατασκευάστηκαν δύο μοντέλα, ένα για κάθε συνθήκη συντήρησης, σε κάθε ένα από τα οποία το 70% των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και επικύρωση, ενώ το 30% για την πρόβλεψη. Στους παρακάτω **Πίνακες (3.11-3.12)** παρατίθεται η πρόβλεψη του εκάστοτε μοντέλου.

**Πίνακας 3.11:** Συγκενρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), στα δείγματα της φέτας μετά από συντήρηση σε άλμη, ως προς την ως προς τις δύο κλάσεις (Κλάση 1 = Απουσία *L. monocytogenes*, Κλάση 2 = Παρουσία *L. monocytogenes*). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση συλλέχθηκαν από το FTIR.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία %	
		Απουσία	Παρουσία			
<b>ΠΡΟΒΛΕΨΗ</b>	<b>ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ</b>	<b>Απουσία</b>	17	19	36	47.22
		<b>Παρουσία</b>	11	23	34	32.35
		<b>Δείγματα ανά στήλη</b>	28	42		
		<b>Ακρίβεια %</b>	60.71	54.76		
		<b>Συνολική ακρίβεια %</b>				<b>57.14</b>

**Πίνακας 3.12:** Συγκενρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(PLS-DA), στα δείγματα της φέτας μετά από συντήρηση σε περιβάλλον κενού, ως προς τις δύο κλάσεις (Κλάση 1 = Απουσία *L. monocytogenes*, Κλάση 2 = Παρουσία *L. monocytogenes*). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση συλλέχθηκαν από το FTIR.

		ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΚΛΑΣΗ		Δείγματα ανά σειρά	Ευαισθησία %	
		Απουσία	Παρουσία			
<b>ΠΡΟΒΛΕΨΗ</b>	<b>ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΚΛΑΣΗ</b>	<b>Απουσία</b>	32	7	39	82.05
		<b>Παρουσία</b>	5	26	31	83.87
		<b>Δείγματα ανά στήλη</b>	37	33		
		<b>Ακρίβεια %</b>	86.49	78.79		
		<b>Συνολική ακρίβεια %</b>				<b>82.86</b>

Τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν, με δεδομένα του FTIR, για την διαχωρισμό των δειγμάτων της άλμης (Πίνακας 3.11) ως προς την απουσία ή την παρουσία της *Listeria monocytogenes* δεν εμφάνισαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ταξινόμησής τους στις δύο κλάσεις, δεδομένου ότι η τιμή της συνολικής ακρίβειας % ήταν αρκετά χαμηλή (57.14%). Επιπλέον η τιμή της συνολικής ακρίβειας % ήταν χαμηλή (32.35%) υποδηλώνοντας την υψηλή επικινδυνότητα του μοντέλου να προβλέψει λανθασμένα δείγματα με παρουσία *Listeria monocytogenes*, ως δείγματα με απουσία *Listeria monocytogenes*. Αντίθετα στην περίπτωση των δειγμάτων του κενού (Πίνακας 3.12), τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ικανοποιητικά, καθώς η τιμή της συνολικής ακρίβειας ήταν υψηλή (82.86%), υποδεικνύοντας την ικανότητα του συγκεκριμένου μοντέλου να διαχωρίζει σε ένα καλό βαθμό τα δείγματα ως προς τις δύο κλάσεις (απουσία ή παρουσία της *Listeria monocytogenes*). Επιπρόσθετα ικανοποιητικά ήταν και τα αποτελέσματα της συνολικής ευαισθησίας του μοντέλου (83.87%), υποδηλώνοντας την χαμηλή επικινδυνότητα της πρόβλεψης του μοντέλου. Συγκριτικά με τα αποτελέσματα των δύο άλλων οργάνων καλύτερα ήταν αυτά των μοντέλων του FTIR και πιο συγκεκριμένα κυρίως η περίπτωση των δειγμάτων του κενού.



## 4. Συζήτηση

Η αυξημένη εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών σε πληθώρα τροφίμων παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων των τυριών, καθώς και οι σύγχρονες απαιτήσεις των καταναλωτών για πιο φυσικά και ωφέλιμα για την υγεία συντηρητικά οδήγησε στην χρήση ολοένα και περισσότερων βιολογικών συντηρητικών για την βελτίωση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων (Ibrahim et al., 2021). Η χρήση βιοπροστατευτικών καλλιέργειών ή των μεταβολιτών τους, μικροβιακών δηλαδή καλλιέργειών που έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα αυξάνουν την διάρκεια συντήρησης του τροφίμου και βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο συντήρησης (Lucke, 1994). Τα LAB αποτελούν ιδανικές βιοπροστατευτικές καλλιέργειες καθώς συμβάλλουν στις ζυμώσεις πολλών τροφίμων παράγοντας γαλακτικό οξύ, ενώ θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση (GRAS), με ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία (Egan et al., 2016). Επιπλέον, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών είτε μέσω του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά είτε μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών όπως οργανικά οξέα, ακετοΐνη, διακετύλιο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, βακτηριοσύνες κ.α. (Stiles et al., 1996). Έτσι τα LAB, εκτός από εκκινητήριες καλλιέργειες κατά την ζύμωση, έχουν χρησιμοποιηθεί και ως μη εκκινητήριες καλλιέργειες (NSLAB) για την ενίσχυση της ασφάλειας και της συντήρησης των τυριών και άλλων προϊόντων (Vera-Santander et al., 2024). Εκτός από την προσθήκη των ίδιων των μικροοργανισμών στα τρόφιμα εναλλακτικά, πολλά υποσχόμενη είναι η προσθήκη του υπερκείμενου διαλύματος των μικροοργανισμών αυτών, απαλλαγμένο από τα κύτταρα του μικροοργανισμού (CFS: Cells - Free Supernatant), καθώς έχει δείξει εξίσου ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι ανεπιθύμητων μικροοργανισμών χωρίς να επιδρά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου και βελτιώνοντας την υγεία του καταναλωτή (Barros et al., 2020; Moradi et al., 2020). Η αντιμικροβιακή δράση των CFSs οφείλεται κυρίως στην παραγωγή του γαλακτικού και του οξικού οξέος, που αποτελούν προϊόντα του βασικού μεταβολισμού των LAB, με το πρώτο να δρα σημαντικά κατά των βακτηρίων, ενώ το δεύτερο έναντι βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών (Moradi et al., 2020). Τα οργανικά οξέα εκτός από τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες διακρίνονται για την συμβολή τους στην χαρακτηριστική γεύση και υφή των γαλακτοκομικών προϊόντων (Jo et al., 2028; Pisano et al., 2020). Με βάση τα

παραπάνω, οι καλλιέργειες των LAB καθώς και οι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες που παράγουν παρουσιάζουν πολλές προοπτικές κατά την εφαρμογή τους στα τρόφιμα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιοπροστατευτική επίδραση του υπερκείμενου διαλύματος (CFS: Cell Free Supernatant) των οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactiplantibacillus pentosus* L33 και *Lactiplantibacillus plantarum* L125, έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (FMCC-B127 και FMCC-B133) καθώς και η επίδρασή του στην μικροβιολογική και οργανοληπτική ποιότητα της φέτας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν για περίπου 80 ημέρες σε περιβάλλον άλμης και κενού σε θερμοκρασία 4 °C και 10 °C. Όσον αφορά τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό), η OMX παρέμεινε σχετικά σταθερή, ενώ κυρίαρχο μικροοργανισμό στην φέτα αποτέλεσαν τα LAB και οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι/κόκκοι διατηρώντας τους υψηλότερους πληθυσμούς καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης (> 6 log CFU/g). Ο πληθυσμός των LAB παρέμεινε σταθερός ενώ οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι/κόκκοι παρουσίασαν μείωση και στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C). Στην περίπτωση των μικροοργανισμών αυτών δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δειγμάτων του Control και του Supernatant σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Οι ζύμες αυξήθηκαν εμφανίζοντας χαμηλότερο πληθυσμό στα δείγματα του Supernatant σε σχέση με αυτά του Control και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης (4 °C/10 °C). Σχετικά με την μικροβιακή χλωρίδα της φέτας σε παρόμοια έρευνα των Papadopoulou et al. (2018) κατά την συντήρηση (4 °C και 10 °C) στην φέτα, τα αποτελέσματα σχετικά με συμπεριφορά των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων (μείωση) και των ζυμών (αύξηση) ήταν σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, ωστόσο διέφεραν ως προς την συμπεριφορά των LAB τα οποία παρουσίασαν μικρή μείωση. Επιπλέον στην έρευνα αυτή, ο πληθυσμός των LAB στα δείγματα που είχε προστεθεί η βιοπροστατευτική καλλιέργεια (*Lb. plantarum* T571), ήταν χαμηλότερος σε σχέση με αυτά του Control γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, μεταξύ των δειγμάτων του Supernatant και του Control. Και οι δύο έρευνες ωστόσο συμφώνησαν ότι κυρίαρχο μικροοργανισμό στην φέτα κατά την συντήρηση των δειγμάτων σε όλες τις περιπτώσεων αποτέλεσαν τα LAB και οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι/κόκκοι. Σε άλλη έρευνα των Kamarinou et al. (2023) κατά την συντήρηση της φέτας στους 4 °C παρατηρήθηκε μείωση στον πληθυσμό των LAB και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων, σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτου

μεταχείρισης (απουσία ή παρουσία βιοπροστατευτικών καλλιεργείων), ενώ οι ζύμες παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα κάτω του ορίου ανίχνευσης. Στην μελέτη των Terrou et al. (2018a), παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού των LAB και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων/κόκκων κατά την συντήρηση στους 4 °C σε όλες τις μεταχειρίσεις (απουσία ή παρουσία βιοπροστατευτικών καλλιεργείων). Ωστόσο υψηλότερους πληθυσμούς LAB εμφάνισαν οι μεταχειρίσεις των βιοπροστατευτικών καλλιεργείων συγκριτικά με του Control, ενώ οι ζύμες παρουσίασαν κατακόρυφη πτώση. Όλες οι παραπάνω έρευνες σχολιάζουν τις μεταβολές της μικροβιακής χλωρίδας της φέτας και άλλων τυριών κατά την συντήρησή τους, με ή χωρίς την προσθήκη βιοπροστατευτικών καλλιεργείων κατά την παρασκευή τους, ωστόσο δεν υπάρχει σχετική έρευνα που να αναφέρεται στην επίδραση του Supernatant των καλλιεργείων αυτών.

Όσον αφορά την *Listeria monocytogenes*, μειώθηκε σταδιακά, ενώ παρουσίασε χαμηλότερους πληθυσμούς στα δείγματα του Supernatant συγκριτικά με του Control και στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Σχετικά με τις ζύμες/μύκητες αν και παρουσίασαν σταδιακή αύξηση στα δείγματα όλων των περιπτώσεων, όπως και στην περίπτωση του παθογόνου οι πληθυσμοί τους ήταν χαμηλότεροι στα δείγματα του Supernatant. Τα CFSs όπως έχει αναφερθεί, φέρουν πλήθος αντιμικροβιακών ουσιών όπως οργανικά οξέα, αλκοόλες, ένζυμα και βακτηριοσύνες, που δρουν έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Listeria monocytogenes* και αλλοιογόνων όπως οι ζύμες (Moradi et al., 2020). Στην έρευνα των Vera-Santander et al. (2024) αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή και φυσικοχημική επίδραση των CFSs του *Lactobacillus casei* 21/1, μετά από ανάπτυξή του σε δύο υποστρώματα (MRS, WB), σε φρέσκο τυρί Μεξικάνικου τύπου μετά από τον εμβολιασμό του με *Listeria monocytogenes*. Τα αποτελέσματα μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 4 °C έδειξαν ότι ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε αισθητά στα δείγματα των CFSs, αποδίδοντας το γεγονός αυτό στην παρουσία οργανικών οξέων. Προηγουμένως οι Dal Bello et al. (2012) μελέτησαν την επίδραση των βακτηριοσινών, παραγόμενων από στελέχη του *Lactococcus lactis* κατά την παρασκευή τυριού cottage, έναντι της *Listeria monocytogenes*. Και πάλι τα CFSs όλων των στελεχών που έφεραν διαφορετικές βακτηριοσύνες κατάφεραν να μειώσουν αποτελεσματικά το μικροβιολογικό φορτίο του παθογόνου. Τέλος παρόμοια αποτελέσματα είχε και η μελέτη των Da Costa et al. (2018), κατά την οποία CFSs από δεκαέξι στελέχη LAB προστέθηκαν σε φρέσκο τυρί, τα οποία είχαν εμβολιαστεί προηγουμένως με *Listeria*

*monocytogenes*. Τα στελέχη *L. plantarum* 49 και *L. paracasei* 108 κατάφεραν να μειώσουν τον πληθυσμό του παθογόνου από την τρίτη μέρα συντήρησης στην ψύξη, γεγονός που συνδέθηκε με την αυξημένη παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος. Η πλειοψηφία ωστόσο των ερευνών εστιάζουν στην προσθήκη των ίδιων των καλλιιεργειών (εκκινητήριες ή συμπληρωματικές) των LAB στα τυριά που έχουν εμβολιαστεί με *Listeria monocytogenes*, όπως η μελέτη των Papadopoulou και Chorianoopoulos (2016) με την προσθήκη του *Lb. plantarum* T571 σε φρέσκο τυρί, των Papadopoulou et al. (2018) με την προσθήκη του *Lactobacillus plantarum* T571 στην φέτα και του Prezzi et al. (2020) με την προσθήκη του *Lactobacillus rhamnosus* GG στο φρέσκο Μεξικανικού τύπου τυρί Minas. Σε όλες τις προαναφερόμενες έρευνες η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* παρεμποδίστηκε επιτυχώς. Στην έρευνα των Mirkovic et al. (2020), η προσθήκη στελέχους του *Lactococcus lactis* σε φρέσκο τυρί τύπου Quark, όχι μόνο μείωσε τον πληθυσμό της *Listeria monocytogenes*, αλλά περιόρισε και την ανάπτυξη των ζυμών και των μυκήτων κατά την συντήρηση στους 4 °C για 21 μέρες.

Όσον αφορά τις τιμές του pH και της  $a_w$  δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μεταβολή καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό), ενώ η προσθήκη του Supernatant δεν φάνηκε να επηρεάζει τα αποτελέσματα. Το pH παρέμεινε σταθερό σε φυσιολογικά όρια (4.4-4.6) για την φέτα (Abd El Salam and Alichanidis, 2004) ενώ η  $a_w$  παρέμεινε σχετικά χαμηλή με τιμές 0.96-0.97. Στην έρευνα των Vera-Santander et al. (2024) σε φρέσκο τυρί, το pH μειώθηκε μετά την προσθήκη του CFS του *Lactobacillus casei* 21/1 αλλά παρέμεινε σχετικά σταθερό κατά την συντήρηση (4 °C, 7 ημέρες). Ωστόσο στα δείγματα του Control δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή. Η μείωση αυτή του pH συνδέθηκε με την προσθήκη οργανικών οξέων μέσω του CFS, το οποίο όμως δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα έρευνα. Σε άλλη έρευνα για την φέτα, οι Papadopoulou et al. (2018) παρατήρησαν επίσης μείωση του pH στα δείγματα των προβιοτικών καλλιιεργειών φτάνοντας την τιμή 4.1, ενώ στα δείγματα Control οι τιμές διακυμάνθηκαν μεταξύ 4.5-4.7, κατά την συντήρηση στους 4 °C. Ωστόσο στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 12 °C παρουσιάστηκε αύξηση και στις δύο μεταχειρίσεις. Στην μελέτη των Kamarinou et al. (2023) όλες οι μεταχειρίσεις της φέτας (12 μεταχειρίσεις με συμπληρωματικές καλλιέργειες LAB και 1 μεταχείριση Control)

παρουσίασαν μείωση στις τιμές του pH κατά την συντήρησή τους στους 4 °C φτάνοντας τιμές 4.1-4.4 ανάλογα την μεταχείριση.

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας, επηρεάζονται άμεσα από την μικροβιακή γλωρίδα που επικρατεί κατά την παραγωγή, την ωρίμανσή και την συντήρησή της (Papadimitriou et al., 2022). Στην φέτα επικρατέστεροι μικροοργανισμοί μετά το τέλος της ωρίμανσης είναι τα NSLAB καθώς και οι ζύμες (Bintsis and Papadimas, 2002). Οι ζύμες συμβάλλουν αποτελεσματικά στην ανάπτυξη της γεύσης και του αρώματος της φέτας, ωστόσο σε υψηλούς πληθυσμούς μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην ποιότητα και κατά συνέπεια στον χρόνο ζωής του προϊόντος (Bintsis and Papadimas, 2002). Στην παρούσα μελέτη η σταδιακή αύξηση του φορτίου των ζυμών κατά την συντήρηση των δειγμάτων και στις δύο θερμοκρασίες (4 °C/10 °C) και συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό) προκάλεσε την μερική αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους γεγονός που οδήγησε στην οριακή αποδοχή τους για κατανάλωση (οριακά φρέσκο). Είναι γεγονός ότι οι ζύμες όταν αυξάνονται με ραγδαίο ρυθμό στα τυριά και πιο συγκεκριμένα στα λευκά τυριά άλμης, επηρεάζουν την ποιότητά τους, μέσω της παραγωγής μεταβολιτών όπως CO<sub>2</sub>, λιπαρά οξέα, αμινοξέα, αρωματικές ενώσεις κτλ., που έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών, το μαλάκωμα της υφής τους, την αλλαγή του χρώματός τους κ.α. (Geronikou et al., 2020). Ωστόσο στα δείγματα του Supernatant παρατηρήθηκε αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος λόγω της μερικής αναχαίτησης της ανάπτυξης των ζυμών. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της άλμης η αλλοίωση εμφανίστηκε 10-15 ημέρες αργότερα στα δείγματα του Supernatant σε σχέση με αυτά του Control, ενώ στα δείγματα του κενού των 10 °C, 16 ημέρες αργότερα όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Για την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τυριών γίνεται συχνά έρευνα για την χρήση συμπληρωματικών καλλιεργειών βακτηρίων και των μεταβολιτών τους, όπως οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες (Sarantinopoulos et al., 2002; Bintsis and Robinson, 2004). Οι μικροοργανισμοί αυτοί κατά την ωρίμανση και συντήρησή του τυριού, απελευθερώνουν ένζυμα, τα οποία επιδρούν στις τεχνολογικές, θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητές του (Escobar-Zepeda et al., 2016; Fox et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσθήκη του υπερκείμενου διαλύματος (CFS) δύο βιοπροστατευτικών στελεχών του γένους *Lactobacillus*, με ψεκασμό σε ήδη ωριμασμένα φέτα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης,

στην περίπτωση της άλμης τα δείγματα του Supernatant είχαν καλύτερη βαθμολογία σε σχέση με τα δείγματα του Control, καθώς η εμφάνιση της αλλοίωσης παρατηρήθηκε κάποιες μέρες αργότερα στα δείγματα αυτά. Όσον αφορά τα δείγματα του κενού, παρατηρήθηκε το ίδιο φαινόμενο, κυρίως στην συντήρηση στους 10 °C. Αν και δεν υπάρχουν σχετικές έρευνες όσον αφορά την επίδραση των CFSs στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών, η προσθήκη των ίδιων των καλλιιεργειών των LAB ως εκκινητήριες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες, φαίνεται να έχει θετική επίδραση. Όσον αφορά τη φέτα και των τυριών τύπου φέτας, η έρευνα των Kamarinou et al. (2023) έδειξε ότι μετά από προσθήκη διαφόρων συνδυασμών συμπληρωματικών καλλιιεργειών LAB, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας σε πολλές περιπτώσεις ενισχύθηκαν χωρίς να μεταβληθεί ο παραδοσιακός χαρακτήρας του προϊόντος. Στην μελέτη των Manolaki et al. (2006) τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού χαμηλού σε λιπαρά βελτιώθηκαν με την προσθήκη συμπληρωματικών καλλιιεργειών του γένους *Lactococcus*, λόγω της ενίσχυσης της παραγωγής οργανικών οξέων. Οι Papadopoulou et al. (2018) απέδειξαν επίσης ότι η προσθήκη του *Lb. plantarum* T571 ως συμπληρωματική καλλιέργεια κατά την παραγωγή της φέτας, δημιούργησε ένα προϊόν υψηλής ποιότητας χωρίς ανεπιθύμητες οργανοληπτικές μεταβολές. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα και άλλων ερευνών σε τυριά τύπου φέτας (Dimitrelou et al., 2014; Matzourani et al., 2018). Σε άλλα τυριά τα αποτελέσματα έδειξαν εξίσου ικανοποιητική βελτίωση της οργανοληπτική τους ποιότητας. Συγκεκριμένα στην μελέτη των Bancalari et al. (2020), η προσθήκη συμπληρωματικής καλλιέργειας του *Lacticaseibacillus paracasei* 4341 σε παραδοσιακό ημίσκληρο Ιταλικό τυρί, συνέβαλε στην ανάπτυξη βελτιωμένου αρώματος, χρώματος, δομής και γενικότερα αισθητηριακής εικόνας γεγονός που διαφοροποίησε τα δείγματα αυτά σε σχέση με τα δείγματα του Control.

Για τον προσδιορισμό της μικροβιακής αλλοίωσης και την ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στα δείγματα της φέτας, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και της φασματοσκοπία υπεράθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Και στις δύο μεθόδους πραγματοποιήθηκε συλλογή των φάσματα των δειγμάτων της φέτας στην αρχή (φρέσκα) και στο τέλος (αλλοιωμένα 4 °C/ αλλοιωμένα 10 °C) της συντήρησης για κάθε συσκευασία ξεχωριστά (Άλμη/Κενό) και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Σχετικά με τα οπτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI),

παρουσιάστηκε διαφορά μεταξύ των φασμάτων των φρέσκων και των αλλοιωμένων ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) δειγμάτων. Στην περίπτωση του Videometer Lab τα φάσματα ανάκλασης των αλλοιωμένων δειγμάτων των δύο θερμοκρασιών ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ήταν υψηλότερα από αυτά των φρέσκων και για τις δύο συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Τα φάσματα του Videometer Lite εμφάνισαν διακύμανση στα αποτελέσματά, ενώ διέφεραν μεταξύ των δύο συσκευασιών συντήρησης (Άλμη/Κενό). Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν σχετικές έρευνες στην φέτα και γενικότερα στα τυριά σχετικά με την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης κατά την συντήρηση, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί κάποια σύγκριση. Ωστόσο η εφαρμογή της σε προϊόντα ζωικής προέλευσης έχει αποδειχθεί αποτελεσματική όσον αφορά την ανίχνευση της αλλοίωσης σε συνδυασμό πάντα με την στατιστική ανάλυση των δεδομένων (Dising et al., 2012; Fengou et al., 2019; Panagou et al., 2014; Spyrelli et al., 2020 κ.α.). Μετά από οπτική παρατήρηση των φασμάτων του FTIR ( $900\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ ) (**Διαγράμματα 3.9-3.10**) για τις δύο συσκευασίες συντήρησης (Άλμη/Κενό), διαπιστώθηκε διαφορά μεταξύ των φασμάτων των φρέσκων και των αλλοιωμένων δειγμάτων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι οι απορροφήσεις των αλλοιωμένων δειγμάτων και στις δύο θερμοκρασίες ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ήταν χαμηλότερες από αυτές των φρέσκων στο μεγαλύτερο μέρος του φάσματος και κυρίως στις κορυφές στα  $1100$ ,  $1165$ ,  $1240$ ,  $1465$ ,  $1745\text{ cm}^{-1}$  με εξαίρεση τα  $1050\text{ cm}^{-1}$  και  $1640\text{ cm}^{-1}$  και τις περιοχές  $1575\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$  και  $1645\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ . Στην περιοχή των  $1050\text{ cm}^{-1}$  που σχετίζεται με την απορρόφηση των λιπιδίων και των πολυσακχαριτών (C-O, C-O-P ν), οι απορροφήσεις των αλλοιωμένων δειγμάτων στις δύο θερμοκρασίες ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ξεπέρασαν αυτές των φρέσκων στην περίπτωση της άλμης. Στα  $1640\text{ cm}^{-1}$  όπου παρατηρήθηκε η υψηλότερη κορυφή του φάσματος της φέτας για το εύρος  $900\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ , οι απορροφήσεις των αλλοιωμένων δειγμάτων στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ξεπέρασαν αυτές των φρέσκων στην περίπτωση της άλμης. Στα δείγματα του κενού ωστόσο για την ίδια περιοχή, οι απορροφήσεις των αλλοιωμένων στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  παρέμειναν στα ίδια επίπεδα με τα φρέσκα, ενώ οι απορροφήσεις των αλλοιωμένων στους  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  παρουσίασαν μικρή μείωση. Η κορυφή στα  $1640\text{ cm}^{-1}$ , αφορά την απορρόφηση που προκύπτει από το νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ) και αμίδιο I ( $80\% \text{ C}=\text{O}$  ν,  $10\% \text{ C-N}$  ν και  $10\% \text{ N-H}$  δ), ενώ το είδος της απορρόφησης που σχετίζεται με τις σημαντικότερες κορυφές παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 3.4**. Όσον αφορά τις περιοχές  $1575\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$  και  $1645\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  οι απορροφήσεις ήταν στα ίδια επίπεδα σε όλα τα δείγματα (Φρέσκα, Αλλοιωμένα  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Αλλοιωμένα  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) για τις δύο συνθήκες συντήρησης (Άλμη/Κενό). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με την έρευνα

των Papadopoulou et al. (2018) στην φέτα, όπου οι απορροφήσεις των αλλοιωμένων δειγμάτων (4 °C και 12 °C) ξεπέρασαν αυτές των φρέσκων στις περισσότερες περιοχές του φάσματος και κυρίως στα 1550-1650  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ στα 1000-1295  $\text{cm}^{-1}$  παρουσίασαν μείωση. Στις περισσότερες έρευνες η μέθοδος του FTIR έχει εφαρμοστεί στα τυριά για την παρακολούθηση της ωρίμανσή τους (Kraggerud et al., 2014; Lanciotti et al., 2005; Subramanian et al., 2011) και επομένως δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω σύγκριση. Η μέθοδος τους FTIR ωστόσο έχει εφαρμοστεί με επιτυχία όσον αφορά την παρακολούθηση της μικροβιακής ποιότητας κυρίως στο κρέας ( Fengou et al., 2019; Argyri et al., 2013; Papadopoulou et al., 2011), ενώ επιτυχημένες ήταν και οι έρευνες σε γαλακτοκομικά (Nicolaou and Goodacre, 2008; Lianou et al., 2017; Papadopoulou et al., 2021) σε συνδυασμό πάντα με τη πολυπαραγοντική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων.

Μετά από επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων που συλλέχθηκαν από τα όργανα (Videometer Lab, Videometer Lite, FTIR), κατασκευάστηκαν μοντέλα μέσω της μεθόδου του PLS-R, με σκοπό την πρόβλεψη του μικροβιολογικού φορτίου της OMX στα δείγματα της φέτας. Σύμφωνα με τις τιμές του συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  και του RMSE όσον αφορά την πρόβλεψη της αλλοίωσης, τα μοντέλα πρόβλεψης δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά για κανένα από τα εξεταζόμενα όργανα, υποδεικνύοντας ότι τα τελευταία δεν κατάφεραν να εκτιμήσουν σωστά την μικροβιολογική ποιότητα των δειγμάτων της φέτας. Πιο αναλυτικά στην περίπτωση του Videometer Lab, οι συντελεστές της απόδοσης των μοντέλων εμφάνισαν τιμές 0.263 ( $R^2$ ) και 0.408 (RMSE) στα δείγματα της άλμης καθώς και 0.206 ( $R^2$ ) και 0.287(RMSE) στα δείγματα του κενού, ενώ στην περίπτωση του Videometer Lite, οι τιμές ήταν -0.250 ( $R^2$ ) και 0.334 (RMSE) για τα δείγματα της άλμης και 0.048 ( $R^2$ ) και 0.276 (RMSE) για τα δείγματα του κενού αντίστοιχα. Τέλος όσον αφορά το FTIR, οι τιμές των συντελεστών ήταν 0.056 ( $R^2$ ) και 0.460 (RMSE) για τα δείγματα της άλμης και 0.129 ( $R^2$ ) 0.366 (RMSE) για τα δείγματα του κενού αντίστοιχα. Οι χαμηλές τιμές των συντελεστών της απόδοσης και κατά συνέπεια η αδυναμία των μοντέλων να προβλέψουν την αλλοίωση στην φέτα, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το εύρος των τιμών της OMX ήταν πολύ μικρό, περιορίζοντας έτσι τα μοντέλα κατά την ανάπτυξή τους. Αντίθετα, στην έρευνα των Papadopoulou et al. (2018), η χρήση του FTIR σε συνδυασμό με την ανάλυση PLS-R για την μικροβιακή αξιολόγηση της φέτας κατά την συντήρηση ήταν αποτελεσματική με τιμές  $R^2 = 0.743$  και  $RMSE = 0.392$ . Επιπλέον μελέτες που έχουν



γίνει σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως των Papadopoulou et al. (2021) στο γιαούρτι ( $R^2 = 0.54-0.72$ , RMSE= 0.16-0.21) και των Nicolaou και Goodacre (2008) στο πλήρες ( RMSE =0.25) και ημιαποβουτυρωμένο (RMSE =0.41) γάλα έδειξαν ότι ο συνδυασμός των φασματικών δεδομένων του FTIR με την ανάλυση PLS-R είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποιότητας του εκάστοτε προϊόντος.

Στην παρούσα έρευνα κατασκευάστηκαν επιπλέον μοντέλα με την μέθοδο PLS-DA για την διάκριση των δειγμάτων της φέτας, ως προς την απουσία ή την παρουσία της *Listeria monocytogenes*. Στην περίπτωση του Videometer Lab, η συνολική ακρίβεια της πρόβλεψης ήταν 48.7% στα δείγματα της άλμης και 40% στα δείγματα του κενού, στην περίπτωση του Videometer Lite ήταν 54.348% και στις δύο συνθήκες συντήρησης, ενώ στην περίπτωση του FTIR η συνολική ακρίβεια ήταν 57.143% στα δείγματα της άλμης και 82.86% στα δείγματα του κενού. Οι τιμές αυτές της συνολικής ακρίβειας υποδηλώνουν τα μοντέλα δεν πραγματοποίησαν σωστά τον διαχωρισμό των δειγμάτων, ως προς την απουσία/παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού. Ωστόσο το μοντέλο του FTIR στα δείγματα του κενού ήταν το μόνο που έδωσε ικανοποιητικό αποτέλεσμα δίνοντας σχετικά υψηλή συνολική ακρίβεια (82.86%). Η χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων σε συνδυασμό με την μέθοδο PLS-DA, έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε αρκετά τρόφιμα είτε για τον διαχωρισμό των δειγμάτων μεταξύ φρέσκου-αλλοιωμένου (Panagou et al., 2014), είτε μεταξύ φρέσκου-κατεψυγμένου (Ropodi et al., 2018; Barbin et al. 2013). Το FTIR διακρίνεται για την δυνατότητά του να εντοπίζει και να διαχωρίζει τους παθογόνους μικροοργανισμούς στα τρόφιμα, όπως στην έρευνα των Lampell et al. (2006), όπου κατάφερε να διαχωρίσει τον *Staphylococcus aureus* από άλλα στελέχη του ίδιου είδους, σε νωπό γάλα καθώς και των Nicolaou et al. (2011) και πάλι στο γάλα για τον ίδιο μικροοργανισμό.

## 5. Συμπεράσματα

Η προσθήκη του Cell - Free Supernatant (CFS) των βιοπροστατευτικών στελεχών *Lactiplantibacillus pentosus* L33 και *Lactiplantibacillus plantarum* L125 στα δείγματα της φέτας είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας συντήρησής τους (10-16 ημέρες), την ταχύτερη μείωση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* στα εμβολιασμένα δείγματα αλλά και την μερική επιβράδυνση της ανάπτυξης των ζυμών/μυκήτων που αποτελούν τους κύριους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς στην φέτα. Συμπερασματικά, το CFS των δύο στελεχών συνέβαλε ελαφρώς στην ενίσχυση της ασφάλειας της φέτας και αύξησε τον χρόνο συντήρησής της, βελτιώνοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της, χωρίς όμως να τα μεταβάλλει την τυπική γεύση, εμφάνιση και οσμή της. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η προσθήκη των CFS κατά την συντήρηση της φέτας έχει εξαιρετικές προοπτικές εφαρμογής για την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της και για την μερική ενίσχυση της ασφάλειάς της. Όσον αφορά τη χρήση των φασματοσκοπικών μεθόδων του MSI και FTIR σε συνδυασμό με τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης για την εκτίμηση της OMX στα δείγματα της φέτας, δεν εμφάνισαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Πιθανόν η ποσοτική ή ποιοτική εκτίμηση άλλων παραγόντων, όπως είναι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, να έχει καλύτερα αποτελέσματα για το συγκεκριμένο τρόφιμο. Σχετικά με την ποιοτική ανίχνευση του παθογόνου *Listeria monocytogenes* με την χρήση των παραπάνω μεθόδων, ικανοποιητικά αποτελέσματα έδειξε μόνο το μοντέλο του FTIR στα δείγματα του κενού δίνοντας υψηλή συνολική ακρίβεια και υποδεικνύοντας έτσι την δυνατότητα του μοντέλου να διαχωρίζει τα δείγματα ως προς την παρουσία του παθογόνου. Συμπερασματικά, είναι απαραίτητη η εύρεση πιο εύρωστων μοντέλων για την αποτελεσματικότερη πρόβλεψη της μικροβιακής ποιότητας της φέτας και την βελτιωμένη ανίχνευση της παρουσίας των παθογόνων σε αυτήν.

## 6. Βιβλιογραφία

- Abd El-Salam, M. H., & Alichanidis, E. (2004). Cheese Varieties Ripened in Brine. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 227–249). London, UK: Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.330>
- Abdi, H. (2003). Partial least square regression (PLS regression). *Encyclopedia for Research Methods for the Social Sciences*, 6(4), 792–795.
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Ahansaz, N., Tarrah, A., Pakroo, S., Corich, V., & Giacomini, A. (2023). Lactic Acid Bacteria in Dairy Foods: Prime Sources of Antimicrobial Compounds. *Fermentation*, 9(11), 964. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110964>
- Alichanidis, E., & Polychroniadou, A. (2008). Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology*, 88(4-5), 495–510. <https://doi.org/10.1051/dst:2008023>
- Almutairi, B., Turner, M. S., Fletcher, M. T., & Sultanbawa, Y. (2021). The impact of commercial prebiotics on the growth, survival and nisin production by *Lactococcus lactis* 537 in milk. *LWT*, 137, 110356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110356>
- Ammor, M. S., Argyri, A., & Nychas, G.-J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81(3), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.10.015>
- Anifatakis, E. A. (1991). Cheeses in Brine—Feta Cheese. In *Greek Cheeses: A Tradition of Centuries* (pp. 27–42). Athens, Greece: National Dairy Committee of Greece.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
- Argyri, A. A., Jarvis, R. M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E. Z., Goodacre, R., & Nychas, G.-J. E. (2013). A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, 29(2), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.040>
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. (2014). Monitoring Microbial Spoilage of Foods by Vibrational Spectroscopy (FT-IR & Raman). In *Novel*

*Food Preservation and Microbial Assessment Techniques* (pp. 386–434).

- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.619671>
- Bancalari, E., Montanari, C., Levante, A., Alinovi, M., Neviani, E., Gardini, F., & Gatti, M. (2020). Lactobacillus paracasei 4341 as adjunct culture to enhance flavor in short ripened Caciotta-type cheese. *Food Research International*, 135, 109284. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109284>
- Barbin, D. F., Sun, D.-W., & Su, C. (2013). NIR hyperspectral imaging as non-destructive evaluation tool for the recognition of fresh and frozen–thawed porcine longissimus dorsi muscles. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.12.011>
- Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., ... Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>
- 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. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.4.742>
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2), 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.024>
- Beutin, L., Wang, Q., Naumann, D., Han, W., Krause, G., Leomil, L., ... Feng, L. (2007). Relationship between O-antigen subtypes, bacterial surface structures and O-antigen gene clusters in Escherichia coli O123 strains carrying genes for Shiga toxins and intimin. *Journal of Medical Microbiology*, 56(2), 177–184. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46775-0>
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Bintsis, T., & Papademas, P. (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 113–120. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00054.x>
- Bintsis, T., & Robinson, R. K. (2004). A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 88(3), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.057>
- Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium Review: Interaction of Starter Cultures and Nonstarter Lactic Acid Bacteria in the Cheese Environment1. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611–3629.

- Böcker, U., Ofstad, R., Wu, Z., Hanne Christine Bertram, Sockalingum, G. D., Manfait, M., ... Achim Köhler. (2007). Revealing Covariance Structures in Fourier Transform Infrared and Raman Microspectroscopy Spectra: A Study on Pork Muscle Fiber Tissue Subjected to Different Processing Parameters. *Applied Spectroscopy*, 61(10), 1032–1039. <https://doi.org/10.1366/000370207782217707>
- Brereton, R. G. (2006). Consequences of sample size, variable selection, model validation and optimization for predicting classification ability from analytical data. *Trends Anal. Chem.*, Vol 25, 1103–1111.
- Bringel, F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *INTERNATIONAL JOURNAL of SYSTEMATIC and EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 55(4), 1629–1634. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63333-0>
- Carrasco, M. S., Moragues, L. G., Vignatti, C. I., Scarinci, H. E., & Simonetta, A. C. (2006). Characterisation and technological aspects of yeasts isolated from raw milk and different types of cheeses produced in Argentina. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61(1), 21–25.
- Carstensen, J. M., Hansen, M. E., Lassen, N. K., Hansen, P. W., & Allé, L. (2006). Creating surface chemistry maps using multispectral vision technology. *In Proceedings of the MICCAI (Medical Image Computing and Computer Aided Intervention)*, 6, 19–28.
- Carstensen, J. M., & Hansen, M. E. (2003). *An apparatus and a method of recording an image of an object*.
- Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez González, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>
- Charikleia Tsanasidou, Stamatia Asimakoula, Nikoletta Sameli, Christos Fanitsios, Elpiniki Vandera, Loulouda Bosnea, ... Samelis, J. (2021). Safety Evaluation, Biogenic Amine Formation, and Enzymatic Activity Profiles of Autochthonous Enterocin-Producing Greek Cheese Isolates of the *Enterococcus faecium/durans* Group. *Microorganisms*, 9(4), 777–777. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040777>
- Chen, M., Irudayaraj, J., & McMahon, D. J. (1998). Examination of Full Fat and Reduced Fat Cheddar Cheese During Ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2791–2797. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75837-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75837-0)
- Chen, X.-F., Hou, X., Xiao, M., Zhang, L., Cheng, J.-W., Zhou, M.-L., ... Hsueh, P.-R. (2021). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. *Microorganisms*, 9(7), 1536. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071536>

- Cheng, J.-H., & Sun, D.-W. (2015). Recent Applications of Spectroscopic and Hyperspectral Imaging Techniques with Chemometric Analysis for Rapid Inspection of Microbial Spoilage in Muscle Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 478–490. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12141>
- Choi, E., & Chang, H. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT Food Sci. Technol.*, 62, 210–217.
- Codex Standard 283-1978. (2013). *Codex General Standard for Cheese*. Italy, Rome: Codex Alimentarius Commission. Retrieved from [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsite%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS\\_283e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsite%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS_283e.pdf)
- Colabella, C., Corte, L., Luca Roscini, Volha Shapaval, Kohler, A., Tafintseva, V., ... Cardinali, G. (2017). Merging FT-IR and NGS for simultaneous phenotypic and genotypic identification of pathogenic *Candida* species. *PLOS ONE*, 12(12), e0188104–e0188104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188104>
- Collado, M. C., Vinderola, G., & Salminen, S. (2019). Postbiotics: facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. *Beneficial Microbes*, 10(7), 711–719. <https://doi.org/10.3920/bm2019.0015>
- Cordovana, M., Mauder, N., Kostrzewa, M., Wille, A., Rojak, S., Ralf Matthias Hagen, ... Dekker, D. (2021). Classification of *Salmonella enterica* of the (Para-)Typhoid Fever Group by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Microorganisms*, 9(4), 853–853. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040853>
- Corsetti, A., & Valmorri, S. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 111–118. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00263-6>
- D'Aoust, J. Y., Maurer, J., & Bailey, J. S. (2001). *Salmonella* species. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 141–178). Washington, DC, USA: ASM Press.
- da Costa, W. K. A., de Souza, G. T., Brandão, L. R., de Lima, R. C., Garcia, E. F., dos Santos Lima, M., ... Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International*, 108, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.045>
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., & Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 58–65.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016>

- Daugaard, S. B., Adler-Nissen, J., & Carstensen, J. M. (2010). New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat. *Food Control*, 21(5), 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.09.007>
- Davis, R., & Mauer, L. (2010). Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy: A Rapid Tool for Detection and Analysis of Foodborne Pathogenic Bacteria. In A. Mendez-Vilas (Ed.), *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 1582–1594). Formatex Research Center.
- de Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C. R., & Sant'Ana, A. S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 96–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.011>
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., & Le Blay, G. (2013). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*, 30(1), 206–213.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.002>
- Dimitrellou, D., Kandyli, P., Sidira, M., Koutinas, A. A., & Kourkoutas, Y. (2014). Free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393 on whey protein as starter cultures for probiotic Feta-type cheese production. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4675–4685. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7597>
- Dissing, B. S., Papadopoulou, O. S., Tassou, C., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. (2012). Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2268–2279. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0886-6>
- Donnelly, C. W. (2001). *Listeria monocytogenes*: A Continuing Challenge. *Nutrition Reviews*, 59(6), 183–194. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07011.x>
- Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. A., Nychas, G.-J. E., Tassou, C. C., & Panagou, E. Z. (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 353–356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.003>
- du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., ... Holzappel, W. H. (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 93–104. <https://doi.org/10.1016/s0168->

1605(98)00024-5

- Dufour, E. (2009). Principles of Infrared Spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* (pp. 1–27). Academic Press N.Y.
- EFSA. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 5(12), 587. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00461>
- Einarsson, H., & Lauzon, H. L. (1995). Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 669–676. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.669-676.1995>
- Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. (2014). Άρθρο 83 Τυροκομικά προϊόντα (1) (pp. 39–40). Retrieved from <https://www.aade.gr/sites/default/files/2020-03/83-iss3.pdf>
- Ellis, D. I., Brewster, V. L., Dunn, W. B., Allwood, J. W., Golovanov, A. P., & Goodacre, R. (2012). Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews*, 41(17), 5706–5727. <https://doi.org/10.1039/c2cs35138b>
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., & Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, 514(2), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.060>
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., & Goodacre, R. (2002). Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2822–2828. <https://doi.org/10.1128/aem.68.6.2822-2828.2002>
- Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2001). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 414–424. [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(02\)00019-5](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(02)00019-5)
- Elmasry, G., Barbin, D. F., Sun, D.-W., & Allen, P. (2012). Meat Quality Evaluation by Hyperspectral Imaging Technique: An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 689–711. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507908>
- Esslinger, S., Riedl, J., & Fauhl-Hassek, C. (2014). Potential and limitations of



non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.015>

- European Commission (EC) . (2011, November 11). European Commission Regulation No 1129/2011 amending annex II to regulation (EC) No 1333/2008 of the European parliament and of the council by establishing a union list of food additives text with EEA relevance. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:en:PDF>
- European Commission (EC). (2002, October 14). European Commission Regulation (EC) No 1829/2002 of 14 October 2002 amending the Annex to Regulation (EC) No 1107/96 with regard to the name “Feta.” Retrieved December 10, 2019, from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:277:0010:0014:EN:PDF>
- European Commission (EC). (2005, November 15). European Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Retrieved from [eur-lex.europa.eu website: http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj](http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj)
- European Commission (EC). (2007, December 5). European Commission Regulation No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Retrieved from <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/1441/oj>
- European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13(1), 3991. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, Working Group Report*. London, Ontario, Canada.
- FAO/WHO. (2006). *Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation* (pp. 1–50). Rome. Retrieved from <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/382476b3-4d54-4175-803f-2f26f3526256/content>
- Favaro, L., Barretto Penna, A. L., & Todorov, S. D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses – Application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>
- 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, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.013>

- Fengou, L.-C., Spyrelli, E., Lianou, A., Tsakanikas, P., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2019). Estimation of Minced Pork Microbiological Spoilage through Fourier Transform Infrared and Visible Spectroscopy and Multispectral Vision Technology. *Foods*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/foods8070238>
- Folm-Hansen, J. (1999). *On Chromatic and Geometrical Calibration*. Department of Mathematical Modeling, University of Denmark, DTU.
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 1–24.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science* (2nd ed). N.Y.: Springer.
- Fox, P. F., Paul L.H. McSweeney, Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1*. London, UK: Elsevier.
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Geronikou, A., Srimahaeak, T., Rantsiou, K., Triantafyllidis, G., Larsen, N., & Jespersen, L. (2020). Occurrence of Yeasts in White-Brined Cheeses: Methodologies for Identification, Spoilage Potential and Good Manufacturing Practices. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582778>
- Gowen, A. A., Feng, Y., Gaston, E., & Valdramidis, V. (2015). Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, 137, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.012>
- Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., & Lacroix, C. (2008). Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Sci. Technol.*, 88, 421–444.
- Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta.*, Vol 879, 10–23.
- Hameed, S., Xie, L., & Ying, Y. (2018). Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.020>
- Hammam, A. R. A., Kapoor, R., Salunke, P., & Metzger, L. E. (2021). Compositional and Functional Characteristics of Feta-Type Cheese Made from Micellar Casein Concentrate. *Foods*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.3390/foods11010024>

- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., ... Devleesschauwer, B. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Medicine*, 12(12), e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Hayaloglu, A. A. (2016). Cheese: Microbiology of Cheese. *Reference Module in Food Science*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00675-2>
- He, T., Priebe, M., Zhong, Y., Huang, C., & Harmsen, H. (2007). Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactoseintolerant subjects. *J Appl Microbiol*, 104, 595–604.
- Hedberg, C. W., Korlath, J. A., D'Aoust, J. Y., White, K. E., Schell, W. L., & Miller, M. R. (1992). A multistate outbreak of *Salmonella javiana* and *Salmonella oranienburg* infections due to consumption of contaminated cheese. *Journal of the American Medical Association*, 268, 3203–3207.
- Helander, I. M., von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T-M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), 146–150. [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(97\)01030-3](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(97)01030-3)
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24(3), 343–362. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00036-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00036-6)
- Hussain, M., Zou, J., Zhang, H., Zhang, R., Chen, Z., & Tang, Y. (2022). Recent Progress in Spectroscopic Methods for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Biosensors*, 12(10), 869. <https://doi.org/10.3390/bios12100869>
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., ... Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12), 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- Izco, J. M., Tormo, M., & Jiménez-Flores, R. (2002). Rapid Simultaneous Determination of Organic Acids, Free Amino Acids, and Lactose in Cheese by Capillary Electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2122–2129. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74290-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74290-2)
- Jacobsen, C. N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Pærregaard, A., ... Jakobsen, M. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949–4956. <https://doi.org/10.1128/aem.65.11.4949-4956.1999>
- Jo, Y., Benoist, D. M., Ameerally, A., & Drake, M. A. (2018). Sensory and

chemical properties of Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 1967–1989. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13637>

- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254598>
- Katsouri, E., Magriplis, E., Zampelas, A., Nychas, G.-J., & H. Drosinos, E. (2020). Nutritional Characteristics of Prepacked Feta PDO Cheese Products in Greece: Assessment of Dietary Intakes and Nutritional Profiles. *Foods*, 9(3), 253. <https://doi.org/10.3390/foods9030253>
- Kavas, N., Kavas, G., Kınık, Ö., Ateş, M., Şatır, G., & Kaplan, M. (2021). The effect of using microencapsulated pro and prebiotics on the aromatic compounds and sensorial properties of synbiotic goat cheese. *Food Bioscience*, 43, 101233. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101233>
- Klaenhammer, T. R., Rodolphe Barrangou, B. Logan Buck, M. Andrea Azcarate-Peril, & Altermann, E. (2005). *Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health*. 29(3), 393–409. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.007>
- Lamprell, H., Mazerolles, G., Kodjo, A., Chamba, J. F., Noël, Y., & Beuvier, E. (2006). Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from different species of *Staphylococcus* using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.015>
- Laslo, É., & György, É. (2018). Evaluation of the microbiological quality of some dairy products. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 11(1), 27–44. <https://doi.org/10.2478/ausal-2018-0002>
- Law, B. A. (1999). *Cheese ripening and cheese flavour technology* (In B. A. Law Ed., *Technology of cheesemaking*, pp. 163–192). Sheffield, England: Sheffield Academic Press Ltd.
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2, 7–28.
- LeBlanc, J., Lain, J., del Valle, M., Vannini, V., & van Sinderen, D. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol*, 111, 1297–1309.
- Li, H., Bai, R., Zhao, Z., Tao, L., Ma, M., Ji, Z., ... Liu, A. (2018). Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Bioscience Reports*, 38(6). <https://doi.org/10.1042/bsr20181170>
- Lianou, A., Christos Malavazos, Ioannis Triantafyllou, & Panagou, E. Z. (2017). Rapid Assessment of the Microbiological Quality of Pasteurized Vanilla

Cream by Means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Tandem with Support Vector Machine Analysis. *Food Analytical Methods*, 11(3), 840–847. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1063-3>

- Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007). Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2172–2198. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2172>
- Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2014). The Microfloras of Traditional Greek Cheeses. *Microbiology Spectrum*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.cm-0009-2012>
- Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., ... McLauchlin, J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25(2), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.007>
- Liu, Y., & Huang, X. (2023). Application of Multispectral Imaging Technology in Food Quality and Safety Inspection. *International Journal of Food Science and Agriculture*, 7(3), 396–400. <https://doi.org/10.26855/ijfsa.2023.09.009>
- Løkke, M. M., Seefeldt, H. F., Skov, T., & Edelenbos, M. (2013). Color and textural quality of packaged wild rocket measured by multispectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.018>
- Luana Virgínia Souza, Martins, E., Maria, I., & Fernandes, A. (2022). Strategies for the Development of Bioprotective Cultures in Food Preservation. *International Journal of Microbiology*, 2022, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2022/6264170>
- Lucke, F. K. (1994). Fermented meat products. *Food Research International*, 27(3), 299–307.
- Magwaza, L. S., Opara, U. L., Nieuwoudt, H., Cronje, P. J. R., Saeys, W., & Nicolaï, B. (2011). NIR Spectroscopy Applications for Internal and External Quality Analysis of Citrus Fruit—A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 425–444. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0697-1>
- Mani-López, E., Arrijoja-Bretón, D., & López-Malo, A. (2022). The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 604–641. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>
- Manolaki, P., Katsiari, M. C., & Alichanidis, E. (2006). Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 98(4), 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.031>
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., & Anifantakis, E. M. (2003). Evolution

of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00258-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00258-1)

- Mantzourani, I., Terpou, A., Alexopoulos, A., Chondrou, P., Galanis, A., Bekatorou, A., ... Plessas, S. (2018). Application of A Novel Potential Probiotic *Lactobacillus paracasei* Strain Isolated from Kefir Grains in the Production of Feta-Type Cheese. *Microorganisms*, 6(4), 121. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040121>
- Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., & Travert, J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/s0924-2031\(01\)00113-8](https://doi.org/10.1016/s0924-2031(01)00113-8)
- Martín-del-Campo, S. T., Picque, D., Cosío-Ramírez, R., & Corrieu, G. (2007). Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. *International Dairy Journal*, 17(7), 835–845. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.003>
- 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)
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21(2), 213–216. [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(03\)00057-1](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(03)00057-1)
- Meng, J. , Doyle, M. P., Zhao, T., & Zhao, S. (2001). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology fundamentals and frontiers* (pp. 193–213). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Mirkovic, N., Kulas, J., Miloradovic, Z., Miljkovic, M., Tucovic, D., Miacinovic, J., ... Kojic, M. (2020). Lactolisterin BU-producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1-4: Bio-control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh soft cheese and effect on immunological response of rats. *Food Control*, 111, 107076. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107076>
- Moatsou, G., & Govaris, A. (2011). White brined cheeses: A diachronic exploitation of small ruminants' milk in Greece. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.031>
- Moradi, M., Hossein Tajik, Karim Mardani, & Parya Ezati. (2019). Efficacy of lyophilized cell-free supernatant of *Lactobacillus salivarius* (Ls-BU2) on *Escherichia coli* and shelf life of ground beef. *PubMed*, 10(3), 193–198. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.101419.2417>
- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T.,

Yılmaz, N., & Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12613>

- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M-P., & Perrin, G. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, *64*(1-2), 217–221. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00452-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00452-9)
- Nicolaou, N., & Goodacre, R. (2008). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *The Analyst*, *133*(10), 1424. <https://doi.org/10.1039/b804439b>
- Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2011). Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopies for the Rapid Detection, Enumeration, and Growth Interaction of the Bacteria *Staphylococcus aureus* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* in Milk. *Analytical Chemistry*, *83*(14), 5681–5687. <https://doi.org/10.1021/ac2008256>
- NORMANNO, G., FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., ... BOLZONI, G. (2005). Coagulase-positive *Staphylococci* and in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, *98*(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.008>
- Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Mohareb, F. (2016). Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, *12*, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.06.005>
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, *78*(1-2), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>
- Ortiz-Rivera, Y., Sánchez-Vega, R., Gutiérrez-Méndez, N., León-Félix, J., Acosta-Muñiz, C., & Sepulveda, D. R. (2017). Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, *100*(6), 4258–4268. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11534>
- Panagou, E. Z., Mohareb, F. R., Argyri, A. A., Bessant, C. M., & Nychas, G.-J. E. (2011). A comparison of artificial neural networks and partial least squares modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints. *Food Microbiology*, *28*(4), 782–790. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.014>
- Panagou, E. Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J. M., & Nychas, G.-J. E. (2014). Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.026>
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Georgalaki, M., Bounenni, R., Paximadaki,

- A., Charmpi, C., ... Tsakalidou, E. (2022). Comparison of the Microbiome of Artisanal Homemade and Industrial Feta Cheese through Amplicon Sequencing and Shotgun Metagenomics. *Microorganisms*, *10*(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051073>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Kounani, V., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. (2021). Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring the Shelf Life and Safety of Yogurts Supplemented with a *Lactobacillus plantarum* Strain with Probiotic Potential. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678356>
  - Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Varzakis, E. E., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. G. (2018). Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. *Food Microbiology*, *74*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.005>
  - Papadopoulou, O. S., & Chorianopoulos, N. G. (2016). Production of a Functional Fresh Cheese Enriched with the Probiotic Strain *Lb. Plantarum* T571 Isolated from Traditional Greek Product. *Current Research in Nutrition and Food Science*, *4*(Special-Issue-October), 169–181. <https://doi.org/10.12944/crnfsj.4.special-issue-october.23>
  - Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G.-J. E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, *44*(10), 3264–3271. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.012>
  - PAPAGEORGIU, 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>
  - Pappas, C. S., P.A. Tarantilis, E. Moschopoulou, G. Moatsou, I. Kandarakis, & M.G. Polissiou. (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry*, *106*(3), 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.034>
  - Pavli, F. G., Argyri, A. A., Chorianopoulos, N. G., Nychas, G.-J. E., & Tassou, C. C. (2020). Effect of *Lactobacillus plantarum* L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages. *LWT*, *118*, 108810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108810>
  - Pisano, M. B., Rosa, A., Putzu, D., Cesare Marincola, F., Mossa, V., Viale, S., ... Cosentino, S. (2020). Influence of Autochthonous Putative Probiotic Cultures on Microbiota, Lipid Components and Metabolome of Caciotta Cheese. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583745>



- Pistorius, A. M. A. (1995). Biochemical applications of FTIR spectroscopy. *Spectrosc., Eur.* 7, 8–15.
- Potocki, L., Depciuch, J., Kuna, E., Worek, M., Lewinska, A., & Wnuk, M. (2019). FTIR and Raman Spectroscopy-Based Biochemical Profiling Reflects Genomic Diversity of Clinical Candida Isolates That May Be Useful for Diagnosis and Targeted Therapy of Candidiasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 988. <https://doi.org/10.3390/ijms20040988>
- Prezzi, L. E., Lee, S. H. I., Nunes, V. M. R., Corassin, C. H., Pimentel, T. C., Rocha, R. S., ... Oliveira, C. A. F. (2020). Effect of Lactobacillus rhamnosus on growth of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in a probiotic Minas Frescal cheese. *Food Microbiology*, 92, 103557. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103557>
- Prieto-Calvo, M., Prieto, M., López, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2014). Effects of High Hydrostatic Pressure on Escherichia coli Ultrastructure, Membrane Integrity and Molecular Composition as Assessed by FTIR Spectroscopy and Microscopic Imaging Techniques. *Molecules*, 19(12), 21310–21323. <https://doi.org/10.3390/molecules191221310>
- Pu, Y.-Y., Feng, Y.-Z., & Sun, D.-W. (2015). Recent Progress of Hyperspectral Imaging on Quality and Safety Inspection of Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 176–188. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12123>
- Pujato, S. A., del L Quiberoni, A., Candiotti, M. C., Reinheimer, J. A., & Guglielmotti, D. M. (2014). Leuconostoc citreum MB1 as biocontrol agent of Listeria monocytogenes in milk. *Journal of Dairy Research*, 81(2), 137–145. <https://doi.org/10.1017/s002202991300068x>
- Rahi, S., Mobli, H., & Jamshidi, B. (2019). Spectroscopy and Spectral Imaging Techniques for Non-destructive Food Microbial Assessment. *Journal of Nondestructive Testing*, 24(4). Retrieved from <https://www.ndt.net/?id=24162>
- Rahman, U. ur, Shahzad, T., Sahar, A., Ishaq, A., Khan, M. I., Zahoor, T., & Aslam, S. (2016). Recapitulating the competence of novel & rapid monitoring tools for microbial documentation in food systems. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.041>
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., & Griffiths, M. W. (1998). Survival of Bioluminescent Listeria monocytogenes and Escherichia coli 0157:H7 in Soft Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81(7), 1810–1817. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75750-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75750-9)
- RANTSIOU, K., URSO, R., DOLCI, P., COMI, G., & COCOLIN, L. (2008). Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.031>
- Romia, M. A., & Bernandez, M. B. (2009). Multivariate Calibration of

Quantitative Analysis. In Sun D. W.(ed.). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Oxford: Elsevier Inc.

- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2016). Multispectral imaging (MSI): A promising method for the detection of minced beef adulteration with horsemeat. *Food Control*, 73, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.048>
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2018). Rapid detection of frozen-then-thawed minced beef using multispectral imaging and Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat Science*, 135, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.09.016>
- Ropodi, A. I., Pavlidis, D. E., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2015). Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. *Food Research International*, 67, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.032>
- Rustam R, G., Suntsova, A. Y., Vostrikova, T. Y., Shchegolikhin, A. N., Popov, D. A., Guseva, M. A., ... Kurochkin, I. N. (2020). Discrimination of *Staphylococcus aureus* Strains from Coagulase-Negative Staphylococci and Other Pathogens by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 92(7), 4943–4948. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05050>
- Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (1998). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York. : Marcel Dekker Inc.
- Sandine, W., & Elliker, P. (1970). Microbially induced flavors and fermented foods: flavor in fermented dairy products. *J Agric Food Chem*, 18, 557–566.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 93–105. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00021-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00021-1)
- Schlech, W. F., & Acheson, D. (2000). Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31(3), 770–775. <https://doi.org/10.1086/314008>
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 70–78.
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>
- Shigwedha, N., Sichel, L., Jia, L., & Zhang, L. (2014). Probiotical Cell Fragments (PCFs) as “Novel Nutraceutical Ingredients.” *Journal of Biosciences*

*and Medicines*, 02(03), 43–55. <https://doi.org/10.4236/jbm.2014.23007>

- Siedler, S., Rau, M. H., Bidstrup, S., Vento, J. M., Aunsbjerg, S. D., Bosma, E. F., ... Neves, A. R. (2020). Competitive Exclusion Is a Major Bioprotective Mechanism of Lactobacilli against Fungal Spoilage in Fermented Milk Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7). <https://doi.org/10.1128/aem.02312-19>
- Sinelli, N., Barzaghi, S., Giardina, C., & Cattaneo, T. M. P. (2005). A Preliminary Study Using Fourier Transform near Infrared Spectroscopy to Monitor the Shelf-Life of Packed Industrial Ricotta Cheese. *Journal of near Infrared Spectroscopy*, 13(5), 293–300. Retrieved from <https://opg.optica.org/jnirs/abstract.cfm?URI=jnirs-13-5-293>
- Sokolova, M. (2009). A systematic analysis of performance measures for classification tasks. *Information Processing & Management*, 45(4), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.ipm.2009.03.002>.
- Spyrelli, E. D., Doulgeraki, A. I., Argyri, A. A., Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2020). Implementation of Multispectral Imaging (MSI) for Microbiological Quality Assessment of Poultry Products. *Microorganisms*, 8(4), 552. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040552>
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 331–345. <https://doi.org/10.1007/bf00395940>
- Tajammal Munir, M., Yu, W., Young, B. R., & Wilson, D. I. (2015). The current status of process analytical technologies in the dairy industry. *Trends in Food Science & Technology*, 43(2), 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.010>
- Terpou, A., Bekatorou, A., Bosnea, L., Kanellaki, M., Ganatsios, V., & Koutinas, A. A. (2018). Wheat bran as prebiotic cell immobilisation carrier for industrial functional Feta-type cheese making: Chemical, microbial and sensory evaluation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.010>
- TOKAK, S., KILIÇ, İ. H., YALÇIN, H. T., & DURAN, T. (2019). Gaziantep İline Ait Bazı Süt Ürünlerinde Bozulmaya Neden Olan Mayalardan Ekstraselüler Lipaz Enzimi Aranması ve Lipaz Aktivitesine Sahip Suşların Genotipik İdentifikasyonu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.555727>
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., & Nychas, G.-J. (2015). High Throughput Multispectral Image Processing with Applications in Food Science. *PLoS One*, 10(10), e0140122–e0140122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140122>
- Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (1992). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in feta and teleme, two Greek cheeses from ewe's milk. *Journal of Dairy Science*, 75, 1389–1393.

- USDA. (2019). FoodData Central. Retrieved from [fdc.nal.usda.gov](https://fdc.nal.usda.gov) website: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173420/nutrients>
- van den Berg, F., Lyndgaard, C. B., Sørensen, K. M., & Engelsen, S. B. (2013). Process Analytical Technology in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *31*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.007>
- Vannini, L., Lanciotti, R., Gardini, F., & Guerzoni, M. E. (1996). Evaluation of Fourier-transform infrared spectroscopy for data capture in predictive microbiology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology Incorporating the MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology/World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *12*(1), 85–90. <https://doi.org/10.1007/bf00327808>
- Vera-Santander, V. E., Hernández-Figueroa, R. H., Arrijoja-Bretón, D., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2024). Utilization of Whey for Eco-Friendly Bio-Preservation of Mexican-Style Fresh Cheeses: Antimicrobial Activity of *Lactobacillus casei* 21/1 Cell-Free Supernatants (CFS). *International Journal of Environmental Research and Public Health/International Journal of Environmental Research and Public Health*, *21*(5), 560–560. <https://doi.org/10.3390/ijerph21050560>
- VideometerLite. (n.d.). Retrieved March 15, 2024, from Videometer website: <https://videometer.com/videometerlite/>
- Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, *69*(1-2), 37–44. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00570-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00570-0)
- Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., & Wehrmüller, K. (2008). Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*, *88*(4-5), 389–405. <https://doi.org/10.1051/dst:2008012>
- Westall, S., & Filtenborg, O. (1998). Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, *15*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0161>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *58*(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/s0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/s0169-7439(01)00155-1)
- Wu, D., & Sun, D.-W. (2013). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review — Part II: Applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *19*, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.016>
- Xiong, Y., Leng, Y., Li, X., Huang, X., & Xiong, Y. (2020). Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *126*, 115861. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115861>
- Yanai, Y., Rosen, B., Pinsky, A., & Sklan, D. (1977). The microbiology of

pickled cheese during manufacture and maturation. *Journal of Dairy Research*, 44, 149–153.

- Young, N. W. G., & O’Sullivan, G. R. (2011). The influence of ingredients on product stability and shelf life. *Food and Beverage Stability and Shelf Life*, 132–183. <https://doi.org/10.1533/9780857092540.1.132>
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., ... Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>
- Zwietering, M. H., Jacxsens, L., Membré, J.-M., Nauta, M., & Peterz, M. (2016). Relevance of microbial finished product testing in food safety management. *Food Control*, 60, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.002>
- Zygouris, M. P. (1952). *The dairy industry* (2nd ed). Athens, Greece: Ministry of Agriculture.
- Ταραντίλης, Π. Α., & Παππάς, Χ. Σ. (2015). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση- Πανεπιστημιακές Σημειώσεις* (pp. 65–86). Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.