



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εκτίμηση της επίδρασης του *Lactiplantibacillus pentosus*
έναντι των παθογόνων *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7,
καθώς και στον χρόνο ζωής (shelf-life) του λάχανου
σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Αικατερίνη Μαλεβή Β. Μαντζάρα

Επιβλέπων καθηγητής:

Νικόλαος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2024

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εκτίμηση της επίδρασης του *Lactiplantibacillus pentosus*
έναντι των παθογόνων *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7,
καθώς και στον χρόνο ζωής (shelf-life) του λάχανου
σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Assessment of the effect of *Lactiplantibacillus pentosus*
against the pathogens *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7,
as well as on the shelf-life of cabbage in modified atmosphere packaging

Αικατερίνη Μαλεβή Β. Μαντζάρα

Εξεταστική Επιτροπή:

Νικόλαος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

Εκτίμηση της επίδρασης του *Lactiplantibacillus pentosus* έναντι των παθογόνων *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7, καθώς και στον χρόνο ζωής (shelf-life) του λάχανου σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φρούτα και τα λαχανικά χαρακτηρίζονται ως τρόφιμα με υψηλή θρεπτική αξία καθώς αποτελούν σημαντικές πηγές βιταμινών, ανόργανων συστατικών, διαιτητικών ινών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Συνεπώς, λόγω της περιεκτικότητάς τους στα παραπάνω συστατικά καθίστανται ως τρόφιμα με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία των ανθρώπων. Για αυτό, σημαντική κρίνεται η εξάλειψη των πιθανοτήτων αλλοίωσής τους τόσο χημικά όσο και μικροβιολογικά. Η αλλοίωσή τους μπορεί να προκληθεί από το στάδιο της συγκομιδής έως ακόμη και το στάδιο λιανικής λόγω της επίδρασης διαφορετικών παραγόντων. Η παρούσα ερευνητική εργασία έχει ως βασικό στόχο τη μελέτη της δράσης των κυττάρων και του υπερκειμένου (cell-free supernatant) του αντιμικροβιακού τεχνολογικού μικροοργανισμού *Lactiplantibacillus pentosus* B281 στην αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και στην βελτίωση της ποιότητας σε δείγματα λάχανου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η μελέτη τριών περιπτώσεων προεργασίας των δειγμάτων λάχανου, τα οποία είχαν συντηρηθεί στους 4 °C και 10 °C σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, MAP (Modified Atmosphere Packaging). Στην πρώτη περίπτωση, τα δείγματα ψεκάστηκαν με ζωμό από λάχανο και μαρούλι και αποτελούσαν το μάρτυρα της μελέτης (control). Στη δεύτερη περίπτωση, τα δείγματα λάχανου ψεκάστηκαν με κύτταρα του τεχνολογικού μικροοργανισμού και στην τρίτη περίπτωση με το υπερκείμενο του. Πριν τα δείγματα ψεκαστούν, εμβολιάστηκαν με κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού. Η πειραματική πορεία χωρίστηκε σε δύο κύκλους όπου στον πρώτο τα δείγματα εμβολιάστηκαν με κύτταρα δύο στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* ενώ στον δεύτερο κύκλο τα δείγματα εμβολιάστηκαν με κύτταρα δύο στελεχών του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7.

Για την αξιολόγηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης του λάχανου κατά την συντήρηση, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις. Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν στα δείγματα λάχανου, και των τριών περιπτώσεων, ήταν η Ολική

Μικροβιακή Χλωρίδα (OMX), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και οι ζύμες / μύκητες. Επιπλέον, στον πρώτο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας προσδιορίστηκε ο πληθυσμός του παθογόνου *Listeria monocytogenes* και στον δεύτερο κύκλο ο πληθυσμός του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν ανά 24 ώρες και για τις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων. Για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης του λάχανου, εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικές ταχείες αναλυτικές μέθοδοι, η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και η πολυφασματική απεικόνιση (MSI). Για την πολυφασματική απεικόνιση έγινε χρήση δύο οργάνων παρόμοιας τεχνολογίας (σταθερό και φορητό). Με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των φασματοσκοπικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και συγκεκριμένα με τον πληθυσμό της OMX. Για την ανάπτυξη και επικύρωση χρησιμοποιήθηκε το 70 % του συνόλου των δεδομένων ενώ για την πρόβλεψη το υπόλοιπο 30 %. Η κατασκευή των μοντέλων για την εκτίμηση της OMX πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης με τη χρήση των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R).

Όσον αφορά τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι η θερμοκρασία και ο ψεκασμός των δειγμάτων με τα κύτταρα και το υπερκείμενο του *Lactiplantibacillus pentosus* επηρέασαν τη μικροβιολογική αλλοίωση. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι, και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας, τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4 °C παρουσίασαν μικρότερη μικροβιακή αύξηση. Ομοίως, συγκριτικά με τις τρεις περιπτώσεις, τα δείγματα λάχανου ψεκασμένα με τα κύτταρα και το υπερκείμενο του τεχνολογικού μικροοργανισμού περιόρισαν, έστω και ελάχιστα, την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Αντίθετα στους 10 °C τα δείγματα των τριών περιπτώσεων δεν παρουσίασαν κάποια διαφοροποίηση ως προς τη μικροβιακή ανάπτυξη τόσο των παθογόνων όσο και των υπόλοιπων μικροοργανισμών.

Το μοντέλο PLS-R που αναπτύχθηκε για την εκτίμηση της OMX, σύμφωνα με τα δεδομένα των αισθητήρων FTIR 6200 JASCO και VideometerLab, δεν χαρακτηρίστηκε με καλή απόδοση καθώς οι συντελεστές απόδοσης καταμετρήθηκαν $R^2=0,114$, $RMSE=1,464$ καθώς και $R^2=0,273$, $RMSE=1,224$, αντίστοιχα. Ωστόσο, το μοντέλο PLS-R, σύμφωνα με τα δεδομένα του VideometerLite, χαρακτηρίστηκε με καλή απόδοση καθώς οι συντελεστές απόδοσης καταμετρήθηκαν $R^2=0,795$,

RMSE=0,722.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: λάχανο, αλλοίωση, φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT-IR, πολυφασματική απεικόνιση, βιοπροστασία και επέκταση χρόνου ζωής τροφίμων

Assessment of the effect of *Lactiplantibacillus pentosus* against the pathogens *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7, as well as on the shelf-life of cabbage in modified atmosphere packaging

Msc Food Science & Technology
Department of food science & human nutrition
Laboratory of Microbiology & Food Biotechnology

ABSTRACT

Fruits and vegetables are characterized as foods with high nutritional value as they are important sources of vitamins, minerals, dietary fiber and antioxidants. Therefore, due to the content of the above nutrients, they are foods with beneficial properties for human health. For this reason, it is considered important to eliminate the possibility of their spoilage both chemically and microbiologically. Their deterioration can be caused from the harvest stage to even the retail stage due to the effect of different factors.

The main objective of this research work was to study the effect of the cells and the cell-free supernatant of the antimicrobial technological microorganism *Lactiplantibacillus pentosus* B281, in inhibiting the growth of pathogenic microorganisms as well as improving the quality of cabbage samples. More specifically, the study of three cases of pre-treatment of cabbage samples, which had been preserved at 4 °C and 10 °C in modified atmosphere packaging, MAP (Modified Atmosphere Packaging), was carried out. In the first case, the samples were sprayed with cabbage and lettuce broth and constituted the control samples. In the second case, the cabbage samples were sprayed with cells of the technological microorganism and in the third case with its supernatant. Before the samples were sprayed, they were inoculated with cells of a pathogenic microorganism. The experimental course was divided into two cycles where in the first the samples were inoculated with cells of two strains of the pathogen *Listeria monocytogenes* while in the second cycle, the samples were inoculated with cells of two strains of the pathogen *Escherichia coli* O157:H7.

To evaluate the microbiological spoilage of cabbage during storage, microbiological analysis was carried out. The microorganisms identified in the cabbage samples of all three cases were Total Viable Counts (TVC), bacteria of the genus *Pseudomonas* spp., family Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria (LAB) and yeasts/fungi. In addition, in the first cycle, the population of the pathogen *Listeria monocytogenes* and in the second

cycle the population of the pathogen *Escherichia coli* O157:H7 was determined. Sampling was performed every 24 hours for all three sample occasions.

To assess the microbiological spoilage of cabbage, two different rapid analytical methods, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and multispectral imaging (MSI), were applied. For multispectral imaging, two instruments of similar technology (fixed and portable) were used. With the use of chemometric models, the correlation of the spectroscopic data with the microbiological results and specifically with the TVC population was carried out. 70% of the total data was used for the development and validation and 30% for the prediction. The construction of the models for the estimation of TVC was based on the method of partial least squares regression, PLS-R.

Regarding the microbiological results, it was observed that the temperature and the spraying of the samples with the cells and supernatant of *Lactiplantibacillus pentosus* affected the microbiological deterioration. More specifically, it was observed that, in both cycles, the samples kept at 4 °C showed a smaller increase. Likewise, compared to the three cases, the cabbage samples sprayed with the cells and supernatant of the technological microorganism reduced, even slightly, the growth of the pathogenic microorganisms. On contrary, the samples kept at 10 °C did not show any difference in terms of the microbial growth for both the pathogens and the rest of the microorganisms.

The PLS-R model developed to estimate the TVC according to the data of the sensors FTIR 6200 JASCO and VideometerLab did not yield good performance as the indices measured were for $R^2=0.114$ and for $RMSE=1.464$ as well as $R^2=0.273$ and $RMSE=1.224$, respectively. However, the PLS-R model, according to VideometerLite data, was characterized with good performance as the indices measured were for $R^2=0.795$ and for $RMSE=0.722$.

Scientific area: Food microbiology

Keywords: cabbage, spoilage, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR, multispectral imaging, biopreservation and shelf-life extension.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νίκο Χωριανόπουλο για την ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, την εμπιστοσύνη και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την ερευνήτρια του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού-ΔΗΜΗΤΡΑ κ. Όλγα Παπαδοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της και τις συμβουλές της κατά τον σχεδιασμό και την πραγμάτωση της πειραματικής πορείας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών που δέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής και αφιέρωσαν χρόνο για την μελέτη της εργασίας μου.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τη διδάκτορα Αγγελική Δουκάκη για την πολύτιμη βοήθειά της και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής μου μελέτης τόσο κατά την πειραματική διαδικασία όσο και κατά την ανάλυση των δεδομένων και συγγραφή. Οι συμβουλές της ήταν πολύτιμες καθώς και η στήριξή της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την συνεργασία, τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Βοτανική προέλευση και χαρακτηριστικά του λάχανου.....	10
1.2. Θρεπτική αξία λάχανου και οι ευεργετικές ιδιότητές του.....	10
1.3. Αλλοίωση λάχανου.....	11
1.3.1. Μικροβιολογική αλλοίωση λάχανου.....	11
1.3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	12
1.3.1.3. <i>Salmonella enterica</i>	12
1.3.1.4. Μύκητες.....	13
1.3.2. Χημική αλλοίωση λάχανου.....	13
1.3.2.1. Ρυθμός αναπνοής.....	13
1.3.2.2. Απώλεια ύδατος.....	14
1.4. Συνθήκες αποθήκευσης λαχανικών για την αποφυγή χημικών και μικροβιολογικών αλλοιώσεων	14
1.4.1. Θερμοκρασία.....	14
1.4.2. Σχετική υγρασία.....	15
1.4.3. Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας, MAP (Modified Atmosphere Packaging).....	15
1.5. Φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης.....	16
1.5.1. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου, IR (Infrared Spectroscopy)	17
1.5.1.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).....	18
1.5.1.2. Πολυφασματική απεικόνιση, MSI (Multispectral Imaging Analysis)	18
1.6. Βιοπροστασία.....	20
Σκοπός.....	21
2. Υλικά και μέθοδοι.....	22
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	22
2.1.1. Διεξαγωγή προ-πειράματος για επιλογή του κατάλληλου τεχνολογικού μικροοργανισμού	23
2.1.2. Παρασκευή ζωμού	25
2.1.3. Προετοιμασία των παθογόνων, του τεχνολογικού μικροοργανισμού και του υπερκείμενου του (supernatant)	25
2.1.4. Προετοιμασία δειγμάτων	27
2.2. Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	29
2.3. Προσδιορισμός pH.....	31
2.4. Οργανοληπτικός έλεγχος.....	31
2.5. Φυσικοχημικές αναλύσεις	32
2.5.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	32

2.5.2. Πολυφασματική απεικόνιση, (Multispectral Imaging, MSI)	33
2.6. Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων.....	34
2.6.1. Μοντέλο για την εκτίμηση της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression – PLS-R)	34
3. Αποτελέσματα / Συζήτηση	36
3.1. Μικροβιολογικά αποτελέσματα.....	36
3.1.1. Καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών προσδιορισμού στον 1 ^ο κύκλο του πειράματος	36
3.1.2. Καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών προσδιορισμού στον 2 ^ο κύκλο του πειράματος	48
3.2. Αποτελέσματα μέτρησης pH.....	58
3.3. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου.....	62
3.4. Αποτελέσματα ταχέων μεθόδων.....	65
3.4.1. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με Μετασχηματισμό Fourier, FT-IR και εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R	65
3.4.2. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI με τη χρήση του αισθητήρα VideometerLab και εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R	68
3.4.3. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI με τη χρήση του αισθητήρα VideometerLab και εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R	69
4. Συμπεράσματα.....	71
Βιβλιογραφία.....	73

1. Εισαγωγή

1.1. Βοτανική προέλευση και χαρακτηριστικά του λάχανου

Τα σταυρανθή λαχανικά προέρχονται από φυτά της οικογένειας που είναι γνωστά στους βοτανολόγους ως *Cruciferae* ή αλλιώς *Brassicaceae* (Hidgon et al., 2007). Το λάχανο (*Brassica oleracea var capitata*) αποτελεί ένα σταυρανθές λαχανικό, το οποίο ανήκει στην τάξη *Brassicales* (Nakajima, S. et al., 2021) και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά λαχανικά που καλλιεργούνται παγκοσμίως. Ανήκει, όπως προαναφέρθηκε, στην οικογένεια *Cruciferae*, στην οποία κατηγοριοποιούνται και τα λαχανάκια Βρυξελλών, το μπρόκολο και το κουνουπίδι (Jagdish Singh et. al., 2006).

Το λάχανο αναπτύσσεται αρκετά σε δροσερό κλίμα και πιο συγκεκριμένα σε τιμές θερμοκρασίας που κυμαίνονται από 15 °C έως 18 °C και θεωρείται ένα φυτό ανθεκτικό σε χαμηλές θερμοκρασίες. Με βάση τη μορφολογία και το χρώμα τους, τα λάχανα διακρίνονται σε άσπρα λάχανα, κόκκινα λάχανα και λάχανα τύπου Savoy. Ειδικότερα, τα άσπρα λάχανα διακατέχουν κεφαλή ανοιχτού πράσινου χρώματος, συμπαγή και με σφαιρικό σχήμα ή κωνικό. Τα λάχανα τύπου Savoy χαρακτηρίζονται από γκριζοπράσινο χρώμα φύλλων και σγουρά φύλλα (Salunkhe & Kadam, 1998).

1.2. Θρεπτική αξία λάχανου και οι ευεργετικές ιδιότητές του

Τα λαχανικά καθίστανται σημαντικά για μια υγιεινή και ισορροπημένη διατροφή καθώς αποτελούν πηγή θρεπτικών συστατικών, βιταμινών και φυτικών ινών. Έτσι, η κατανάλωση φρέσκων λαχανικών αυξήθηκε κατά 30 % τις τελευταίες δεκαετίες (Stealth, et. al., 2020). Επιπρόσθετα, αποτελούν σημαντικές πηγές αντιοξειδωτικών και για αυτό τον λόγο, σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα και μελέτες *in vitro*, η κατανάλωσή τους συμβάλλει στην καταπολέμηση καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων. Πιο ειδικά, το λάχανο περιέχει ως αντιοξειδωτικές ουσίες το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο και διάφορες φαινολικές ενώσεις. Σύμφωνα με τους Jagdish Singh et al. (2006), οι διαφορετικές ποικιλίες λάχανου περιέχουν διαφορετική περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, οι διαφορές στις μέσες τιμές μεταξύ των ποικιλιών δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και δοκιμή πολλαπλών εύρους Duncan (DMRT) για τον προσδιορισμό των σημαντικών διαφορών μεταξύ των υλικών

δοκιμής. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές στο $p \leq 0,05$. Συνεπώς, για κάθε ποικιλία λάχανου τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 1.1: Αντιοξειδωτικές ουσίες σε διαφορετικές ποικιλίες λάχανου σε mg / 100 mg λάχανου.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΛΑΧΑΝΟΥ	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΟΥΤΕΪΝΗ	Α-ΤΟΚΟ- ΦΕΡΟΛΗ	Β- ΚΑΡΟΤΕ- ΝΙΟ	ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ
ΑΣΠΡΟ ΛΑΧΑΝΟ	9,65	0,137	0,107	0,050	18,74
ΚΟΚΚΙΝΟ ΛΑΧΑΝΟ	24,38	0,046	0,261	0,044	101,30
ΛΑΧΑΝΟ Savoy	14,49	0,125	0,120	0,074	34,60

Οι ευεργετικές ιδιότητες του λάχανου, και γενικότερα των σταυρανθών λαχανικών, συνδέονται με την ύπαρξη ενώσεων θείου που ονομάζονται γλυκοζινολίτες, GLS. Δομικά κάθε γλυκοζινολίτης περιέχει μια ομάδα β-D-θειογλυκόζης, μια ομάδα σουλφονικής οξίμης και μια πλευρική αλυσίδα που περιέχει αμινοξύ. Τόσο οι γλυκοζινολίτες όσο και τα προϊόντα υδρόλυσής τους προσδίδουν στο λάχανο τις αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές του ιδιότητες (Esteve, 2020). Κάθε σταυρανθές λαχανικό, παρουσιάζει διαφορετική περιεκτικότητα γλυκοζινολιτών. Οι κύριοι γλυκοζινολίτες που περιέχει το λάχανο είναι η γλυκομπρασικίνη, η γλυκοϊμπερίνη και η σινιγκρίνη (Cartea & Velasco, 2007). Τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης γλυκοζινολιτών που περιέχονται είναι η ινδόλη-2-καρβινόλη και η σουλφοραφάνη (Esteve, 2020). Σχετικά με την αντιμικροβιακή τους δράση, η σουλφοραφάνη εμποδίζει σημαντικά την ανάπτυξη διάφορων στελεχών των παθογόνων *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*. (Vig et al., 2009). Τέλος, σχετικά με την αντικαρκινική τους δράση, η σουλφοραφάνη έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη και η ινδόλη-3-καρβινόλη δρα έναντι του καρκίνου του προστάτη, του μαστού καθώς και του μαστού (Higdon et al., 2007).

1.3. Αλλοίωση λάχανου

1.3.1. Μικροβιολογική αλλοίωση λάχανου

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι καταναλωτές ως προς την κατανάλωση φρέσκων λαχανικών ως μέρος μιας υγιεινής διατροφής. Ωστόσο, τα

φρέσκα λαχανικά χαρακτηρίζονται από μικρή διάρκεια ζωής καθώς η υποβάθμισή τους μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες αλλά κυρίως λόγω της αναπνευστικής δραστηριότητας κατά τη συσκευασία τους μετά τη συγκομιδή και της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Del Nobile, M.A et. al., 2006).

1.3.1.1. *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* αποτελεί ένα Gram θετικό βακτήριο που είναι θετικό στην καταλάση. Η ασθένεια που προκαλείται από το συγκεκριμένο παθογόνο, η λιστερίωση, αν και δεν συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πιο κοινές και συχνές τροφιμογενείς λοιμώξεις, διακατέχει το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας (Rogalla et. al., 2023). Η *Listeria monocytogenes* αποτελεί μία σημαντική απειλή στον τομέα των τροφίμων καθώς αποτελεί και ένα βακτήριο αρκετά ανθεκτικό σε χαμηλές θερμοκρασίες και όξινο pH, δηλαδή ακόμη και σε συνθήκες που είναι αντίξοες για τους περισσότερους μικροοργανισμούς (Tirloni, Erica et al., 2024). Από το συγκεκριμένο παθογόνο μολύνονται τα λάχανα που λιπαίνονται από φρέσκο ή επεξεργασμένο λίπασμα όπως και εκείνα που αποθηκεύονται το χειμώνα λόγω πολλαπλασιασμού του παθογόνου (Χ. Προεστός, Π. Μαρκάκη, 2017).

1.3.1.2. *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli* αποτελεί ένα Gram αρνητικό βακτήριο βάκιλλο και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Αποτελεί, επίσης, έναν προαιρετικά αναερόβιο μικροοργανισμό, θετικό στην καταλάση και αρνητικό στην οξειδάση (Mueller and Tainter, 2023). Το συγκεκριμένο γένος χωρίζεται σε διάφορους τύπους και σερότυπους από τους οποίους αρκετοί καθίστανται παθογόνοι για τον άνθρωπο (Χ. Προεστός, Π. Μαρκάκη, 2017) . Συνηθέστερα η επιμόλυνση των λαχανικών, και ειδικότερα του λάχανου, από *E. coli* πραγματοποιείται πριν τη συγκομιδή λόγω μολυσμένου νερού, κοπριάς που χρησιμοποιείται ως λίπασμα, μολυσμένων ζώων και εδάφους (Wachtel et al., 2002).

1.3.1.3. *Salmonella enterica*

Η *Salmonella enterica*, είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο που ανήκει στα εντεροβακτηριοειδή και αποτελεί έναν παθογόνο μικροοργανισμό που συνδέεται με λοιμώξεις μετέπειτα από την κατανάλωση λαχανικών. Η ανάπτυξη του συγκεκριμένου παθογόνου πραγματοποιείται στη βέλτιστη θερμοκρασία των 37° C και η ανάπτυξή

του περιορίζεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξή του επηρεάζεται και από τις τιμές και ειδικότερα περιορίζεται σε αρκετά όξινες συνθήκες (Χ. Προεστός, Π. Μαρκάκη, 2017).

1.3.1.4. Μύκητες

Σύμφωνα με τους Aminu, F. και Ali, M (2017) έπειτα από την πραγματοποίηση των κατάλληλων αναλύσεων σε πενήντα αλλοιωμένα λάχανα από διαφορετικούς πωλητές βρήκαν ότι στα χαλασμένα λάχανα εντοπίζονται κυρίως οι μύκητες *Rhizopus stolonifera* (σε ποσοστό 31 %), ο *Aspergillus spp.* (σε ποσοστό 34 %) και ο *Penicillium* (σε ποσοστό 32 %). Οι μύκητες είναι μικροοργανισμοί, οι οποίοι αποτελούνται από υφές που σχηματίζουν τα μυκήλια. Για τους περισσότερους μύκητες, οι άριστες συνθήκες θερμοκρασίας στις οποίες αναπτύσσονται κυμαίνονται μεταξύ των 25 °C και 30 °C και αναπτύσσονται περισσότερο σε τιμές pH που κυμαίνονται μεταξύ 4 και 7 (Ζερβάκης, 2011). Οι μύκητες εμπλέκονται όλο και περισσότερο ως παράγοντες αλλοίωσης σε αρκετά λαχανικά. Τα λαχανικά είναι δυνατό να επιμολυνθούν από μύκητες μέσω του εδάφους, του νερού, την επεξεργασία και κατά τη συγκομιδή (Umboh,S.D.,et.al.2016).

1.3.2. Χημική Αλλοίωση Λάχανου

1.3.2.1. Ρυθμός αναπνοής

Η διαδικασία της αναπνοής, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες υποβάθμισης της ποιότητας των νωπών λαχανικών καθώς καταναλώνονται αναπνευστικά υποστρώματα (σάκχαρα και οργανικά οξέα) που απαιτούνται κατά την πραγματοποίησή της (Chitarra and Chittara 2005). Γενικά, όταν ο ρυθμός αναπνοής αυξάνεται, τα συγκεκριμένα προϊόντα τείνουν να έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής. Σύμφωνα με τον FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) ως αναπνοή ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία τα φυτά λαμβάνουν οξυγόνο, O₂ με αποτέλεσμα την πραγματοποίηση της οξειδωσης κατά την οποία διασπώνται οι υδατάνθρακες σε διοξείδιο του άνθρακα, CO₂ και νερό, H₂O. Συνακόλουθα, κατά τη συγκεκριμένη αντίδραση παράγεται ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Γενικά, η διαδικασία της αναπνοής αποτελεί μία συνεχόμενη διαδικασία στο αναπτυσσόμενο φυτό καθώς παράγονται υδατάνθρακες στα λάχανα χωρίς να σταματήσει η παραγωγή λόγω βλάβης στο φυτικό ιστό. Ο ατμοσφαιρικός αέρας αποτελείται από περίπου 20 % v/v οξυγόνο και συνεπώς αυτή αποτελεί την επαρκή ποσότητα για την ορθή λειτουργία

της αναπνοής. Η έλλειψη οξυγόνου < 2 % οδηγεί στη διαδικασία της ζύμωσης κατά την οποία οι υδατάνθρακες διασπώνται σε διοξείδιο του άνθρακα, CO₂ και αλκοόλη που προκαλεί δυσάρεστες γεύσεις στα προϊόντα καθώς και μείωση της διάρκειας ζωής αυτών(FAO,2024).

1.3.2.2. Απώλεια ύδατος

Ένας ακόμη παράγοντας που οδηγεί σε ποιοτική υποβάθμιση των λαχανικών αποτελεί η απώλεια ύδατος. Σύμφωνα με τον FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, στα οποία εντάσσεται και το λάχανο, αποτελούν προϊόντα που χάνουν γρήγορα νερό. Γενικά, για την διατήρηση του χρόνου ζωής των προϊόντων, ο ρυθμός απώλειας ύδατος από τα προϊόντα θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος και για αυτό θεμιτή είναι αποθήκευση των προϊόντων σε ατμόσφαιρα με παρουσία υγρασίας. Πιο ειδικά, τα φυτά λαμβάνουν νερό από το έδαφος μέσω των ριζών, το οποίο περνάει από τους μίσχους και φτάσει στα φύλλα από τα οποία χάνεται με τη μορφή υδρατμών ανάλογα με τις ατμοσφαιρικές συνθήκες. Η διέλευση του νερού μέσα από τα φυτά ονομάζεται ρεύμα διαπνοής. Μετά τη συγκομιδή τα φρέσκα προϊόντα χάνουν νερό και συνεπώς η περιεκτικότητα του νερού που έχει παρθεί κατά την καλλιέργεια εξαντλείται με την πάροδο του χρόνου. Με αυτό τον τρόπο, η σταδιακή απώλεια του νερού οδηγεί σε συρρίκνωση του προϊόντος και αλλοίωση της υφής του (FAO, 2024).

1.4. Συνθήκες αποθήκευσης των λαχανικών για αποφυγή χημικών και μικροβιολογικών αλλοιώσεων

Υπάρχουν διάφορες συνθήκες υπό τις οποίες μπορεί να αποθηκευτεί το λάχανο, και γενικά τα λαχανικά, με στόχο τον περιορισμό τόσο των χημικών όσο και των μικροβιολογικών αναλύσεων.

1.4.1. Θερμοκρασία

Ένας παράγοντας που καθορίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποτελεί η θερμοκρασία (Hoagland et al., 2018). Γενικά, τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν και στα λαχανικά, αναπτύσσονται με αργό ρυθμό σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 3° C έως 10° C, ωστόσο η χαμηλή θερμοκρασία περιορίζει και την πραγματοποίηση ορισμένων ανεπιθύμητων χημικών αντιδράσεων καθώς και το φαινόμενο της αναπνοής. Το λάχανο, το οποίο μελετάται και στην

παρούσα ερευνητική εργασία, χαρακτηρίζεται με βέλτιστη τιμή αποθήκευσης που κυμαίνεται στο εύρος από -1 έως 1° C με σχετική υγρασία μεγαλύτερη από 85 % (Χ. Προεστός, Π. Μαρκάκη, 2017) καθώς αποτελεί ένα ευπαθές λαχανικό και εάν δεν καταναλωθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, θα χρειαστεί άμεση αποθήκευση για να αποφευχθεί η υποβάθμιση της ποιότητάς του (Luka, B.S. et al., 2024).

1.4.2. Σχετική Υγρασία

Κάθε λαχανικό χαρακτηρίζεται με μία βέλτιστη τιμή υγρασίας σύμφωνα με την οποία είναι θεμιτή αποθήκευσή τους στους χώρους αποθήκευσης υπό ψύξη για την διατήρησή τους. Για το κάθε ένα λαχανικό διαφέρει η βέλτιστη τιμή σχετικής υγρασίας, ωστόσο τα περισσότερα χρειάζονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 85 %. Τιμή υγρασίας μεγαλύτερη από τη βέλτιστη τιμή προκαλεί ανάπτυξη μυκήτων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και αντίθετα, τιμή υγρασίας μικρότερη από την βέλτιστη τιμή μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στην υφή του λάχανου και αφυδάτωση (Χ. Προεστός, Π. Μαρκάκη, 2017).

1.4.3. Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας, MAP (Modified Atmosphere Packaging)

Η συντήρηση των λαχανικών μπορεί να επιτευχθεί με τη τεχνική συντήρησης με τη χρήση της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας, μια τεχνική που συμβάλλει στην επιβράδυνση της χημικής αλλοίωσης και της μικροβιακής ανάπτυξης μέσω του κατάλληλου συνδυασμού αερίων. Ο συνδυασμός των αερίων πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να διαφέρει από τη σύσταση του αέρα και συνηθέστερα, ο συνδυασμός των αερίων με χαμηλά επίπεδα O₂ και υψηλές ποσότητες CO₂ και N₂, που υποβάλλονται σε επαρκείς θερμοκρασίες ψύξης, ιδανικά σε θερμοκρασία ≤ 4 °C (Cliffe-Byrnes et al., 2003), προωθούν την μη ανάπτυξη μικροοργανισμών, καθυστερούν τις χημικές αλλοιώσεις και ταυτόχρονα διατηρούν τις οργανοληπτικές ιδιότητες.

Ωστόσο, ο κατάλληλος συνδυασμός των αερίων στη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, MAP θα πρέπει να ελέγχεται καθώς λανθασμένη σύσταση μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα του προϊόντος. Συνεπώς, για τα περισσότερα λαχανικά, η αναλογία των αερίων έχει ως εξής: για το αέριο O₂ η περιεκτικότητα κυμαίνεται σε ποσοστό μεταξύ 2 έως 5 % ενώ για το CO₂ κυμαίνεται σε ποσοστό 3 έως 8% ώστε να μεγιστοποιούν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Moleyar και Narasimham,

1994). Ειδικότερα για το ψιλοκομμένο λάχανο, η βέλτιστη συγκέντρωση οξυγόνου για αποθήκευση κυμαίνεται σε εύρος από 5 έως 7,5% σύμφωνα με τον Gorny (2001). Οι Kaji et al. (1993) ανέφεραν τις βέλτιστες συγκεντρώσεις των αερίων για διατήρηση του τεμαχισμένου λάχανου από 5 έως 10% για το O₂ και από 5 έως 15% για το CO₂. Επιπρόσθετες έρευνες, σχετικά με την αναλογία των αερίων, καταδεικνύουν τα ακόλουθα : Σύμφωνα με τον Gorny (2001), η ιδανική αναλογία αερίων για τη συντήρηση τεμαχισμένου λάχανου με τη τεχνική της τροποποιημένης ατμόσφαιρας, MAP είναι 5-7,5% O₂ και 15% CO₂, ενώ οι Hu et al. (2007) πρότειναν την αναλογία 2% O₂ και 13% συγκέντρωση CO₂.

1.5. Φασματοσκοπικές Τεχνικές Ανάλυσης

Με τη χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών αναλύσεως μελετάται η αλληλεπίδραση της ύλης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία αποτελεί μορφή ενέργειας. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές διακρίνονται κυρίως σε δύο κατηγορίες, σε φασματοσκοπικές τεχνικές απορρόφησης και φασματοσκοπικές τεχνικές εκπομπής ανάλογα με το αν πραγματοποιείται απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από την ύλη ή εκπομπή σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, αντίστοιχα (Θ.Π. Χατζηιωάννου–Μ.Α. Κουππάρη, 2010).

Με τη χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών αναλύσεως είναι δυνατή η λήψη φασμάτων με τα οποία καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των φασμάτων με τα οποία καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των διάφορων χημικών ενώσεων. Στην περίπτωση απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από το δείγμα (φασματοσκοπία απορρόφησης), πραγματοποιείται η λήψη φασμάτων απορρόφησης, δηλαδή φασμάτων απορρόφησης, Α συναρτήσει του μήκους κύματος, λ ή του κυματαριθμού, $\tilde{\nu}$. Ο κυματαριθμός, $\tilde{\nu}$ χρησιμοποιείται, κυρίως, στην φασματοσκοπία υπέρυθρου και ορίζεται ως το αντίστροφο του μήκους κύματος, λ σύμφωνα με τον τύπο:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad [1]$$

Συνεπώς, με τη χρήση των φασμάτων απορρόφησης, γνωρίζοντας την απορρόφηση, Α καθίσταται δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των χημικών ουσιών σύμφωνα με τον νόμο του Beer – Lambert :

$$A = \epsilon bc \quad [2]$$

Όπου, A: η απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος,

ε: η γραμμομοριακή απορροφητικότητα,

b: το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας και

c: η συγκέντρωση της εκάστοτε χημικής ουσίας.

(Θ.Π. Χατζηιωάννου–Μ.Α. Κουμπάρη, 2010)

1.5.1. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου, IR (Infrared Spectroscopy)

Η φασματοσκοπία Υπέρυθρου, IR (Infrared Spectroscopy) αποτελεί μια φασματοσκοπική τεχνική απορρόφησης καθώς κατά την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται απορρόφηση μέρους της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ανάλογα με την ενέργεια που απαιτείται ώστε το μόριο να διεγερθεί και να μεταβεί σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση, όπως προαναφέρθηκε. Οι απορροφήσεις που πραγματοποιούνται οφείλονται σε δονήσεις τάσεως (stretching vibrations) και δονήσεις κάμψεως (bending vibrations) μεταξύ των δεσμών σε άτομα πολικών μορίων εφόσον η διπολική τους ροπή μεταβληθεί. Ένα μόριο απορροφά ισχυρότερα όσο πιο ισχυρή είναι και η διπολική ροπή του. Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με τις δονήσεις, οι δονήσεις τάσεως αφορούν τις δονήσεις κατά μήκος του χημικού δεσμού μεταξύ των ατόμων στα μόρια και μπορεί να είναι είτε συμμετρικές είτε ασύμμετρες. Οι δονήσεις κάμψεως αφορούν τις δονήσεις κατά τις οποίες αλλάζει η γωνία μεταξύ του δεσμού ανάμεσα στα άτομα και διακρίνονται σε ψαλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), συστρεφόμενη (twisting) και παλλόμενη (wagging). Οι περισσότερες δονήσεις πραγματοποιούνται ανάμεσα σε δύο κυρίως άτομα που συνδέονται και θεωρείται ότι εκτελούν ταλάντωση.

Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας εκτείνεται στο εύρος μήκους κύματος, λ από 0.75 έως 1000 μm ή σε κυματάριθμο, $\tilde{\nu}$ από 10 έως 13300 cm⁻¹. Επιπρόσθετα, διαχωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές και πιο συγκεκριμένα στο εγγύς υπέρυθρο, NIR (Near Infrared), σε εύρος 0.75 έως 2.5 μm ή 4000 έως 13300 cm⁻¹, στο μέσο υπέρυθρο, MIR (Mid Infrared), σε εύρος 2.5 έως 25 μm ή 40 έως 4000 cm⁻¹ και στο άπω υπέρυθρο, FIR (Far Infrared), σε εύρος 25 έως 1000 μm ή 10 έως 400 cm⁻¹ (Θ. Π. Χατζηιωάννου-Μ.Α.Κουμπάρη, 2010).

1.5.1.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FTIR αποτελεί μία τεχνική με ιδιαίτερη ανάπτυξη τα τελευταία δέκα χρόνια (Diem M., 2002) και παρέχει ένα συγκεκριμένο “δακτυλικό αποτύπωμα” για κάθε δείγμα λόγω δόνησης των μορίων στην υπέρυθρη ακτινοβολία (Kodogiannis et. al., 2014). Με τη χρήση του φασματόμετρου FTIR καθίσταται δυνατή η συλλογή φασμάτων στην φασματική περιοχή των 400 cm^{-1} έως 4000 cm^{-1} (Griffiths P.R., et. al., 1986). Κάθε φασματόμετρο FTIR αποτελείται από μία πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, μια πηγή λέιζερ, ένα συμβολόμετρο Michelson, τον χώρο του δείγματος, τον ανιχνευτή και έναν υπολογιστή. Πιο συγκεκριμένα, η υπέρυθρη ακτινοβολία εκπέμπεται από την πηγή και μέσω του διαχωριστή δέσμης, 50 % αυτής φτάνει το ένα κάτοπτρο του συμβολόμετρου Michelson που είναι κινητό ενώ το άλλο 50 % φτάνει στο άλλο του συμβολόμετρου που είναι σταθερό. Οι δύο δέσμες αντανακλώνται και ανασυνδυάζονται και μέρος της νέας δέσμης ακτινοβολίας απορροφάται από το δείγμα. Ακολούθως, σήμα φτάνει στον ανιχνευτή και στον υπολογιστή όπου με τη χρήση μετασχηματισμού Fourier προκύπτει το φάσμα για κάθε μόριο (Ταραντίλης & Παππάς Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2005) (Fadlelmoula et. al., 2022).

1.5.1.2. Πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI)

Η τεχνική της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI (Multispectral Imaging Analysis) θεωρείται ως μία τεχνική με πολλές προοπτικές ως προς την αξιολόγηση και τον έλεγχο της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων. Αποτελεί μια τεχνική με κύριο πλεονέκτημα τον έλεγχο της αλλοίωσης ενός τροφίμου χωρίς την καταστροφή του εκάστοτε δείγματος προς μελέτη και με τη χρήση της εξετάζεται επιφανειακά η χημική σύσταση των δειγμάτων (Tsakanikas et. al., 2016).

Γενικά, η συγκεκριμένη τεχνική συνδυάζει τη τεχνολογία απεικόνισης με την φασματοσκοπία. Πιο συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης, πραγματοποιείται η λήψη εικόνων σε μήκη κύματος εντός ενός συγκεκριμένου εύρους κατά μήκος όλου του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Ειδικότερα, τα συγκεκριμένα μήκη κύματος που επιλέγονται εκτείνονται από την περιοχή του ορατού έως την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου κατά μήκος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Επίσης, είναι δυνατό να διακρίνονται μεταξύ τους με φίλτρα ή με τη χρήση οργάνων που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία ως προς

τα συγκεκριμένα μήκη κύματος. Συνεπώς, με την λήψη εικόνων από τα δείγματα προς μελέτη καθίσταται δυνατή η παρατήρηση επιφανειακά δεδομένων που με το ανθρώπινο μάτι θα ήταν αδύνατη η παρατήρησή τους (“Multispectral Imaging”). Μέχρι σήμερα, τα δεδομένα που λαμβάνονται με τις τεχνικές πολυφασματικής απεικόνισης με στόχο της εκτίμηση της αλλοίωσης ενός τροφίμου, αναλύονται με έναν συγκεκριμένο τρόπο. Ειδικότερα, πραγματοποιείται η χρήση των μέσων εντάσεων των εκάστοτε δειγμάτων σε συγκεκριμένα εύρη μηκών κυμάτων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ακολούθως, μετά την λήψη των παραπάνω τιμών, πραγματοποιείται η εισαγωγή τους σε ένα πρόγραμμα στο οποίο το μαθηματικό μοντέλο προβλέπει την Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, OMX (Tsakanikas et. al., 2016).

Για την εφαρμογή της τεχνικής της πολυφασματικής απεικόνισης και συνακόλουθα για τη λήψη πολυφασματικών εικόνων, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η χρήση του αισθητήρα VideoMeterLab καθώς και του αισθητήρα VideometerLite. Αρχικά, με τη χρήση του αισθητήρα VideoMeterLab είναι δυνατή η λήψη πολυφασματικών εικόνων σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος στο εύρος 405 έως 970 nm. Για τη λήψη των εικόνων κάθε δείγμα τοποθετείται στο κάτω μέρος μιας σφαίρας Ulbricht, η οποία χαρακτηρίζεται από μία λευκή matte επίστρωση με στόχο ο φωτισμός του δείγματος να είναι διάχυτος και ομοιογενής. Επιπρόσθετα, στη σφαίρα Ulbricht οι 18 δίοδοι εκπομπής φωτός (LED) που χαρακτηρίζονται από κατανομή ακτινοβολίας στενής ζώνης στο φάσμα, βρίσκονται κατά μήκος της σφαίρας, δίπλα-δίπλα. Πριν από την τοποθέτηση του δείγματος στη σφαίρα για τη λήψη των πολυφασματικών εικόνων, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του οργάνου Όσον αφορά το χρώμα, τη γεωμετρία και τον αυτοματισμό για άμεση σύγκριση εικόνων. Τέλος, δημιουργείται ένας υπερκύβος δεδομένων για κάθε δείγμα και οι εικόνες που λαμβάνονται υφίστανται επεξεργασία με τη χρήση λογισμικού ώστε να αφαιρεθούν τα περιττά τμήματα από την εικόνα και να πραγματοποιηθεί κατάλληλα η ανάλυση (Tsakanikas et. al., 2016). Το VideometerLite είναι ένα φορητό και ασύρματο όργανο που αποκτά εικόνες σε επτά διαφορετικά μήκη κύματος που κυμαίνονται από 405 nm έως 850 nm. Αναλυτικά, αυτά τα μήκη κύματος είναι 405, 460, 535, 590, 621, 660 και 850 nm (Angeliki Doukaki et al., 2024).

1.6. Βιοπροστασία

Κάθε λαχανικό χαρακτηρίζεται από μία εγχώρια μικροχλωρίδα, η οποία ποικίλει ανάλογα με τις εδαφολογικές συνθήκες καλλιέργειας, το κλίμα της καλλιέργειας καθώς και τη μετέπειτα επεξεργασία τους. Μελέτες καταδεικνύουν ότι διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) επιδρούν στη μείωση της πιθανότητας αλλοίωσης, τόσο της χημικής όσο και της μικροβιολογικής, των λαχανικών (Sofia P.M. Silva, et. al., 2023). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) που χρησιμοποιούνται συνήθως, λόγω της αποτελεσματικής τους δράσης, είναι τα στελέχη *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*) και *Lactiplantibacillus pentosus* (*Lactobacillus pentosus*). Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη *Lactiplantibacillus pentosus* B281 και *Lactiplantibacillus plantarum* B282 αποτελούν οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), τα οποία έχουν απομονωθεί από τη μικροχλωρίδα ζυμούμενων επιτραπέζιων ελιών. Τα συγκεκριμένα στελέχη χαρακτηρίζονται με προβιοτικές καθώς και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Anthoula A. Argyri, et. al., 2014). Επιπρόσθετα, το στέλεχος *Lactiplantibacillus pentosus* L33, όπως αποδείχθηκε από μία σειρά in vitro δοκιμών σύμφωνα με τους Argyri, et. al. (2014) χαρακτηρίζεται από επιθυμητές προβιοτικές ιδιότητες όπως και άλλα στελέχη του γένους *Lactobacillus*. Αποτελεί ένα στέλεχος που απομονώνεται από ζυμούμενα προϊόντα κρέατος.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη της βιοπροστατευτικής δράσης οξυγαλακτικών καλλιεργειών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών στη συντήρηση του λάχανου. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία ήταν στελέχη της *Listeria monocytogenes* και στελέχη του *Escherichia coli* O157:H7. Εξετάστηκαν τρεις περιπτώσεις δειγμάτων. Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται στα δείγματα λάχανου ψεκασμένα με κύτταρα του τεχνολογικού μικροοργανισμού *Lactoplantibacillus pentosus* B281 (δείγματα Μ), η δεύτερη περίπτωση αναφέρεται στα δείγματα λάχανου ψεκασμένα με το υπερκείμενο (supernatant) του τεχνολογικού μικροοργανισμού (δείγματα Σ) και η τρίτη περίπτωση στα δείγματα λάχανου ψεκασμένα με ζωμό (δείγματα Β). Και στις τρεις περιπτώσεις τα δείγματα λάχανου συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας υπό κενό, MAP και η αποθήκευσή τους πραγματοποιήθηκε τόσο στους 4 °C όσο και 10 °C. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων και η συσχέτιση της μικροβιολογικής και χημικής αλλοίωσης μέσω της χρήσης της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FTIR και της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Πειραματικός Σχεδιασμός

Η πειραματική διαδικασία χωρίστηκε σε δύο κύκλους πειραμάτων και οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

- Δύο στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (FMCC-B127 & FMCC-B133),
- Δύο στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (FMCC-B289 & FMCC-B290),
- Ο αντιμικροβιακός τεχνολογικός μικροοργανισμός FMCC-*Lactiplantibacillus pentosus* B281.

Και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας, τα δείγματα λάχανου συντηρήθηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας υπό κενό, MAP (Modified Atmosphere Packaging) και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C και 10 °C. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν τρεις περιπτώσεις δειγμάτων. Όπως προαναφέρθηκε η πρώτη περίπτωση αποτελούσε δείγματα λάχανου που ψεκάστηκαν με κύτταρα του τεχνολογικού μικροοργανισμού *Lactiplantibacillus pentosus* B281 (δείγματα M) , η δεύτερη περίπτωση δείγματα λάχανου που ψεκάστηκαν με υπερκείμενο (supernatant) του τεχνολογικού μικροοργανισμού (δείγματα S) και η τρίτη περίπτωση δείγματα λάχανου που ψεκάστηκαν με ζωμό λαχανικών (δείγματα B). Και στις τρεις περιπτώσεις, τα δείγματα λάχανου είχαν εμβολιαστεί με στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών, ανάλογα με τον κύκλο του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, στον πρώτο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας, τα δείγματα λάχανου ψεκάστηκαν με μείγμα δύο στελεχών του παθογόνου *Listeria monocytogenes* (FMCC-B127 & FMCC-B133) και μελετήθηκε η δράση του τεχνολογικού μικροοργανισμού *Lactiplantibacillus pentosus* καθώς και του υπερκείμενού του (supernatant) έναντι αυτών. Στον δεύτερο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας, τα δείγματα λάχανου ψεκάστηκαν με μείγμα δύο στελεχών του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 (FMCC-B289 & FMCC-B290) και, ομοίως, μελετήθηκε η δράση του τεχνολογικού μικροοργανισμού *Lactiplantibacillus pentosus* καθώς και του υπερκείμενού του (supernatant).

2.1.1. Διεξαγωγή προ-πειράματος για επιλογή του κατάλληλου τεχνολογικού αντιμικροβιακού μικροοργανισμού

Για τη μελέτη της βιοπροστατευτικής δράσης οξυγαλακτικών καλλιεργειών έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών στη συντήρηση του λάχανου, πραγματοποιήθηκε προ-πείραμα κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκαν 9 τεχνολογικοί μικροοργανισμοί (βακτήρια) με αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι 8 παθογόνων μικροοργανισμών. Τόσο οι τεχνολογικοί όσο και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί παραλήφθηκαν κωδικοποιημένοι και παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 2.1: Παρουσίαση των τεχνολογικών μικροοργανισμών (βακτηρίων) με αντιμικροβιακές ιδιότητες.

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ °C ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΠΗΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> (B-281)	MRS	30	Ζυμούμενες ελιές	Doulgeraki et al., 2013
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (B-282)	MRS	30	Ζυμούμενες ελιές	Doulgeraki et al., 2013
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (T571(1))	MRS	30	Άλμη τυριού φέτα	Pavli et al., 2016
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (FMX3)	MRS	30	Άλμη λευκού τυριού	Kamarinou et al., 2022
<i>Lactococcus lactis</i> (SMX2)	MRS	37	Ημίκληρο τυρί	Kamarinou et al., 2022
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (L125)	MRS	30	Ζυμούμενο κρέας	Pavli et al., 2016
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> (L33)	MRS	30	Ζυμούμενο κρέας	Pavli et al., 2016
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (T571(2))	MRS	30	Άλμη τυριού φέτα	Pavli et al., 2016

Πίνακας 2.2.: Παρουσίαση των παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή του προ-πειράματος.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	ΚΩΔΙΚΟΣ
<i>Salmonella enteritis</i>	B286
<i>Staphylococcus aureus</i>	B135
<i>Salmonella enterica</i>	B139
<i>Staphylococcus aureus</i>	B134
<i>Escherichia coli</i>	B290
<i>Listeria monocytogenes</i>	B127

<i>Escherichia coli</i>	B289
<i>Listeria monocytogenes</i>	B133

Για τη διεξαγωγή του προ-πειράματος πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη τόσο των τεχνολογικών όσο και των παθογόνων μικροοργανισμών σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα. Όλα τα στελέχη, τόσο των παθογόνων όσο και των τεχνολογικών, μικροοργανισμών ανήκουν στη συλλογή καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και πάρθηκαν από καλλιέργειες αποθέματος που περιείχαν 20 % γλυκερόλη στους -80 °C. Αρχικά, Όσον αφορά τα τεχνολογικά βακτήρια, πάρθηκαν 20 μl και εμβολιάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με MRS broth (Ref. 40172852, Biolife, Italiana S.r.l Milano, Italy) (1^η ανανέωση) και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες σε κλίβανο των 30 °C. Για κάθε τεχνολογικό βακτήριο, ανανέωση έγινε σε 2 επαναλήψεις και επιλέχθηκε η καλύτερη ανάπτυξη σύμφωνα με τον βαθμό θολώματος στο δοκιμαστικό σωλήνα. Η επόμενη ανανέωση, πριν από την χρήση τους στο προ-πείραμα, πραγματοποιήθηκε, ομοίως, σε MRS broth αφότου πάρθηκαν 20 μl από την 1^η ανανέωση. Επιπρόσθετα, πριν από την χρήση τους στο προ-πείραμα, πάρθηκαν 100 μl από την 1^η ανανέωση των τεχνολογικών, τα οποία εμβολιάστηκαν σε ζυμό όπου πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξή τους. Μετέπειτα, σχετικά με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, κύτταρά τους εμβολιάστηκαν σε σωληνάκια με 15 ml Tryptone Soy Broth (TSB, NCM0019A, Neogen, Kansas, MO, USA) και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37 °C για 48 ώρες (1^η ανανέωση). Η επόμενη ανανέωση των παθογόνων πραγματοποιήθηκε πριν τη διεξαγωγή του προ-πειράματος, ομοίως, σε TSB broth. Συνεπώς, μετά την προετοιμασία των τεχνολογικών βακτηρίων και των παθογόνων, πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό TSB agar η επιφανειακή επίστρωση με κύτταρα των παθογόνων που αναφέρονται στο Πίνακα 5. Σε αυτά, σε αντιδιαμετρική θέση, με τη χρήση πιπέτας, σχηματίστηκαν spot εμβολιάζοντας με 5 μl από τα κύτταρα των τεχνολογικών μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, για τη δημιουργία των spot στα τρυβλία παρασκευάστηκαν σωληνάκια με ανανεώσεις των τεχνολογικών σε MRS broth σε ζυμό καθώς, επίσης, πραγματοποιήθηκε η λήψη του υπερκείμενου (supernatant) των τεχνολογικών μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ως κατάλληλος τεχνολογικός μικροοργανισμός κρίθηκε ο *Lactiplatibacillus pentosus* B281 λόγω της ανασταλτικής του δράσης έναντι των στελεχών των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* O157:H7.

2.1.2. Παρασκευή ζωμού

Για την παρασκευή του ζωμού λαχανικών ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία από τους Manios et. al. (2013). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αγορά από τοπικό κατάστημα δύο τεμαχίων μαρουλιού (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*) και δύο τεμαχίων λάχανου (*Brassica oleracea*). Στο εργαστήριο, αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα από το κάθε μαρούλι και αφού πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση της κεφαλής και έμειναν τα φύλλα, ζυγίστηκαν από αυτά 250 g με τη χρήση αναλυτικού ζυγού. Ακολούθως, τα φύλλα του μαρουλιού που ζυγίστηκαν πλύθηκαν με νερό βρύσης ώστε να απομακρυνθούν τα οργανικά άλατα και βυθίστηκαν σε λεκάνη που περιείχε υδατικό διάλυμα χλωρίνης (200 ppm υποχλωριώδες νάτριο) για το χρονικό διάστημα των 5 min. Μετέπειτα, ξεπλύθηκαν επαρκώς με νερό βρύσης και απλώθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής για 30 min ώστε να στεγνώσουν. Με τον ίδιο τρόπο, πραγματοποιήθηκε και η διαχείριση του λάχανου.

Έπειτα από το στέγνωμα των λαχανικών, αναμείχθηκαν με 250 ml απιονισμένου νερού, το οποίο είχε προηγουμένως θερμανθεί στη θερμοκρασία των 45 °C, ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση blender για 1 min σε υψηλή ταχύτητα. Ο πολτός που δημιουργήθηκε θερμάνθηκε στους 80 °C, υπό ανάδευση, με στόχο την επίτευξη της ομοιογένειας για το χρονικό διάστημα των δύο ωρών. Μετά το πέρας των δύο ωρών, πραγματοποιήθηκε διήθηση με χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman 39 x 39, 50 pcs ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα και να κρατηθεί ο ζωμός (διαυγές υγρό). Ακολούθως, ο ζωμός τοποθετήθηκε σε φιάλη Duran των 100 ml και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Τέλος, ο αποστειρωμένος ζωμός χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία για τον ψεκασμό των δειγμάτων ελέγχου, B και ως μέσο για την ανάπτυξη της υποκαλλιέργειας του *L. pentosus* που χρησιμοποιήθηκε για τον ψεκασμό των δειγμάτων M και S (και κύτταρα και υπερκείμενο).

2.1.3. Προετοιμασία παθογόνων του τεχνολογικού μικροοργανισμού και του υπερκείμενου του (supernatant)

Πριν από την προετοιμασία των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των παθογόνων μικροοργανισμών, του τεχνολογικού μικροοργανισμού καθώς και του υπερκείμενου του τεχνολογικού μικροοργανισμού (supernatant).

Αρχικά, σχετικά με τους παθογόνους, για τον πρώτο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, τα FMCC-B127 και FMCC-B133, και για τον δεύτερο κύκλο χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7, FMCC-B289 και FMCC-B290. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε και στους δύο κύκλους του πειράματος ήταν η ίδια. Δύο ημέρες πριν την προετοιμασία των δειγμάτων λάχανου, πραγματοποιήθηκε πρώτη ανανέωση σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 15 ml Tryptone Soy Broth (TSB, NCM0019A, Neogen, Kansas, MO, USA). Πιο συγκεκριμένα, υπό ασηπτικές συνθήκες, 20 μl από το κάθε στέλεχος του παθογόνου, εμβολιάστηκαν σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες με 15 ml TSB (2 επαναλήψεις). Η λήψη των δύο στελεχών των παθογόνων πραγματοποιήθηκε από προηγούμενες ανανεώσεις που είχαν λάβει χώρα στο προ-πείραμα, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.1.1. Έπειτα από την προσθήκη των 20 μl, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση με τη χρήση Vortex και στη συνέχεια επώαση στους 37 °C για 18 ώρες. Ύστερα από 24 ώρες, πραγματοποιήθηκε η δεύτερη ανανέωση σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 ml TSB, εμβολιάστηκαν 20 μl από το κάθε στέλεχος των παθογόνων και πραγματοποιήθηκε επώαση για 18 ώρες στους 37 °C. Την ημέρα προετοιμασίας των δειγμάτων, επιλέχθηκε η επανάληψη στην οποία ο παθογόνος αναπτύχθηκε πιο ικανοποιητικά με ένδειξη την θολερότητα. Η κάθε επανάληψη από τα στελέχη των παθογόνων τόσο στον πρώτο όσο και στον δεύτερο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας, τοποθετήθηκε σε σωλήνες Falcon των 15 ml, υπό ασηπτικές συνθήκες.

Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση με τη χρήση της φυγόκεντρο (HERAEUS MULTIFUGE 1S-R Centrifuge) με την επιλογή συγκεκριμένου προγράμματος 5.000 στροφών στους 4 °C για το χρονικό διάστημα των 10 λεπτών. Με τη φυγοκέντριση συλλέχθηκε η βιομάζα των κυττάρων των παθογόνων. Στην αρχή, φυγοκεντρήθηκαν τα σωληνάκια με τους παθογόνους σε TSB της δεύτερης ανανέωσης. Μετά το πέρας της πρώτης φυγοκέντρισης, υπό ασηπτικές συνθήκες, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο σωληνάκι με τα κύτταρα του κάθε στελέχους του παθογόνου που είχαν καταβυθιστεί στον πυθμένα προστέθηκαν 15 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer ισχύος ¼ (NCM0191K, Neogen) και αναδεύτηκε στο Vortex. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντριση, υπό τις ίδιες συνθήκες, και μετά το πέρας της φυγοκέντρισης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα στο σωληνάκι

επαναιωρήθηκαν, επίσης, 15 ml διαλύματος Ringer. Τέλος, τα σωληνάκια με τον εκάστοτε παθογόνο, ομογενοποιήθηκαν με χρήση Vortex.

Ακολούθως, σχετικά με τον τεχνολογικό μικροοργανισμό και το υπερκείμενό του, δύο ημέρες πριν από τη χρήση του τεχνολογικού μικροοργανισμού με τον οποίο θα ψεκάστουν τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανανέωσή του σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 15 ml MRS broth (Ref. 40172852, Biolife, Italiana, S.r.l Milano, Italy). Η λήψη του μικροοργανισμού για την πρώτη ανανέωση πραγματοποιήθηκε από προηγούμενες ανανεώσεις που είχαν λάβει χώρα σε προ-πείραμα, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.1.1. Αρχικά, υπό ασηπτικές συνθήκες, κατά τον πρώτο κύκλο του πειράματος, σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες (2 επαναλήψεις) με MRS broth προστέθηκαν 20 ml από τον τεχνολογικό μικροοργανισμό και παράλληλα στον δεύτερο κύκλο του πειράματος, προστέθηκαν 100 ml από τον τεχνολογικό μικροοργανισμό και επώαστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε η δεύτερη ανανέωση σε τέσσερα falcon των 50 ml, τα οποία περιείχαν 40 ml ζωμό και ακολούθως επώαστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες. Από τα τέσσερα falcon, τα δύο χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του τεχνολογικού μικροοργανισμού και τα άλλα δύο χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη του υπερκείμενου του τεχνολογικού μικροοργανισμού ύστερα από την διαδικασία της φυγοκέντρισης.

Κατά τη φυγοκέντριση, πραγματοποιήθηκε, επίσης, η χρήση κατάλληλου προγράμματος ώστε η φυγοκέντριση των δύο εκ των τεσσάρων δειγμάτων να πραγματοποιηθεί στους 4 °C με 5.000 στροφές για 10 λεπτά. Με την πραγματοποίηση της φυγοκέντρισης πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός της βιομάζας από το υπερκείμενο. Συνεπώς, μετά την φυγοκέντριση των δύο δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε αποθήκευση του υπερκείμενου σε νέα falcon των 50 ml, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν ξανά. Μετά το πέρας της δεύτερης φυγοκέντρισης, πραγματοποιήθηκε ξανά αποθήκευση του υπερκείμενου σε νέα falcon των 50 ml και κατά αυτόν τον τρόπο το υπερκείμενο (supernatant) του τεχνολογικού μικροοργανισμού ήταν έτοιμο να χρησιμοποιηθεί κατά την προετοιμασία των δειγμάτων.

2.1.4. Προετοιμασία των δειγμάτων

Αγοράστηκαν περίπου 5,5 kg λάχανου από τοπικό κατάστημα μία ημέρα πριν την ημέρα προετοιμασίας των δειγμάτων, το οποίο είχε αποθηκευτεί σε οικιακό ψυγείο στους 4°C. Στο εργαστήριο, αφού κόπηκαν τα φύλλα του λάχανου σε κομμάτια,

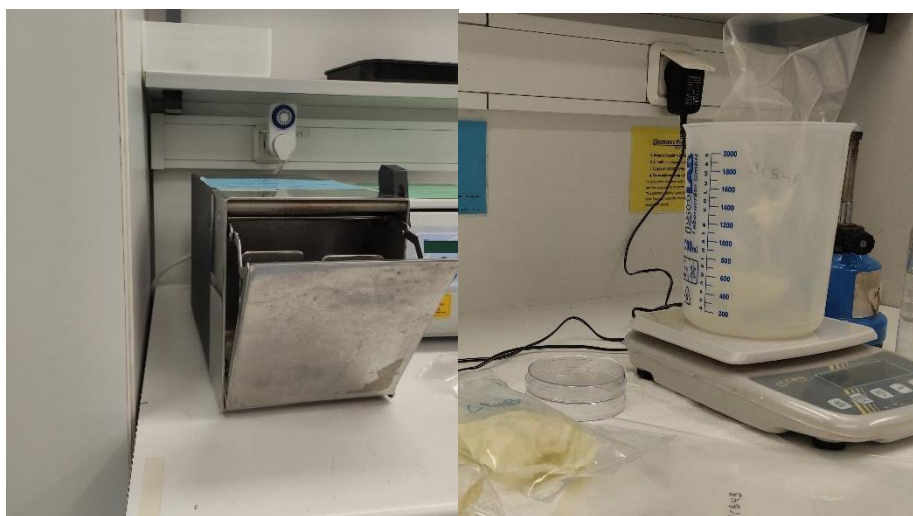
πλύθηκαν με νερό βρύσης, για αφαίρεση των οργανικών αλάτων, και αφέθηκαν να στεγνώσουν για λίγα λεπτά. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες φυγοκεντρίσεις για την παραλαβή των παθογόνων μικροοργανισμών, του τεχνολογικού μικροοργανισμού καθώς και του υπερκείμενου (supernatant) του τεχνολογικού μικροοργανισμού, όπως προαναφέρθηκε στις **Ενότητες 2.1.4.1** και **2.1.4.2**. Η βιομάζα των στελεχών κάθε παθογόνου, και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας, αναμίχθηκε σε ίσους όγκους και παρασκευάστηκαν σειριακές αραιώσεις για τον εμβολιασμό των δειγμάτων λάχανου με πληθυσμό περίπου $3 \log \text{ CFU/g}$. Ακολούθως, υπό ασηπτικές συνθήκες, 300 g από το λάχανο εμβολιάστηκαν με τη χρήση πιπέτας με το εκάστοτε μείγμα παθογόνων, και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας. Στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκε ο ψεκασμός των 300 g λάχανου με 300 μL των κυττάρων του τεχνολογικού μικροοργανισμού. Ποσότητα ίση με 30 g συσκευάστηκε σε σακουλάκια τροποποιημένης ατμόσφαιρας υπό κενό, MAP με σύσταση αερίων 10 % CO_2 , 10 % O_2 και 80 % N_2 με τη χρήση της μηχανής HenkoVac 1900 (Howden Food Equipment B.V., the Netherlands). Τα δείγματα συντηρήθηκαν σε κλιβάνους ακριβείας (MIR153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) των 4 °C και των 10 °C έως ότου αλλοιωθούν . Ομοίως, στην δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκε ψεκασμός του λάχανου με 300 μL υπερκείμενου του τεχνολογικού (supernatant) και στην τρίτη περίπτωση ψεκασμός με 300 μL ζωμού (broth).



Εικόνα 2.1: Συντήρηση των δειγμάτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα υπό κενό, MAP στους κλιβάνους (MIR153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) των 4 °C και 10 °C.

2.2. Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Κατά τη δειγματοληψία, και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας, από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 10 g λάχανου, τα οποία μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, Paris, France), υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη χρήση μεταλλικής λαβίδας. Ακολούθως, προστέθηκαν 90 ml αποστειρωμένου αραιωτικού μέσου Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K.) υπό ασηπτικές συνθήκες (αναλογία 1:100). Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομοιογενοποιητή Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 60 δευτερόλεπτα. Σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας, για κάθε θερμοκρασία, χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα (επαναλήψεις) της κάθε περίπτωσης (M, S, B).



Εικόνα 2.2: Δειγματοληψία δειγμάτων λάχανου

Έπειτα από την ομοιογενοποίηση των δειγμάτων, ακολούθησε ο επιθυμητός βαθμός διαδοχικών αραιώσεων. Υπό ασηπτικές συνθήκες, με χρήση πιπέτας πραγματοποιήθηκε λήψη 1 ml ομοιογενοποιημένου δείγματος και μεταφορά του σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9 ml αποστειρωμένου αραιωτικού μέσου Ringer (αραίωση 1:10). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των τρυβλίων με τα αποστειρωμένα θρεπτικά υποστρώματα. Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν ήταν η Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (OMX), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.*, τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, οι ζύμες / μύκητες, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και ο πληθυσμός των παθογόνων μικροοργανισμών.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν έξι υποστρώματα για τη μελέτη συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Από τα έξι υποστρώματα, τα πέντε ήταν

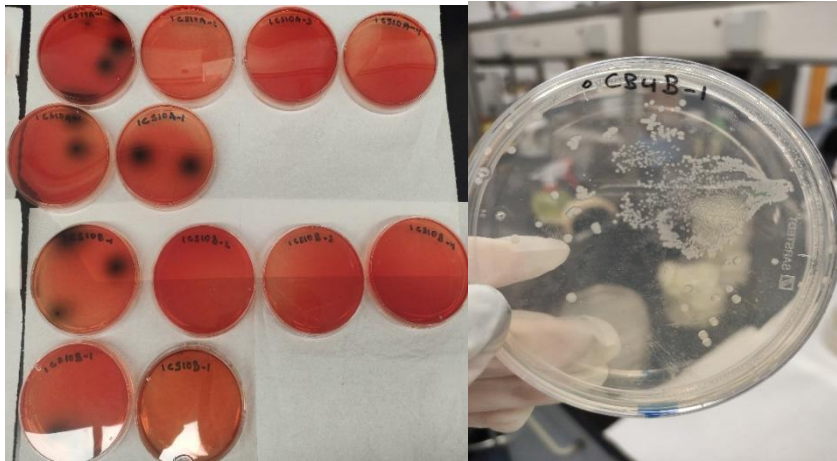
κοινά και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας ωστόσο το έκτο διαφοροποιούνταν λόγω του εκάστοτε παθογόνου μικροοργανισμού.

Συγκεντρωτικά, τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Υπόστρωμα **Plate Count Agar, PCA (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.I, Milano, Italy)**, το οποίο αποτελεί ένα γενικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας, OMX και εφαρμόστηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plating). Η επώαση έγινε στους 30 °C για 48 ώρες.
- Υπόστρωμα **Pseudomonas Agar Base (LAB108, LAB M.,U.K.)**, το οποίο αποτελεί ένα εκλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των ψευδομονάδων και εφαρμόστηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plating). Ως εξειδικευμένο υπόστρωμα περιλαμβάνει αντιβιοτικό (Cetrimide, Fusidin και Cephaloridine, CFC (Modified C.F.C X108, LAB M.,U.K.)). Η επώαση έγινε στους 25 °C για 48 ώρες.
- Υπόστρωμα **Rose Bengal Agar Base, RBC (Lab M Limited)**, το οποίο αποτελεί ένα εκλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των ζυμών και των μυκήτων και εφαρμόστηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plating). Ως εξειδικευμένο υπόστρωμα περιλαμβάνει το αντιβιοτικό Chloramphenicol (X009, LAB M.,U.K.). Η επώαση έγινε στους 25 °C για 48 ώρες.
- Υπόστρωμα **De Man-Rogosa-Sharpe agar, MRS (Ref. 40172852, Biolife, Italiana S.r.I, Milano, Italy)**, το οποίο αποτελεί ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) και εφαρμόστηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plating). Η επώαση έγινε στους 30 °C για 48 ώρες.
- Υπόστρωμα **Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA**, το οποίο αποτελεί ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των *Enterobacteriaceae* και εφαρμόστηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plating). Ως εξειδικευμένο υπόστρωμα περιέχει Crystal Violet Bile Salts και η επώαση έγινε στους 37 °C για 24 ώρες.
- Υπόστρωμα **Listeria Agar Palcam Base (Ref. 4016042, Biolife, Italiana S.r.I, Milano, Italy)**, το οποίο αποτελεί εκλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των στελεχών του παθογόνου *Listeria monocytogenes* και εφαρμόστηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plating). Η επώαση έγινε στους 37 °C για 48

ώρες. Πραγματοποιήθηκε η χρήση του αντιβιοτικού Listeria Palcam antimicrobial supplement (Biolife).

- Υπόστρωμα **Tryptone Bile Glucuronic Agar, TBX**, το οποίο αποτελεί εκλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των στελεχών *E. Coli* και εφαρμόστηκε τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plating). Η επώαση έγινε στους 44 °C για 24 ώρες. Πραγματοποιήθηκε η χρήση του αντιβιοτικού Harlequin Tryptone Bile Glucuronide Agar (Neogen).



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση αποικιών *Listeria monocytogenes* σε υπόστρωμα Listeria Agar Palcam Base (αριστερά) και αποικιών *Escherichia coli* σε υπόστρωμα Tryptone Bile Glucuronic Agar (TBX) (δεξιά). Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία επωάζονταν σε κλιβάνους για χρονικό διάστημα και θερμοκρασία αντίστοιχη με το κάθε υπόστρωμα. Τέλος, πραγματοποιούνταν καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών στα τρυβλία σε κάθε αραιώση και γινόταν η αναγωγή στο αρχικό δείγμα. Στη συνέχεια, υπολογίζονταν οι μέσοι όροι των log Cfu/g και οι τυπικές αποκλίσεις των δύο επαναλήψεων της κάθε περίπτωσης.

2.3. Προσδιορισμός pH

Μετά το πέρας των δειγματοληψιών, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση του pH των δειγμάτων στην 1^η δεκαδική αραιώση με τη χρήση πεχάμετρου (Metrohm 691 pH meter). Προηγουμένως είχε βαθμονομηθεί με πρότυπα διαλύματα με pH των 4, 7 και 10.

2.4. Οργανοληπτικός Έλεγχος

Και στους δύο κύκλους, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων και των τριών περιπτώσεων για τις δύο θερμοκρασίες (4 και 10 °C) από ημι-εκπαιδευμένη ομάδα εννέα ατόμων. Τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το χρώμα, την οσμή και την εμφάνιση. Βαθμολογήθηκαν με τον αριθμό '1' που υποδηλώνει

φρέσκο προϊόν (fresh), με τον αριθμό ‘‘2’’ που υποδηλώνει ημι-φρέσκο προϊόν (semi fresh) και με τον αριθμό ‘‘3’’ που υποδηλώνει αλλοιωμένο προϊόν (spoiled) και παράλληλα αποτελεί το όριο απόρριψης.

2.5. Φυσικοχημικές Αναλύσεις

Ακόμη, εφαρμόστηκαν ταχείες αναλυτικές μέθοδοι. Πιο συγκεκριμένα, η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) και η πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI).

2.5.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Και στους δύο κύκλους του πειράματος, για την ανάλυση των δειγμάτων λάχανου εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) με τη χρήση του φασματόμετρου FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp, Tokio, Ιαπωνία) και τη χρήση κρυστάλλου ZnSe 45 ° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, Ηνωμένες Πολιτείες). Ο συγκεκριμένος κρύσταλλος έχει δείκτη διάθλασης 2,4 και βάθος διείσδυσης 2,0 μm στα 1000 cm^{-1} . Τα φάσματα συλλέχθηκαν σε εύρος κυματαριθμών από 4000 cm^{-1} έως 400 cm^{-1} μέσω του λογισμικού spectra manager (Jasco Corp.). Κατά την ανάλυση, ορισμένη ποσότητα του δείγματος μεταφέρθηκε κατάλληλα στον κρύσταλλο και ακολούθως καλύφθηκε με φύλλο αλουμινίου υπό πίεση ώστε το δείγμα να έχει καλύτερη επαφή με την επιφάνεια του κρυστάλλου. Πριν από την έναρξη της διαδικασίας και ανά 4 δείγματα, πραγματοποιούνταν βαθμονόμηση του οργάνου με κενό κρύσταλλο (μέτρηση χωρίς δείγμα). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις (δύο επαναλήψεις). Κατά την εναλλαγή των δειγμάτων (δυο επαναλήψεων), η επιφάνεια του κρυστάλλου καθαρίζονταν, αρχικά, με τη χρήση σαπουνιού, μετέπειτα με απιονισμένο νερό και τέλος με ακετόνη για εξάτμιση και απομάκρυνση της υγρασίας. Συνολικά πραγματοποιήθηκε η λήψη 288 φασμάτων πραγματοποιώντας επαναλήψεις.



Εικόνα 2.4: Παρουσίαση του φασματοφωτόμετρου FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp,Τοκίο, Ιαπωνία)

2.5.2. Πολυφασματική απεικόνιση, MSI (Multispectral Imaging Analysis)

Κατά την τεχνική της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI χρησιμοποιήθηκαν τα όργανα VideometerLab (σταθερό) και VideometerLite (φορητό). Με το VideometerLab μπορεί να πραγματοποιηθεί η λήψη πολυφασματικών εικόνων σε 18 ξεχωριστά, ανομοιόμορφα μήκη κύματος, η τιμή των οποίων κυμαίνεται από από την περιοχή Υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 405 nm έως την περιοχή Near-IR (NIR) στα 970 nm, με την χρήση του λογισμικού (version 2.12.39). Πριν από τη λήψη των πολυφασματικών εικόνων, το όργανο είχε βαθμονομηθεί με τη χρήση κατάλληλων πλακών εφόσον το σύστημα είχε ρυθμιστεί στο “Auto-light”. Μετά την βαθμονόμηση, ορισμένη ποσότητα λάχανου που είχε τοποθετηθεί σε τρυβλίο με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτει την επιφάνεια, τοποθετήθηκε κατάλληλα κάτω από την σφαίρα Ulbricht και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η λήψη των πολυφασματικών εικόνων. Με παρόμοια διαδικασία λήφθηκαν εικόνες από το όργανο VideometerLite σε 10 συγκεκριμένα μήκη κύματος που κυμαίνονται από 405 έως 850 nm στην φασματοσκοπική περιοχή Near-IR (NIR). Κατά την ανάλυση, συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος, από κάθε περίπτωση, τοποθετείται σε τρυβλίο ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια και μετέπειτα το τρυβλίο τοποθετείται χειροκίνητα κάτω από τη φορητή συσκευή για τη λήψη των εικόνων. Συνολικά πραγματοποιήθηκε η λήψη 325 πολυφασματικών εικόνων με τη χρήση του VideometerLab και 157 με τη χρήση του VideometerLite.

2.6. Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων

Για την εκτίμηση του μικροβιολογικού φορτίου της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) των δειγμάτων λάχανου (M, S, B), τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τα τρία όργανα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού XLSTAT® software (version 2023.3.1, Addinsoft, New York, NY, USA).

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

Για την ποσοτική πρόβλεψη της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) μέσω των φασματοσκοπικών δεδομένων που λήφθηκαν από τους τρεις αισθητήρες (FTIR-6200 JASCO, VideometerLab, VideometerLite), αναπτύχθηκαν μοντέλα μέσω της γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R. Για την συγκεκριμένη ανάλυση δεν λήφθηκε υπόψη η μεταχείριση των δειγμάτων ούτε η θερμοκρασία συντήρησης ενώ δεν εφαρμόστηκε καμία προ επεξεργασία στα φασματοσκοπικά δεδομένα.

Η γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-R, Partial Least Squares Regression αποτελεί μία πολυμεταβλητή ανάλυση κατά την οποία εφαρμόζεται ένα κατάλληλο μοντέλο πρόβλεψης, το οποίο συσχετίζει τη σχέση δύο πινάκων δεδομένων X και Y , γραμμικός. Συσχετίζοντας το σύνολο δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) με το σύνολο δεδομένων Y (εξαρτημένες μεταβλητές) προκύπτει ένα νέο σύνολο ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (x -scores) με ορθογώνια διάταξη. Επίσης, προκύπτει και ένας αριθμός κύριων συνιστωσών (Latent variables, LVs) για το νέο σύνολο δεδομένων. Για αποφυγή του overfitting που συμβαίνει λόγω πολυάριθμων μεταβλητών, το μοντέλο έχει τη δυνατότητα να προβλέπει τη σημαντικότητα κάθε παράγοντα κατά τη διασταυρούμενη επικύρωση. (Wold et. al., 2001, Panagou et. al. 2014).

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, οι προβλεπόμενες και παρατηρούμενες τιμές της μεταβλητής Y καταμετρώνται με τη δημιουργία ενός μοντέλου (Wold et. al., 2001). Επιπρόσθετα, ως σύνολο ανεξάρτητων μεταβλητών X χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από τις φασματοσκοπικές μεθόδους και ως σύνολο εξαρτημένων μεταβλητών Y χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των μικροβιολογικών αναλύσεων της OMX. Πιο συγκεκριμένα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από τα 3 όργανα αντιστοιχήθηκαν με τα μικροβιολογικά δεδομένα για τους κυματαριθμούς μεταξύ των

περιοχών 870 έως 1900 cm^{-1} όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αντιστοιχούν στις περιοχές που καταδεικνύουν την αλλοίωση του λάχανου.

Αρχικά, σχετικά με την μέθοδο FTIR, περίπου το 70 % ($n=180$) του συνόλου των δειγμάτων, και των 2 τμημάτων της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και την εσωτερική επικύρωση του μοντέλου ενώ το υπόλοιπο 30 % ($n=78$) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη και εξωτερική επικύρωση των μοντέλων.

Σχετικά με την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI και με τη χρήση του οργάνου VideometerLab, περίπου το 70 % ($n=227$) του συνόλου των δειγμάτων, και των 2 τμημάτων της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και την εσωτερική επικύρωση του μοντέλου ενώ το υπόλοιπο 30 % ($n=98$) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη και εξωτερική επικύρωση των μοντέλων. Με τη χρήση του οργάνου VideometerLite, περίπου το 70 % ($n=109$) του συνόλου των δειγμάτων, ομοίως, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και εσωτερική επικύρωση των μοντέλων ενώ το 30 % ($n=48$) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη και εξωτερική επικύρωση των μοντέλων.

Για κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών σε σχέση με την ευθεία: $y=ax+\beta$, όπου a : η κλίση της ευθείας (slope) και β : ο σταθερός όρος (offset).

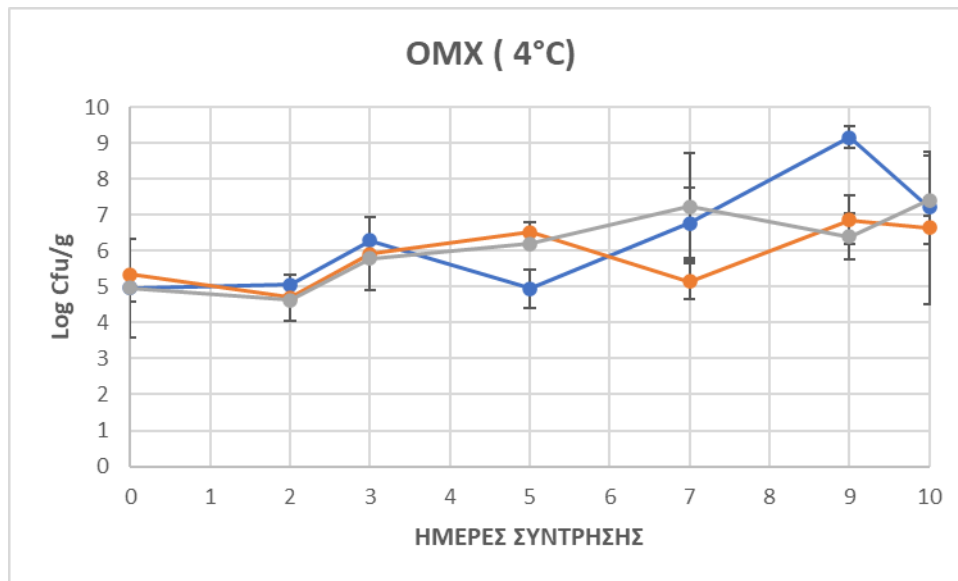
3. Αποτελέσματα / Συζήτηση

3.1. Μικροβιολογικά αποτελέσματα

3.1.1. Καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών προσδιορισμού στον 1^ο κύκλο του πειράματος

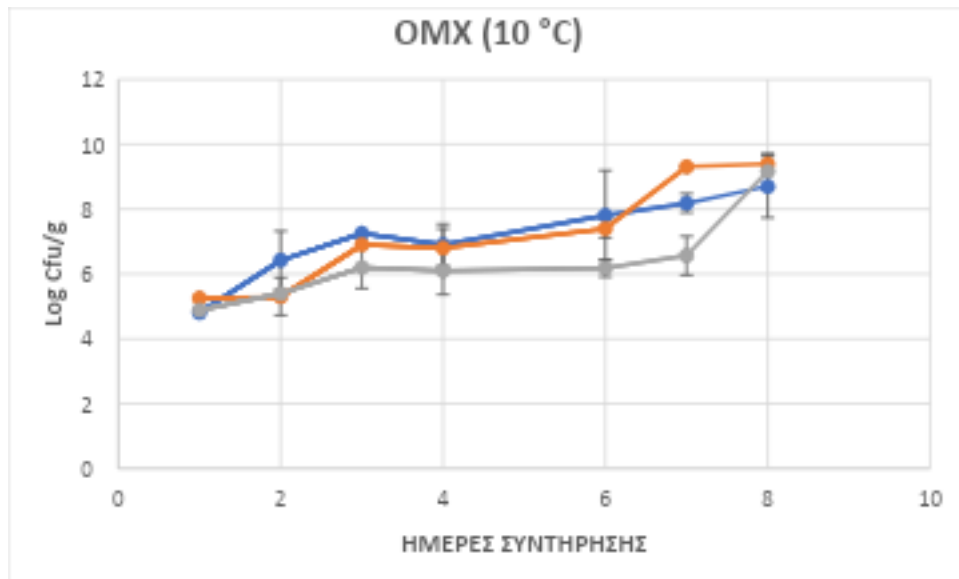
Οι καμπύλες ανάπτυξης των OMX, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), ζυμών / μυκήτων και *Listeria monocytogenes* σε δείγματα λάχανου εμβολιασμένα με μείγμα δύο στελεχών του παθογόνου *Listeria monocytogenes* που συντηρήθηκαν στις θερμοκρασίες 4 °C και 10 °C σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, παρουσιάζονται στα παρακάτω **Διαγράμματα 3.1-3.12**. Τα διαγράμματα καταδεικνύουν τη διαφορά της ανάπτυξης των παραπάνω μικροοργανισμών σε σχέση με τις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων (M, S, B) ανά συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού εκφράστηκε σε log Cfū/g, με μέσο όρο και τυπική απόκλιση (\pm) των δύο επαναλήψεων της κάθε περίπτωσης.

Αρχικά, κατά την καταμέτρηση του πληθυσμού της OMX, για τα δείγματα λάχανου M στους 4 °C τα αποτελέσματα καταδεικνύουν έναν αρχικό πληθυσμό OMX στους 4,964 log Cfū/g (\pm 1,367). Κατά τη διάρκεια συντήρησης ο πληθυσμός OMX αυξήθηκε έως ότου την τελευταία ημέρα συντήρησης να φτάσει στους 7,223 log Cfū/g (\pm 0,252). Για τα δείγματα S στους 4°C, ο αρχικός πληθυσμός της OMX ήταν 5,350 log Cfū/g. Κατά το χρονικό διάστημα της συντήρησης ο πληθυσμός της OMX παρουσίασε αύξηση φτάνοντας στους 6,650 log Cfū/g (\pm 2,118). Για τα δείγματα λάχανου B αρχικός μικροβιακός πληθυσμός της OMX ήταν 4,962 log Cfū/g (\pm 0,381) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε στους 7,420 log Cfū/g (\pm 1,234). Παρατηρώντας και τις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων, την τελευταία μέρα συντήρησης, υψηλότερο μικροβιακό πληθυσμό OMX παρουσίασαν τα δείγματα λάχανου B.



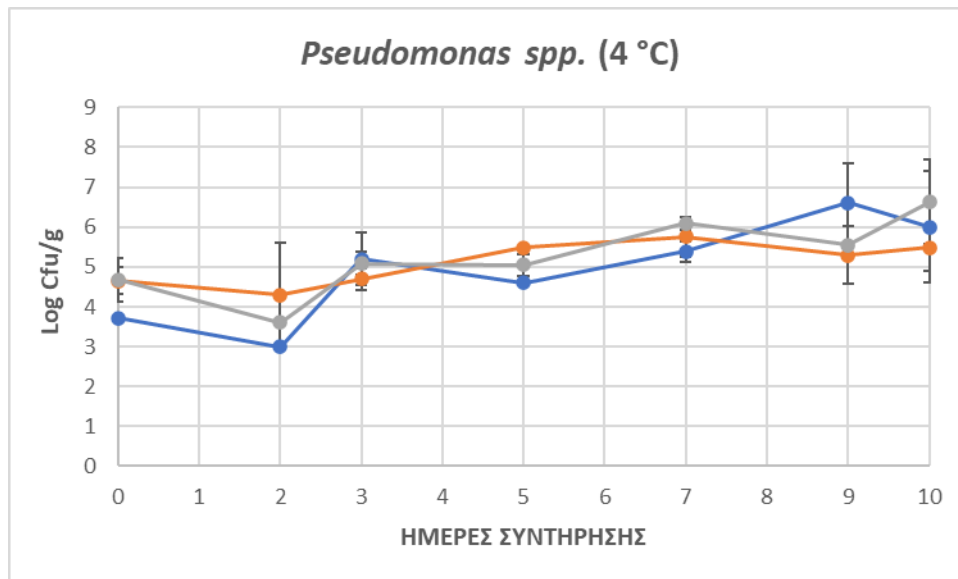
Διάγραμμα 3.1: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού της OMX, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Για τα δείγματα λάχανου στους 10 °C, και για τις τρεις περιπτώσεις, παρουσιάζεται παρακάτω το διάγραμμα ανάπτυξης της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) συναρτήσει του χρόνου συντήρησης. Σύμφωνα, με τα αποτελέσματα, αρχικά, για τα δείγματα M ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός της OMX ήταν 4,806 log CfU/g και την τελευταία μέρα συντήρησης έφτασε στους 8,702 log CfU/g ($\pm 0,969$). Για τα δείγματα λάχανου S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 5,255 log CfU/g και με την πάροδο του χρόνου συντήρησης αυξήθηκε στους 9,384 log CfU/g ($\pm 0,244$). Τέλος, για τα δείγματα λάχανου B, ο αρχικός πληθυσμός ήταν 4,982 log CfU/g και έφτασε στους 9,167 log CfU/g ($\pm 0,544$). Παρατηρώντας και τις τρεις περιπτώσεις και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της τελευταίας ημέρας συντήρησης, υψηλότερο μικροβιακό πληθυσμό OMX στους 10 °C, παρουσίασαν τα δείγματα M.



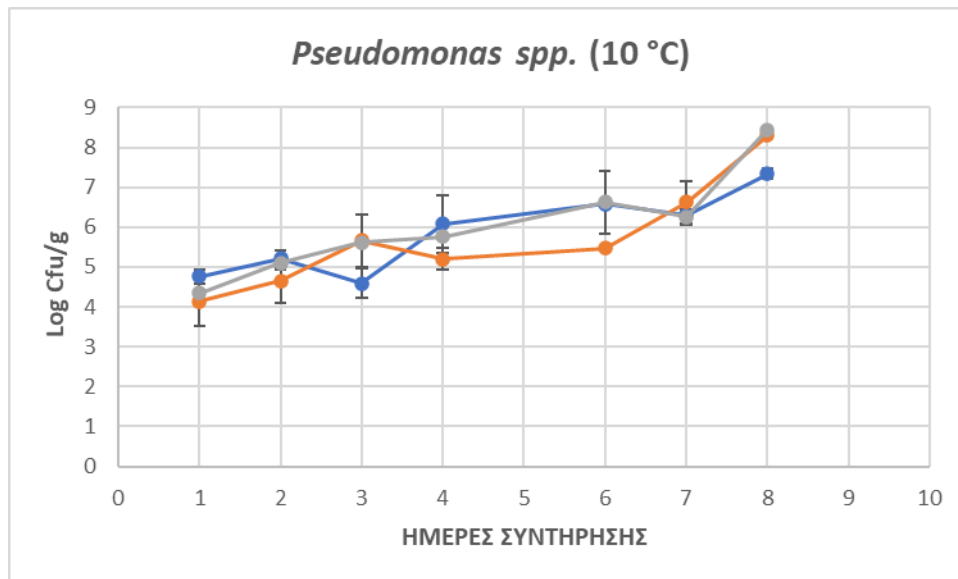
Διάγραμμα 3.2: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού της OMX, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Ακολούθως, παρακάτω παρουσιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης *Pseudomonas spp.* για τα δείγματα λάχανου, και των τριών περιπτώσεων, στους 4 °C. Αρχικά, για τα δείγματα M, ο αρχικός πληθυσμός *Pseudomonas spp.* ήταν 3,716 log CfU/g και έως την τελευταία ημέρα συντήρησης παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού φτάνοντας στους 6,005 log CfU/g ($\pm 1,386$). Για τα δείγματα S, ο αρχικός πληθυσμός ήταν 4,650 log CfU/g ($\pm 0,345$) και αυξήθηκε φτάνοντας στους 5,477 log CfU/g ($\pm 0,573$). Τέλος, στα δείγματα λάχανου B, οι μικροβιολογικές αναλύσεις καταδεικνύουν έναν αρχικό πληθυσμό *Pseudomonas spp.* στους 4,678 log CfU/g ($\pm 0,545$) παρουσιάζοντας αύξηση φτάνοντας στους 6,628 log CfU/g ($\pm 1,064$). Συνεπώς, συγκριτικά με τις τρεις περιπτώσεις, ο πληθυσμός *Pseudomonas spp.* παρουσίασε μεγαλύτερη αύξηση την τελευταία ημέρα συντήρησης στα δείγματα λάχανου B.



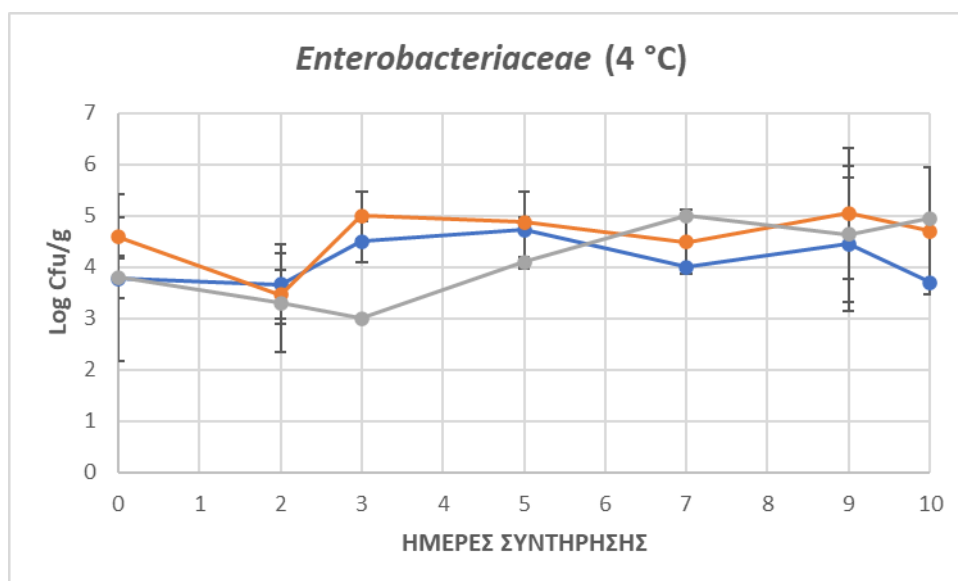
Διάγραμμα 3.3: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Pseudomonas spp.*, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Για τα δείγματα λάχανου στους 10 °C, αρχικά, για την περίπτωση των δειγμάτων M, σύμφωνα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις, ο αρχικός πληθυσμός *Pseudomonas spp.* καταμετρήθηκε στους 4,763 log CfU/g (\pm 0,182). Κατά το χρονικό διάστημα συντήρησης στους 10°C, ο μικροβιακός πληθυσμός αυξήθηκε φτάνοντας στους 7,340 log CfU/g (\pm 0,129). Για τα δείγματα S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 4,136 log CfU/g (\pm 0,607) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε στους 8,290 log CfU/g (\pm 0,036). Τέλος, για τα δείγματα B, ο αρχικός πληθυσμός υπολογίστηκε στους 4,342 log CfU/g και αυξήθηκε φτάνοντας στους 8,447 log CfU/g (\pm 0,061). Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις στους 10 °C, ο πληθυσμός *Pseudomonas spp.* μεγαλύτερη αύξηση παρουσίασε στην περίπτωση των δειγμάτων B.



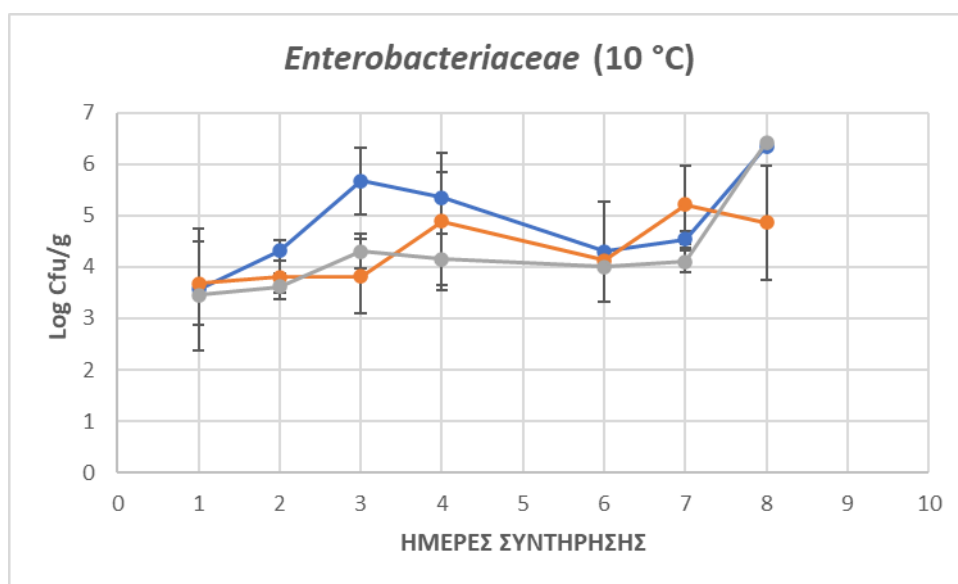
Διάγραμμα 3.4: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Pseudomonas spp.*, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Σχετικά με τα βακτήρια *Enterobacteriaceae*, για τους 4 °C, στα δείγματα λάχανου M ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,773 log CfU/g (\pm 0,389) και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρουσίασε μία αρχική αύξηση, ωστόσο τις τελευταίες ημέρες συντήρησης παρουσίασε μείωση. Στα δείγματα λάχανου S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 4,592 log CfU/g (\pm 0,375) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,700 log CfU/g (\pm 1,232). Τέλος, στα δείγματα λάχανου B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,799 log CfU/g (\pm 1,621) και αυξήθηκε κατά ένα λογάριθμο φτάνοντας στους 4,964 log CfU/g την τελευταία μέρα συντήρησης.



Διάγραμμα 3.5: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Enterobacteriaceae*, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

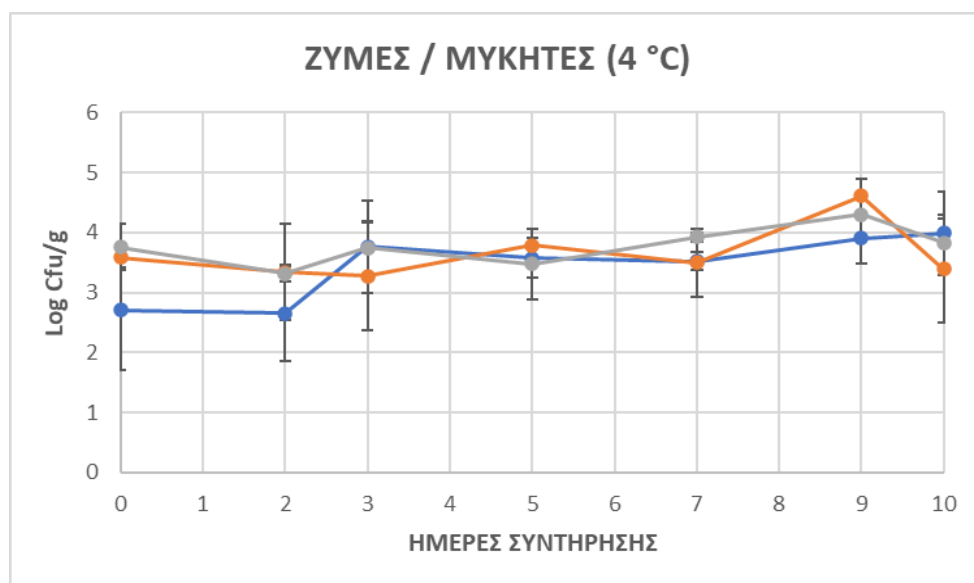
Στους 10 °C, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,569 log Cfū/g (\pm 1,189) και κατά τη διάρκεια συντήρησης ο μικροβιακός πληθυσμός *Enterobacteriaceae* έφτασε στους 6,352 log Cfū/g (\pm 0,031), παρατηρήθηκε δηλαδή αύξηση κατά τρεις λογαρίθμους. Στα δείγματα S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,683 log Cfū/g (\pm 0,819) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,861 log Cfū/g (\pm 1,116). Για τα δείγματα B έπειτα από μικροβιολογικές αναλύσεις, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,459 log Cfū/g και αυξήθηκε φτάνοντας στους 6,425 log Cfū/g (\pm 0,021). Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις, τα δείγματα B παρουσίασαν την υψηλότερη αύξηση του πληθυσμού *Enterobacteriaceae* κατά τη διάρκεια συντήρησης.



Διάγραμμα 3.6: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Enterobacteriaceae*, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

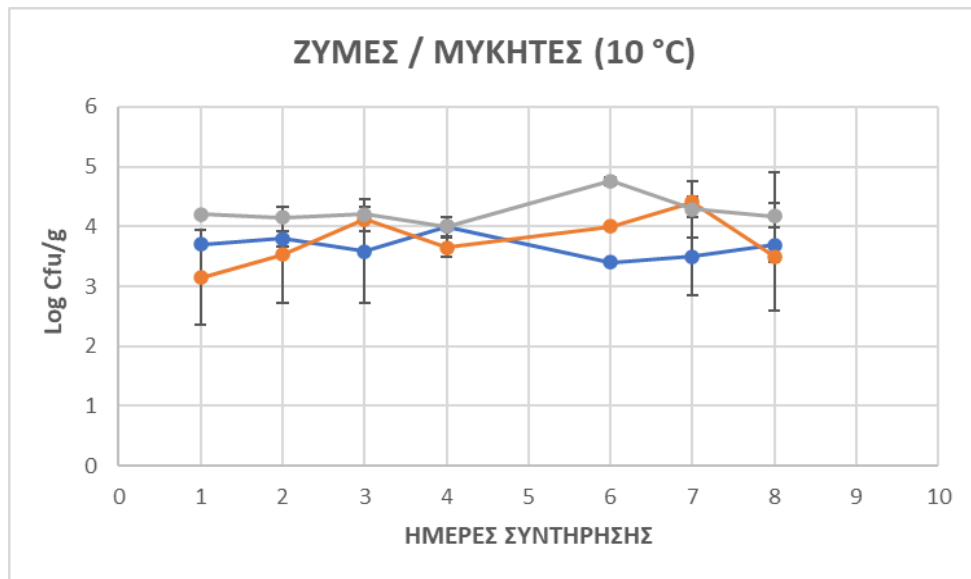
Σχετικά με τις ζύμες / μύκητες, για τα δείγματα λάχανου στους 4 °C, η μεταβολή του πληθυσμού σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα. Αρχικά, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,707 log Cfū/g (\pm 2,304) παρουσιάζοντας σταδιακή αύξηση κατά ένα λογάριθμο την τελευταία μέρα συντήρησης. Στα δείγματα λάχανου S ο αρχικός πληθυσμός ήταν 3,581 log Cfū/g (\pm 0,167) και κατά την διάρκεια συντήρησης μειώθηκε φτάνοντας στους 3,389 log Cfū/g (\pm 1,267). Τέλος, στα δείγματα B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε 3,762 log Cfū/g (\pm 0,386) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,827 log Cfū/g (\pm 0,416). Συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις,

παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια της συντήρησης τον ελάχιστο πληθυσμό ζυμών / μυκήτων παρουσίασαν τα δείγματα S.



Διάγραμμα 3.7: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού ζυμών / μυκήτων, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

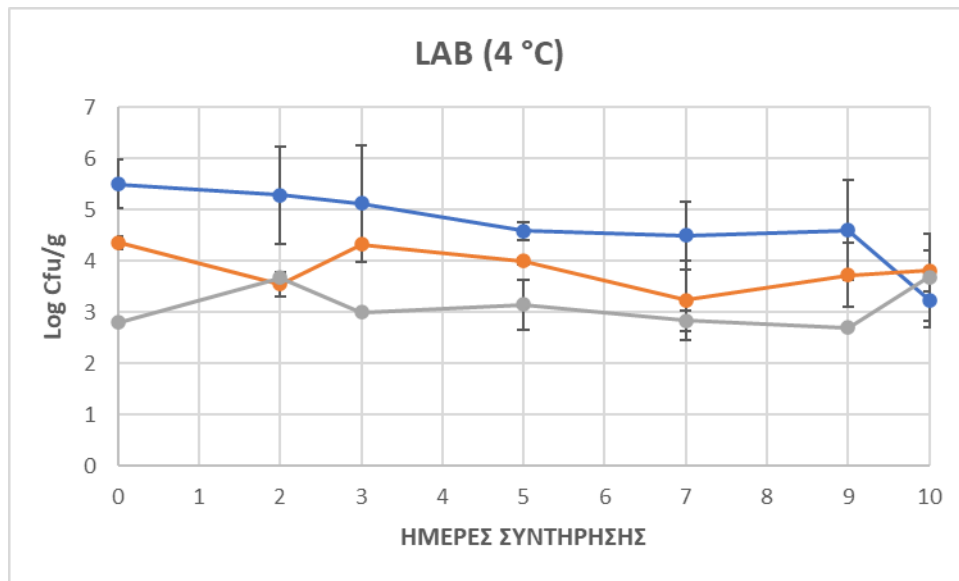
Για τα δείγματα λάχανου στους 10 °C, και για τις τρεις περιπτώσεις, η πληθυσμιακή μεταβολή ζυμών / μυκήτων σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα. Πρωταρχικά, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,703 log CfU/g ($\pm 0,014$) και την τελευταία ημέρα συντήρησης μειώθηκε φτάνοντας στους 3,690 log CfU/g ($\pm 0,287$). Στα δείγματα S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,148 log CfU/g ($\pm 1,205$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,500 log CfU/g ($\pm 1,628$). Τέλος, στα δείγματα B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 4,204 logCfu/g και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός παρέμεινε, σχετικά, στα ίδια επίπεδα. Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις, υψηλότερο πληθυσμό ζυμών / μυκήτων παρουσίασαν τα δείγματα λάχανου B.



Διάγραμμα 3.8: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού ζυμών / μυκήτων, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

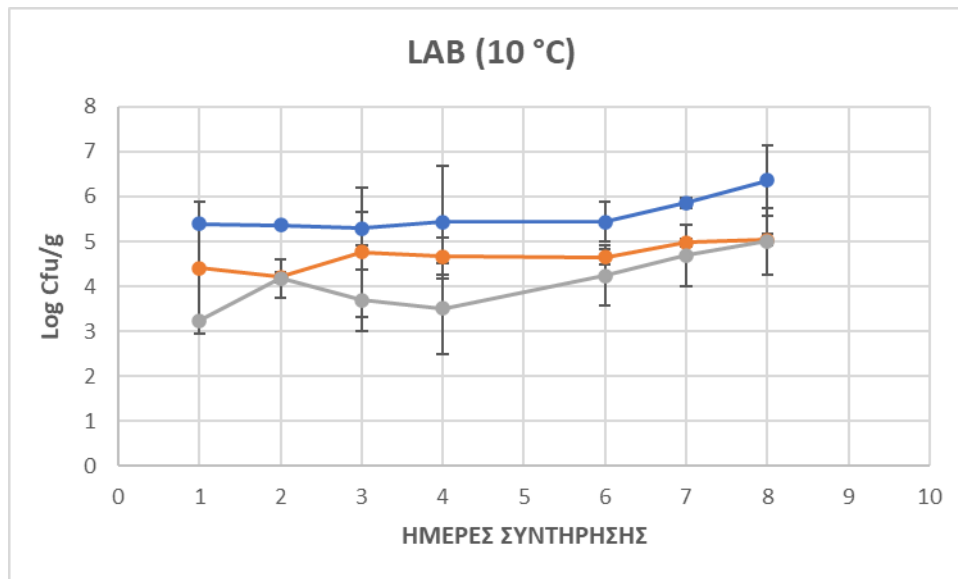
Σύμφωνα με τους Beata Kowalska & Magdalena Szczech (2020), σε έρευνα σχετικά με τις διαφορές στη μικροβιολογική αλλοίωση των λαχανικών, βρέθηκε ότι ο πληθυσμός των μυκήτων / ζυμών για τα περισσότερα φυλλώδη λαχανικά κυμαίνονταν από 4.5 έως 5 log CfU/g όπως παρατηρείται και στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία.

Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), στους 4 °C, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στα δείγματα λάχανου M, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 5,757 log CfU/g ($\pm 0,476$). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, την τελευταία ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών μειώθηκε φτάνοντας στους 3,247 log CfU/g ($\pm 0,547$). Στα δείγματα S, αρχικά ο πληθυσμός οξυγαλακτικών καταμετρήθηκε στους 4,360 log CfU/g ($\pm 0,123$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης, ομοίως και με την προηγούμενη περίπτωση, εμφάνισε μείωση κατά ένα περίπου λογάριθμο με αποτέλεσμα ο τελικός πληθυσμός να καταμετρηθεί στους 3,812 log CfU/g ($\pm 0,398$). Στα δείγματα B, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,806 log CfU/g. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, κατά τη διάρκεια συντήρησης ο πληθυσμός παρουσίασε αύξηση κατά ένα λογάριθμο. Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις, παρατηρείται ότι στις περιπτώσεις του λάχανου M και S ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων εμφάνισε μείωση σε αντίθεση με την περίπτωση των δειγμάτων λάχανου B τα οποία εμφάνισαν αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων.



Διάγραμμα 3.9: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Για τα δείγματα λάχανου στους 10 °C σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός οξυγαλακτικών καταμετρήθηκε 5,387 log CfU/g και με την πάροδο του χρόνου συντήρησης αυξήθηκε στους 6,358 log CfU/g ($\pm 0,795$). Στα δείγματα S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 4,406 log CfU/g ($\pm 1,470$). Κατά την πάροδο του χρόνου συντήρησης ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε κατά περίπου ένα λογάριθμο φτάνοντας στους 5,039 log CfU/g ($\pm 0,129$). Τέλος, στα δείγματα λάχανου B, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε ίσος με 3,234 log CfU/g ($\pm 0,004$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης έφτασε στους 5,004 log CfU/g ($\pm 0,736$). Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη πληθυσμιακή αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα S.

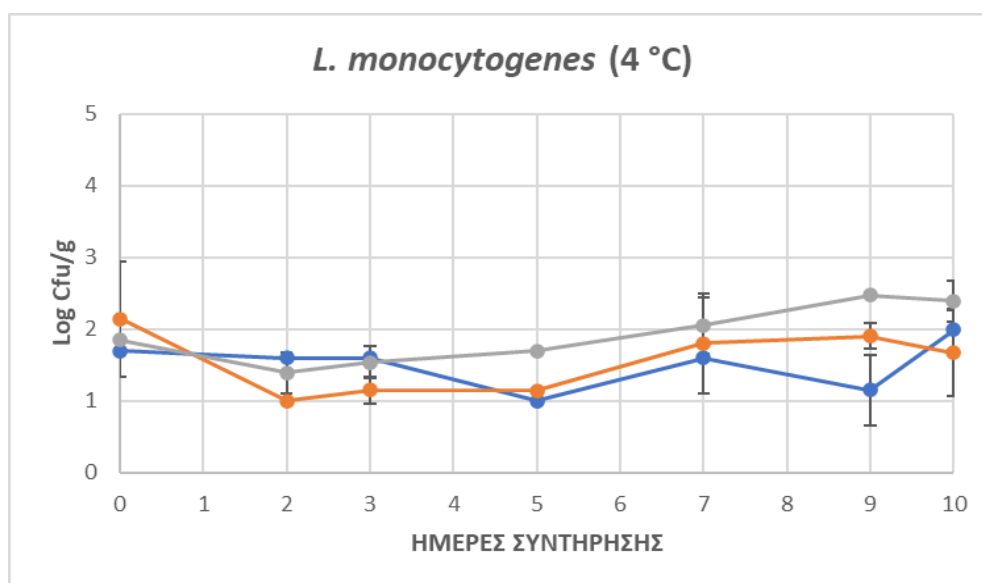


Διάγραμμα 3.10: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Σύμφωνα με τους Alegbeleye & Sant' Ana (2022), σε έτοιμη σαλάτα από άσπρο λάχανο έπειτα από συντήρηση 144 ωρών στους 4, 8, 12 και 16 °C, παρατηρήθηκε αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στους 16 °C φτάνοντας ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στους 8,9 log CfU/g και, γενικά, παρατήρησαν ότι και στις υπόλοιπες έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ομοίως, και στην παρούσα ερευνητική εργασία, μεγαλύτερη αύξηση οξυγαλακτικών παρουσίασαν τα δείγματα M, S, B αποθηκευμένα στη θερμοκρασία συντήρησης των 10 °C. Επίσης, ανέφεραν ότι στην έρευνά τους παρά τα υψηλά επίπεδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), έπειτα από 144 ώρες συντήρησης, στις σαλάτες, τα επίπεδα των LAB δεν αντιστοιχούσαν σε σημαντική αλλοίωση. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας των λαχανικών και μπορούν, σε συγκεκριμένα επίπεδα, να οδηγήσουν στην αλλοίωση μέσω της δημιουργίας ορισμένων μεταβολιτών, προκαλώντας δυσάρεστες οσμές λόγω της παραγωγής αιθανόλης, οργανικών οξέων, εστέρων και CO₂. Βέβαια σημαντικό αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένα μέλη δρουν και ως βιοπροστατευτικοί παράγοντες όπως στην παρούσα ερευνητική εργασία με τη χρήση του *Lactiplantibacillus pentosus* FMCC-B281 (Pothakos et. al., 2015).

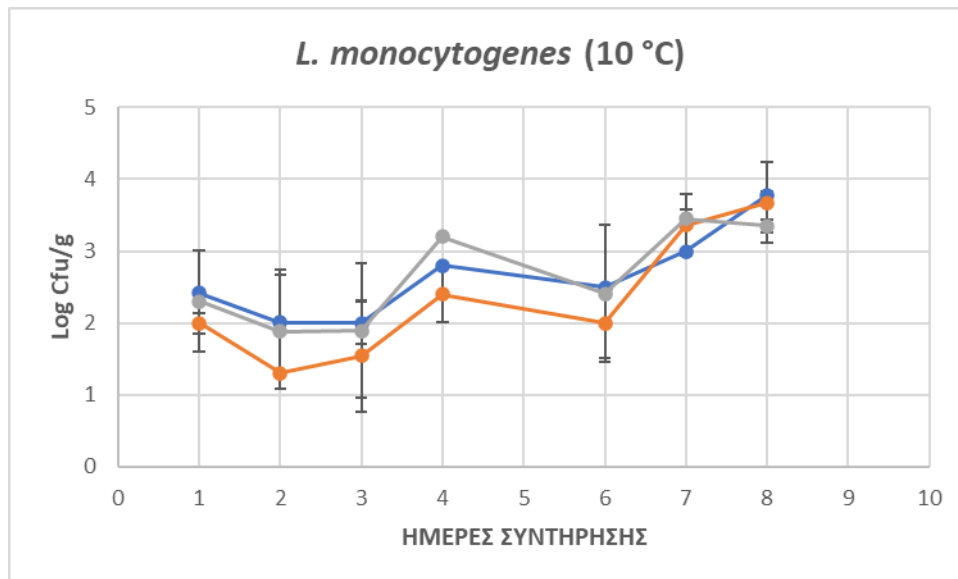
Για τα δείγματα λάχανου στους 4 °C, η μεταβολή του πληθυσμού των στελεχών *Listeria monocytogenes* συναρτήσε του χρόνου συντήρησης παρουσιάζεται στο ακόλουθο διάγραμμα. Αρχικά, στα δείγματα λάχανου M ο αρχικός πληθυσμός

καταμετρήθηκε στους 1,699 log Cfū/g. Κατά τη διάρκεια συντήρησης, παρουσίασε μια μικρή αύξηση φτάνοντας στους 1,991 log Cfū/g ($\pm 0,287$). Στα δείγματα λάχανου S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,139 log Cfū/g ($\pm 1,434$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης μειώθηκε φτάνοντας στους 1,671 log Cfū/g ($\pm 1,205$). Στα δείγματα λάχανου B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 1,845 log Cfū/g και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 2,389 log Cfū/g ($\pm 0,287$).



Διάγραμμα 3.11: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Listeria monocytogenes*, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Στους 10 °C, αρχικά, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,415 log Cfū/g και κατά τη διάρκεια της συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,778 log Cfū/g ($\pm 0,047$). Στα δείγματα S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 1,998 log Cfū/g ($\pm 0,142$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης, επίσης, αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,678 log Cfū/g ($\pm 0,563$). Τέλος, στα δείγματα B ο μικροβιακός πληθυσμός, στην αρχή, καταμετρήθηκε στους 2,560 log Cfū/g ($\pm 0,709$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης ο μικροβιακός πληθυσμός αυξήθηκε στους 3,351 log Cfū/g ($\pm 0,094$).



Διάγραμμα 3.12: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Listeria monocytogenes*, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Σύμφωνα με τους Alegbeleye & Sant' Ana (2022), σε μελέτη τους σχετικά με την ανάπτυξη και επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες που συντηρήθηκαν στους 4, 8, 12 και 16 °C, ότι στη σαλάτα με άσπρο λάχανο ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* αναπτύχθηκε μόνο στους 16 °C φτάνοντας έως περίπου $2,7 \pm 0,06 \log \text{Cfu/g}$ έπειτα από 144 ώρες ενώ στις άλλες θερμοκρασίες δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη. Στη σαλάτα με κόκκινο λάχανο, η ανάπτυξη του παθογόνου ήταν μηδαμινή σε όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν. Οι E. Carrasco et. al. (2008) ανέφεραν ένα αύξηση έως και 3 log CFU/g στις μετρήσεις του *L. monocytogenes* σε ψιλοκομμένο μαρούλι μετά από επτά ημέρες και αύξηση έως και 4,9 log CFU/g μετά τις 14 ημέρες.

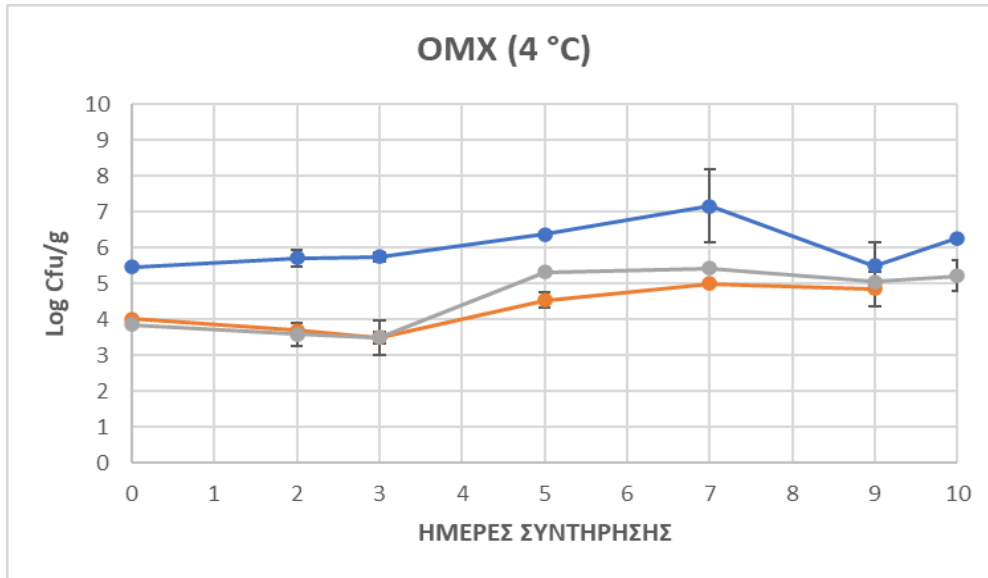
Συνεπώς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων, στον 1^ο κύκλο του πειράματος, παρατηρείται ότι στα δείγματα M, S, B που συντηρήθηκαν στους 4 °C η ανάπτυξη του πληθυσμού των μικροοργανισμών που προσδιορίστηκαν ήταν μικρότερη συγκριτικά με την ανάπτυξη του πληθυσμού των μικροοργανισμών στους 10 °C. Σύμφωνα και με τους Altunatmaz et al. (2012) το συνιστώμενο εύρος θερμοκρασίας για τη διατήρηση των περισσότερων λαχανικών είναι 0 έως 5 °C καθώς σε αυτό το εύρος επιβραδύνεται η ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις παρατηρείται υψηλότερη αύξηση στον πληθυσμό *Pseudomonas spp.*. Βέβαια, σύμφωνα με τους Saggagi BS, et. al. (2022) ορισμένα βακτήρια όπως τα βακτήρια *Pseudomonas spp.*, *Erwinia spp.* και

Bacillus spp. αποτελούν τη φυσική χλωρίδα στα περισσότερα λαχανικά. Σύμφωνα με τους Brocklehurst et al. (1987) τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. επικρατούν πάνω από άλλα γένη.

3.1.2. Καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών προσδιορισμού στον 2^ο κύκλο του πειράματος

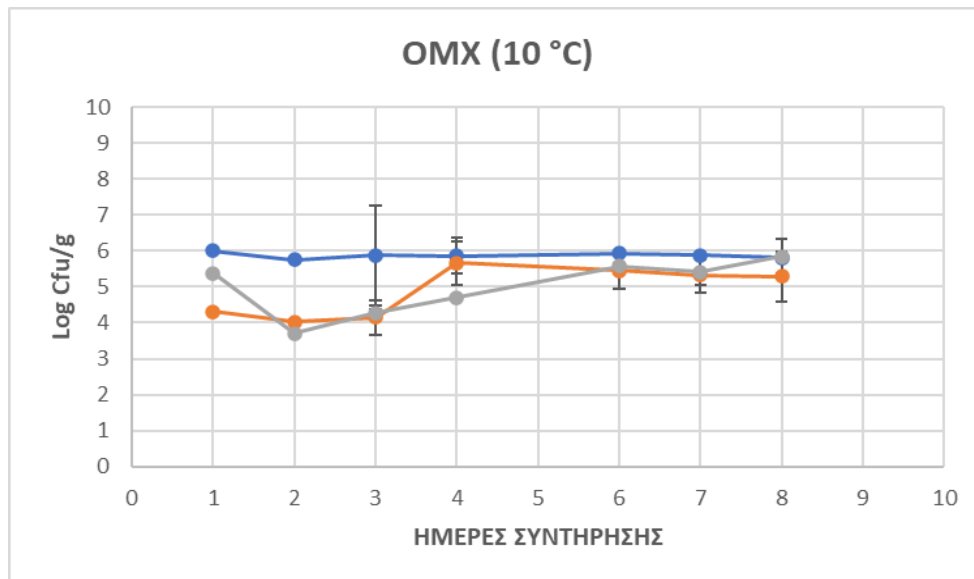
Ομοίως, οι καμπύλες ανάπτυξης των OMX, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), ζυμών / μυκήτων και *Escherichia coli* O157:H7 σε δείγματα λάχανου εμβολιασμένα με μείγμα δύο στελεχών του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 που συντηρήθηκαν στις θερμοκρασίες 4 °C και 10 °C σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, παρουσιάζονται στα παρακάτω **Διαγράμματα 3.13-3.24**. Τα διαγράμματα καταδεικνύουν τη διαφορά της ανάπτυξης των παραπάνω μικροοργανισμών σε σχέση με τις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων (M, S, B) ανά συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού εκφράστηκε σε log Cfū/g, με μέσο όρο και τυπική απόκλιση (\pm) των δύο επαναλήψεων της κάθε περίπτωσης.

Αρχικά σχετικά με τον πληθυσμό της OMX, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 5,462 log Cfū/g (\pm 0,049) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 6,255 log Cfū/g. Στα δείγματα λάχανου S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 4,021 log Cfū/g (\pm 0,067) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε στους 4,849 log Cfū/g (\pm 0,490). Στα δείγματα B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,860 log Cfū/g (\pm 0,049) παρουσιάζοντας, ομοίως, αυξητική τάση φτάνοντας στους 5,211 Log Cfū/g (\pm 0,429). Τέλος, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις παρατηρείται ότι μεγαλύτερη αυξητική τάση του πληθυσμού OMX παρουσιάζεται στα δείγματα B.



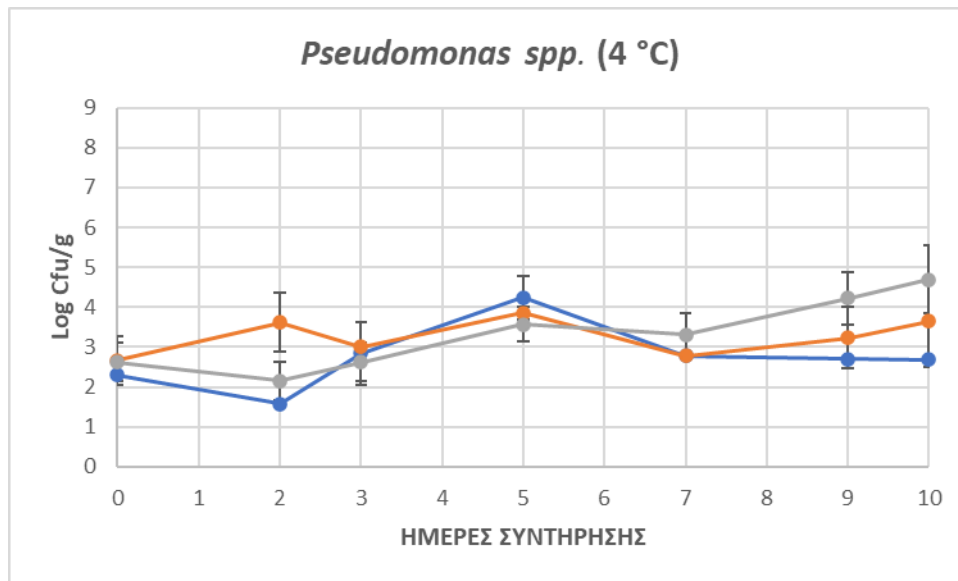
Διάγραμμα 3.13: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού της OMX, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Στους 10 °C, δείγματα λάχανου M, έπειτα από την μικροβιακή ανάλυση, ο πληθυσμός της OMX καταμετρήθηκε στους 6,004 log CfU/g ($\pm 0,014$) και κατά μειώθηκε στους 5,815 log CfU/g ($\pm 0,097$). Στα δείγματα S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 4,317 log CfU/g ($\pm 0,051$) και την τελευταία μέρα συντήρησης έφτασε στους 5,292 log CfU/g ($\pm 0,693$). Τέλος, για τα δείγματα B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 5,385 log CfU/g ($\pm 0,064$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 5,849 log CfU/g ($\pm 0,490$). Συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις, η πρώτη περίπτωση παρουσίασε μείωση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας, OMX συγκριτικά με τις άλλες δύο περιπτώσεις.



Διάγραμμα 3.14: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού της OMX, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

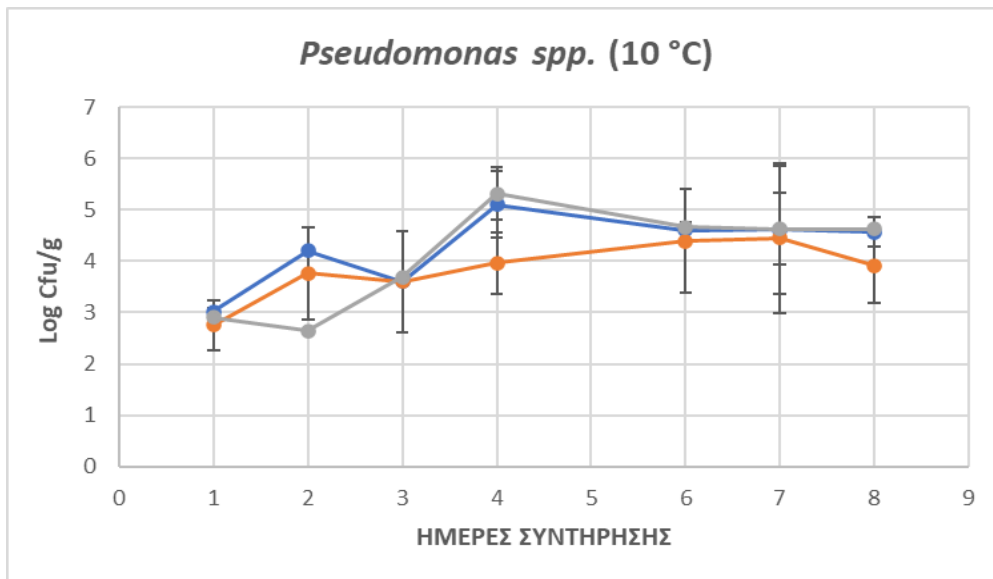
Ακολούθως, στους 4 °C, στα δείγματα M, ο αρχικός πληθυσμός *Pseudomonas spp.* καταμετρήθηκε στους 2,301 log CfU/g και αυξήθηκε φτάνοντας στους 2,778 log CfU/g. Στα δείγματα λάχανου S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,661 log CfU/g ($\pm 0,599$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρουσίασε αυξητική τάση φτάνοντας στους 3,650 log CfU/g ($\pm 1,138$). Τέλος, στα δείγματα λάχανου B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,628 log CfU/g ($\pm 0,490$) παρουσιάζοντας αυξητική τάση κατά τη διάρκεια συντήρησης φτάνοντας στους 4,693 log CfU/g ($\pm 0,851$). Συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις μεγαλύτερη μεταβολή στον πληθυσμό *Pseudomonas spp.* παρουσίασαν τα δείγματα λάχανου B.



Διάγραμμα 3.15: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Pseudomonas spp.*, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

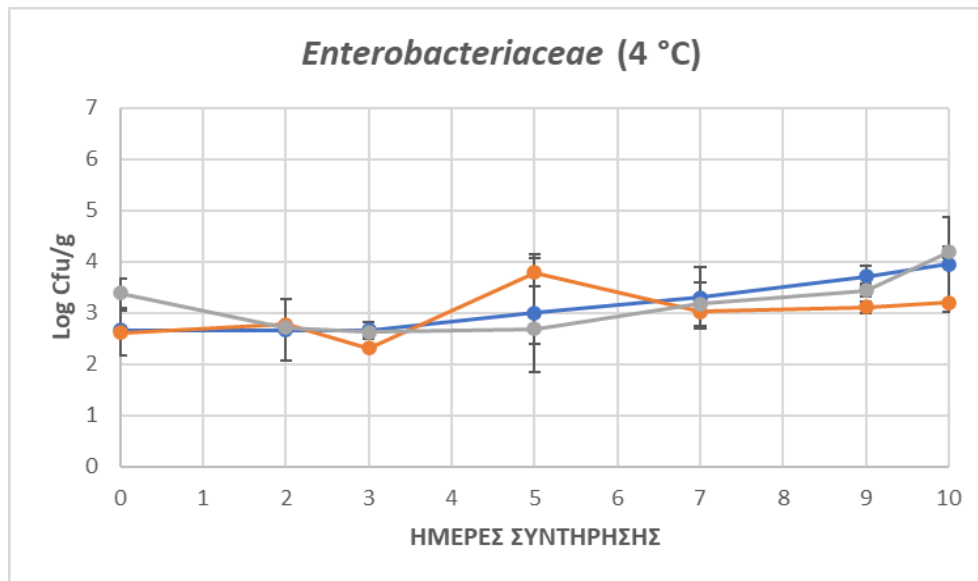
Στους 10 °C, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός *Pseudomonas spp.* καταμετρήθηκε στους 3,021 log CfU/g (\pm 0,067) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,565 log CfU/g (\pm 0,287). Στα δείγματα λάχανου S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,752 log CfU/g (\pm 0,490) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,922 log CfU/g (\pm 0,728). Στα δείγματα B, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,903 log CfU/g και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,63 log CfU/g. Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις των δειγμάτων στους 10 °C, παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια συντήρησης μεγαλύτερη πληθυσμιακή αύξηση των *Pseudomonas spp.* εμφάνισαν τα δείγματα

B.



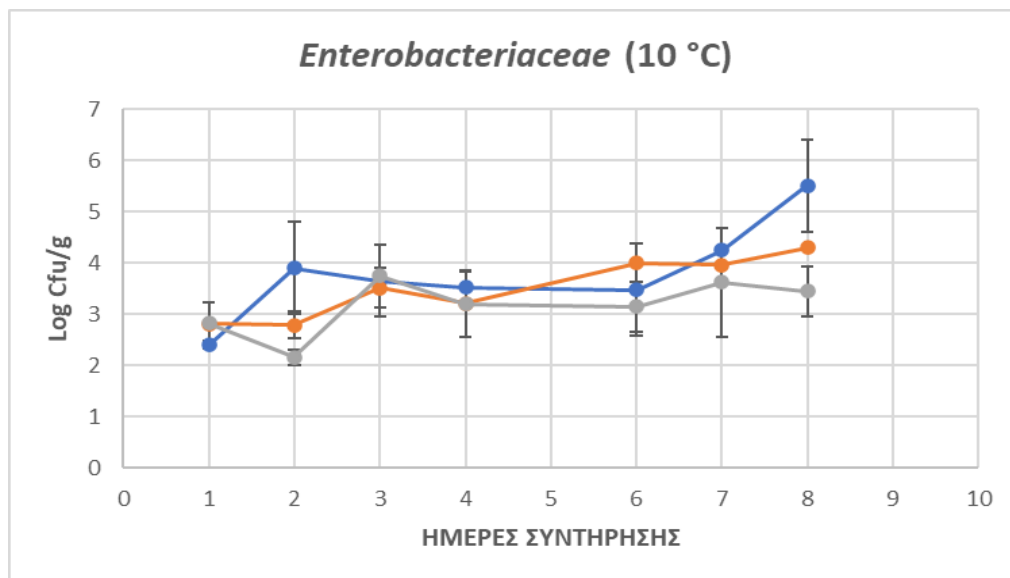
Διάγραμμα 3.16: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Pseudomonas spp.*, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα Μ, (●) δείγματα S και (●) δείγματα Β

Όσον αφορά τα βακτήρια του γένους *Enterobacteriaceae*, στους 4 °C, στα δείγματα Μ ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,667 log CfU/g (\pm 0,015) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε κατά ένα σχεδόν λογάριθμο φτάνοντας στους 3,947 log CfU/g (\pm 0,924). Στα δείγματα S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,609 log CfU/g (\pm 0,429) και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρουσίασε αυξητική τάση φτάνοντας στους 3,204 log CfU/g. Τέλος, στα δείγματα Β ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,389 log CfU/g (\pm 0,287) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,180 log CfU/g (\pm 0,112). Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις, παρατηρείται ότι υψηλότερη πληθυσμιακή αύξηση των *Enterobacteriaceae* παρουσιάζεται στα δείγματα λάχανου Β.



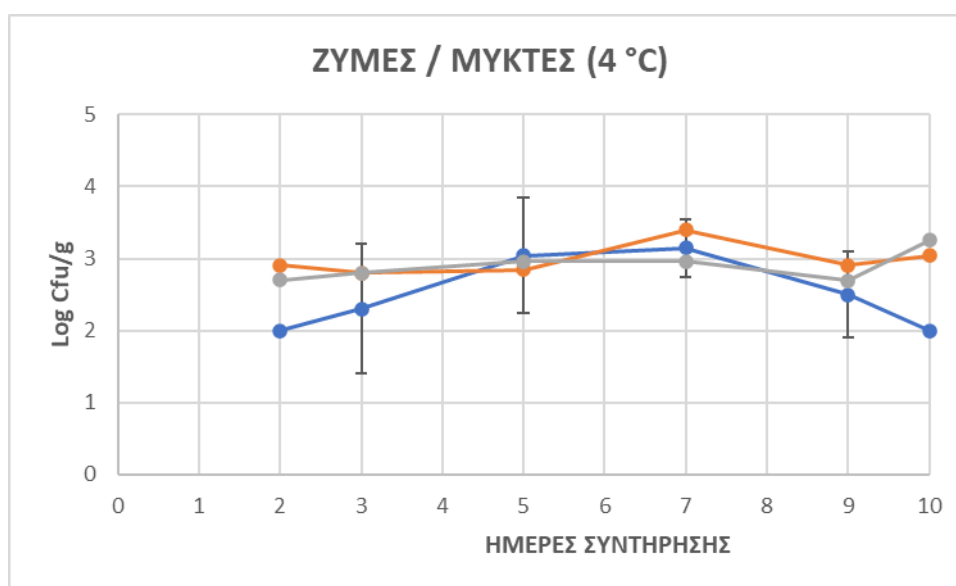
Διάγραμμα 3.17: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Enterobacteriaceae*, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Στους 10 °C, στα δείγματα M ο αρχικός πληθυσμός *Enterobacteriaceae* καταμετρήθηκε στους 2,406 log CfU/g ($\pm 0,083$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 5,514 log CfU/g ($\pm 1,369$). Στα δείγματα λάχανου S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,819 log CfU/g ($\pm 0,021$) την τελευταία ημέρα συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,301 logCfU/g. Τέλος, στα δείγματα B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,827 log CfU/g ($\pm 1,063$) και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρουσίασε αυξητική τάση φτάνοντας στους 3,451 log CfU/g ($\pm 0,490$).



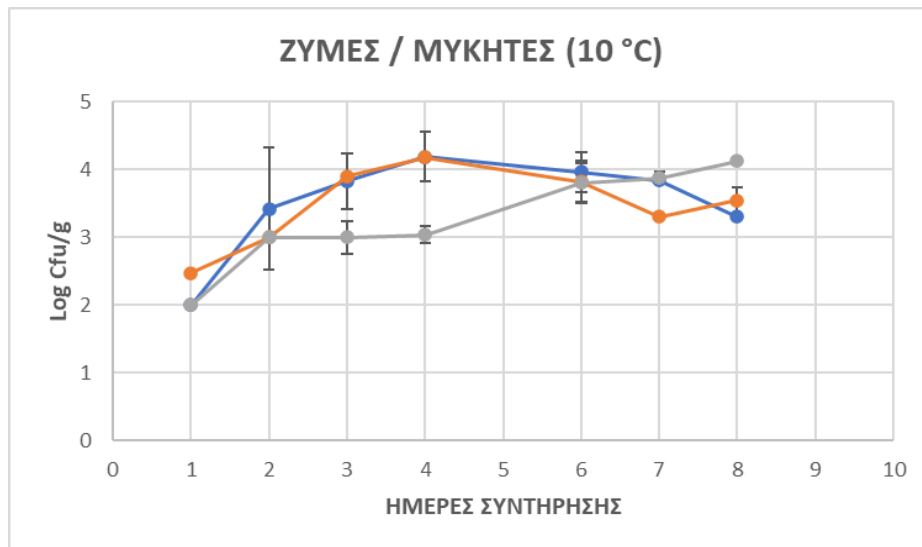
Διάγραμμα 3.18: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *Enterobacteriaceae*, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Σχετικά με τις ζύμες και του μύκητες, στους 4 °C, στα δείγματα Μ ο πληθυσμός ζυμών / μυκήτων ήταν μηδενικός και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 2,000 log CfU/g. Στα δείγματα λάχανου S ο αρχικός πληθυσμός ήταν μηδενικός και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρουσίασε αυξητική τάση φτάνοντας στους 3,041 log CfU/g. Τέλος, στα δείγματα Β ο αρχικός πληθυσμός, επίσης, ήταν μηδενικός και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,252 log CfU/g ($\pm 1,138$). Συνεπώς, συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις, στους 4 °C μεγαλύτερη πληθυσμιακή αύξηση παρουσίασαν τα δείγματα λάχανου Β.



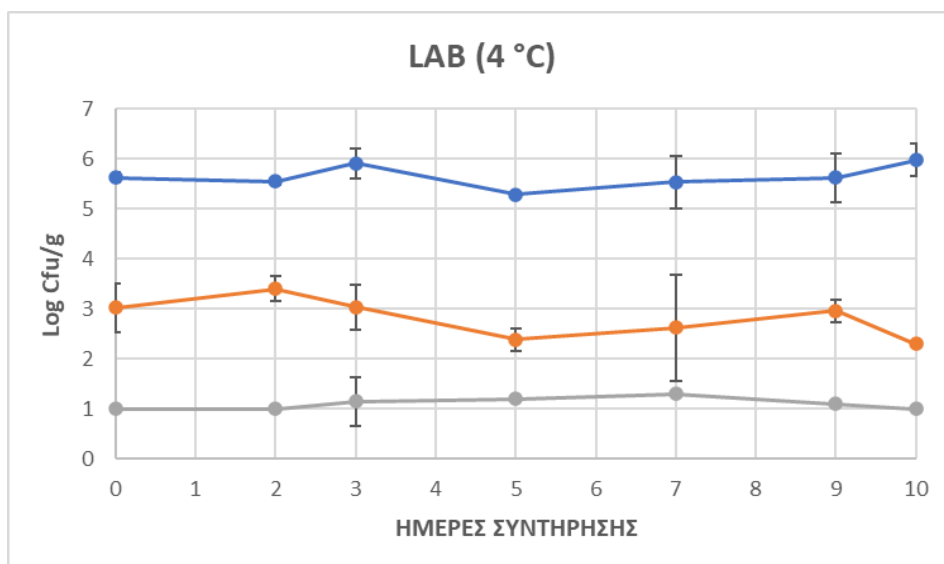
Διάγραμμα 3.19: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού ζυμών / μυκήτων, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα Μ, (●) δείγματα S και (●) δείγματα Β

Στους 10 °C, στα δείγματα Μ, ο αρχικός πληθυσμός ζυμών / μυκήτων καταμετρήθηκε στους 2,000 log CfU/g και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,301 log CfU/g. Στα δείγματα λάχανου S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,477 log CfU/g και κατά τη διάρκεια της συντήρησης ο πληθυσμός αυξήθηκε κατά ένα περίπου λογάριθμο φτάνοντας στους 3,539 log CfU/g ($\pm 0,203$). Στα δείγματα λάχανου Β, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,000 log CfU/g και κατά τη διάρκεια της συντήρησης αυξήθηκε κατά δύο λογαρίθμους φτάνοντας στους 4,120 log CfU/g. Συνεπώς, σύμφωνα και με τις τρεις περιπτώσεις, στους 10 °C, υψηλότερη πληθυσμιακή αύξηση παρουσίασαν τα δείγματα Β.



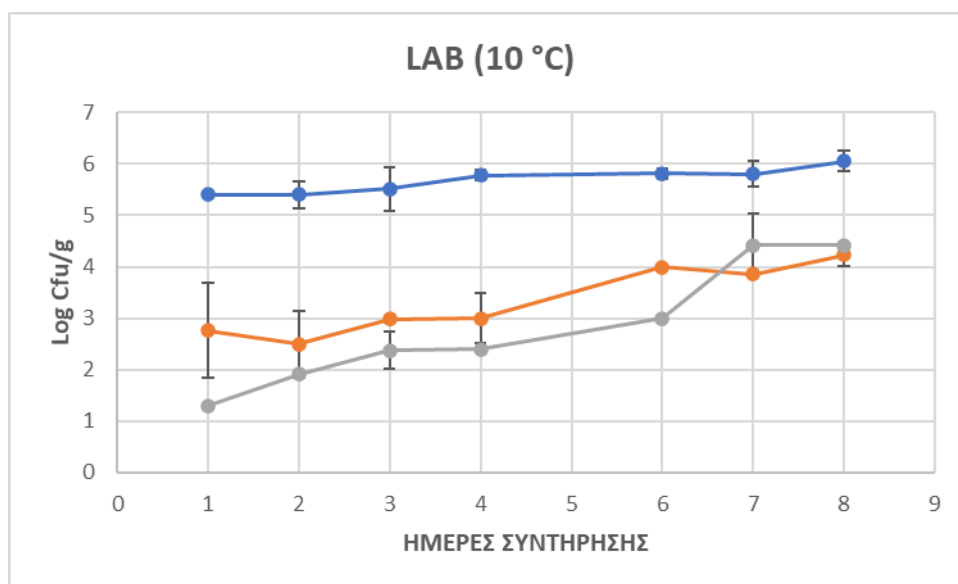
Διάγραμμα 3.20: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού ζυμών / μυκήτων, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Όσον αφορά τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), στους 4 °C, στα δείγματα λάχανου M ο αρχικός πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων καταμετρήθηκε στους 5,630 log CfU/g (\pm 0,091) και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρατηρήθηκε ελάχιστη αύξηση φτάνοντας στους 5,980 log CfU/g (\pm 0,323). Στα δείγματα S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,025 log CfU/g (\pm 0,490) και στο τέλος της συντήρησης μειώθηκε φτάνοντας στους 2,301 log CfU/g. Τέλος, στα δείγματα λάχανου B, ο μικροβιακός πληθυσμός ήταν μηδενικός.



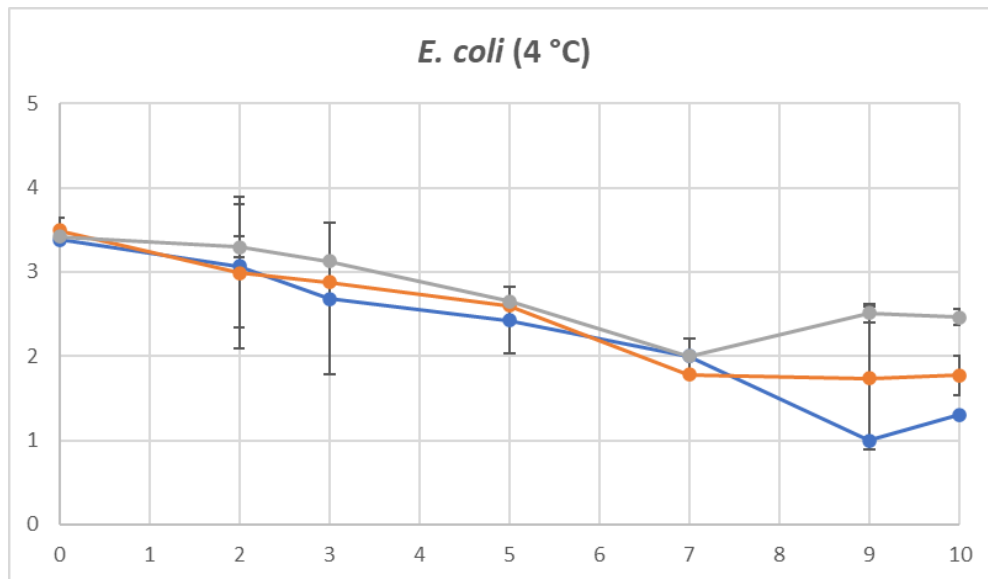
Διάγραμμα 3.21: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Στους 10 °C, στα δείγματα λάχανου M ο αρχικός πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων καταμετρήθηκε στους 5,616 log CfU/g (\pm 0,030) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 6.060 log CfU/g (\pm 0,196). Στα δείγματα S ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,763 log CfU/g (\pm 0,931) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,233 log CfU/g (\pm 0,222). Στα δείγματα B ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 1,301 log CfU/g και κατά την τελευταία ημέρα συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,414 log CfU/g.



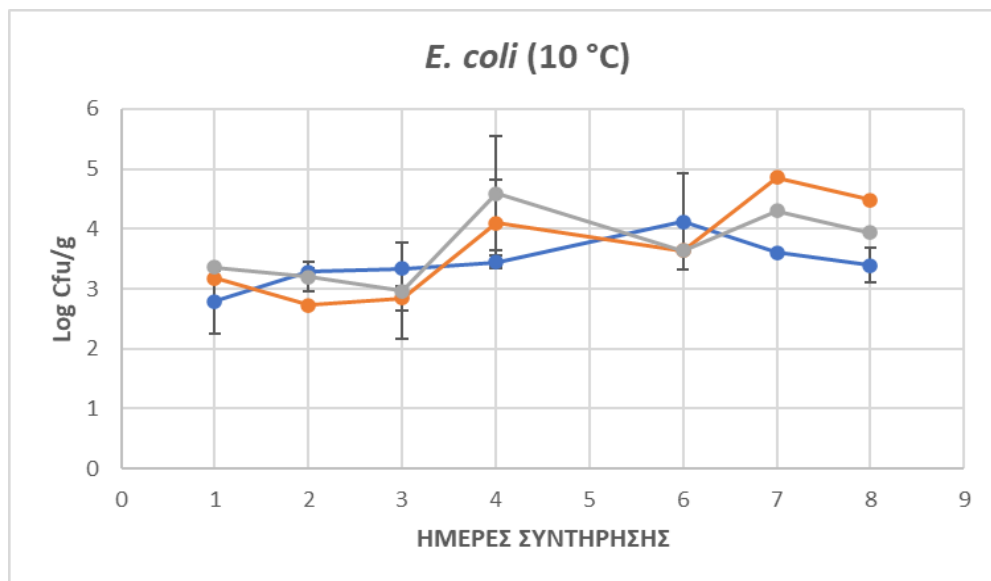
Διάγραμμα 3.22: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Αρχικά, στα δείγματα M, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,382 log CfU/g (\pm 0,053) και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρουσίασε σταδιακή μείωση φτάνοντας στους 1,301 log CfU/g. Στα δείγματα λάχανου S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,489 log CfU/g (\pm 0,156) και κατά τη διάρκεια συντήρησης μειώθηκε φτάνοντας στους 1,776 log CfU/g (\pm 0,238) . Τέλος, στα δείγματα B, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,416 log CfU/g (\pm 0,030) και κατά τη διάρκεια συντήρησης μειώθηκε φτάνοντας στους 2,461 log CfU/g (\pm 0,098).



Διάγραμμα 3.23: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *E. Coli* O157:H7, στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

Στους 10 °C, στα δείγματα λάχανου M, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 2,789 log CfU/g (\pm 0,539) και κατά τη διάρκεια συντήρησης παρουσίασε αύξηση φτάνοντας στους 3,389 log CfU/g (\pm 0,287). Στα δείγματα S, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,176 log CfU/g (\pm 0,047) και κατά τη διάρκεια συντήρησης αυξήθηκε φτάνοντας στους 4,477 log CfU/g. Τέλος, στα δείγματα B, ο αρχικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στους 3,358 log CfU/g (\pm 0,059) και κατά τη διάρκεια συντήρησης, επίσης, αυξήθηκε φτάνοντας στους 3,934 log CfU/g.

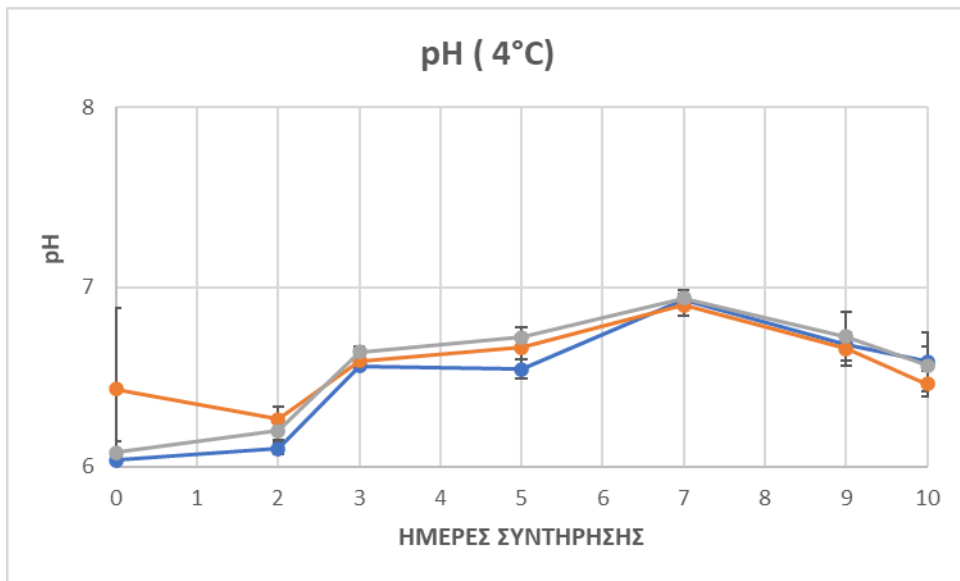


Διάγραμμα 3.24: Καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού *E. Coli* O157:H7, στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα M, (●) δείγματα S και (●) δείγματα B

3.2. Αποτελέσματα μέτρησης pH

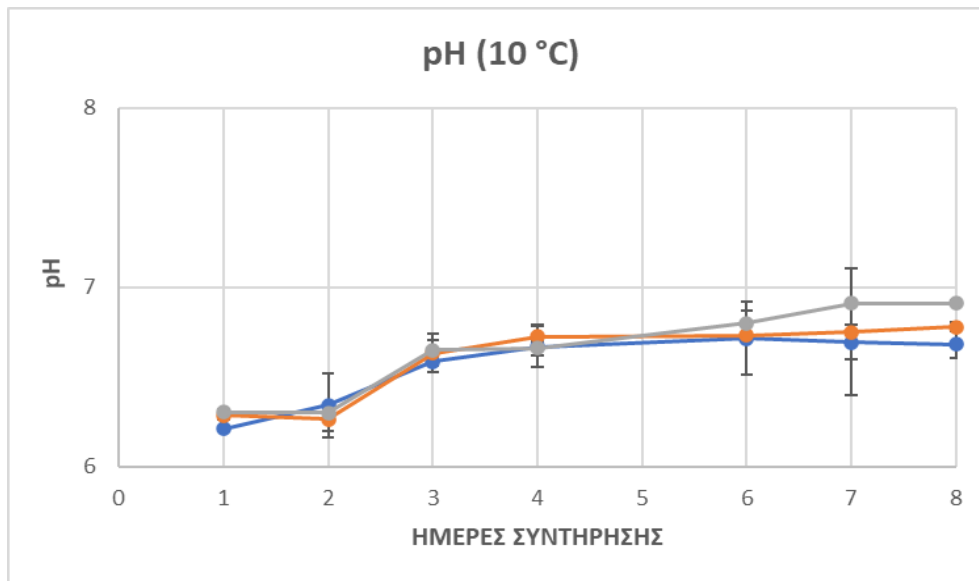
Για κάθε περίπτωση M, S, B υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο τιμών και η τυπική απόκλιση (\pm) pH.

Στον 1^ο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας, στους 4 °C, οι μετρήσεις pH των δειγμάτων M, S, B σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης καταδεικνύουν και για τις τρεις περιπτώσεις μια αρχική αύξηση και στο τέλος μείωση του pH, όπως παρουσιάζεται και στο ακόλουθο **Διάγραμμα 3.25**. Την τελευταία ημέρα συντήρησης, για τα δείγματα M η τιμή pH καταμετρήθηκε 6,59 (\pm 0,16), για τα δείγματα S καταμετρήθηκε 6,46 (\pm 0,07) και για τα δείγματα B καταμετρήθηκε 6,57 (\pm 0,11). Συνεπώς, παρατηρείται όμοια μεταβολή και στις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων.



Διάγραμμα 3.25: Παρουσίαση της μεταβολής του pH στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα S, (●) δείγματα M και (●) δείγματα B.

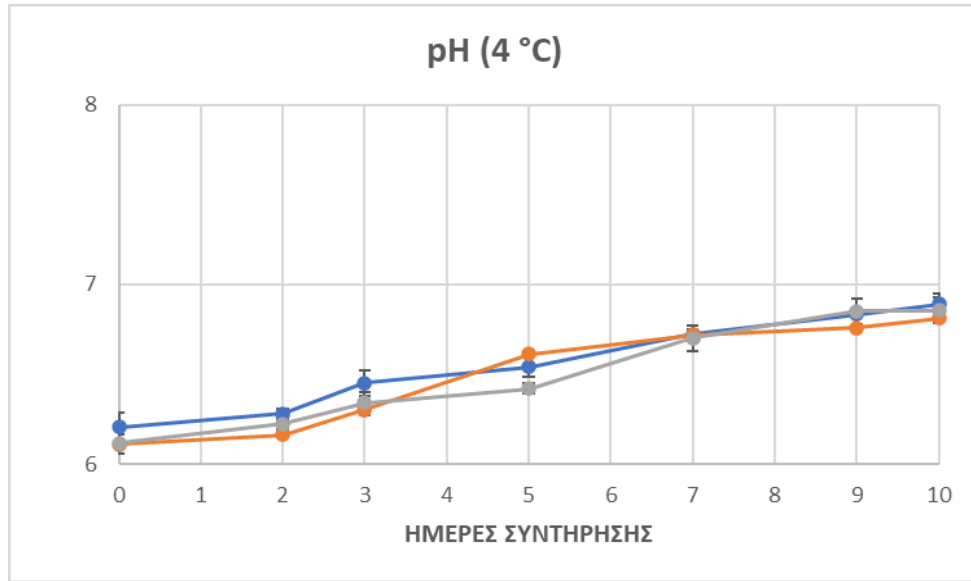
Αντίθετα, οι μετρήσεις pH των δειγμάτων στους 10 °C συναρτήσει του χρόνου συντήρησης καταδεικνύουν μία αυξητική τάση και στις τρεις περιπτώσεις, όπως παρουσιάζεται στο ακόλουθο **Διάγραμμα 3.26**. Πιο συγκεκριμένα, και στις τρεις περιπτώσεις των δειγμάτων, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, η αυξητική τάση είναι παρόμοια ωστόσο παρατηρείται ότι τα δείγματα λάχανου B, το τελευταίο διάστημα συντήρησης, παρουσιάζουν μια αρκετά διακριτή αύξηση σε σχέση με τα δείγματα M και S. Πιο συγκεκριμένα, την τελευταία ημέρα συντήρησης, για τα δείγματα M το pH καταμετρήθηκε $6,68 (\pm 0,08)$, για τα δείγματα S καταμετρήθηκε $6,78 \pm (0,03)$ και για τα δείγματα B καταμετρήθηκε $6,91 (\pm 0,01)$.



Διάγραμμα 3.26: Παρουσίαση της μεταβολής του pH στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα S, (●) δείγματα M και (●) δείγματα B.

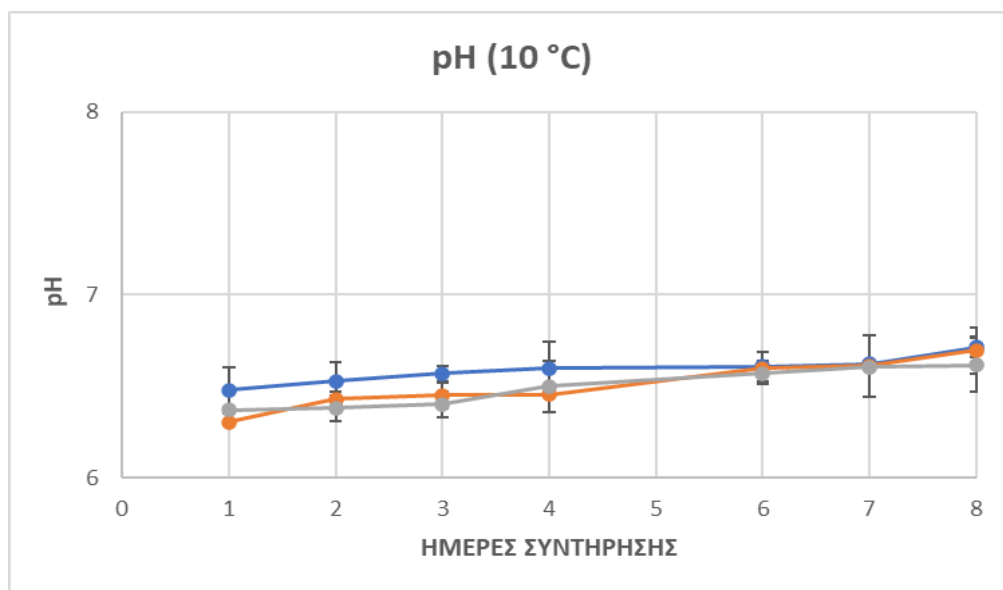
Σε έρευνά τους οι Alegbeleye & Sant' Ana (2022), έπειτα από καταμέτρηση του pH σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες από άσπρο και κόκκινο λάχανο εμβολιασμένες με στελέχη *Listeria monocytogenes* ότι έπειτα από συντήρηση στους 16 °C το τελικό pH καταμετρήθηκε για το άσπρο λάχανο 5,4 και για το κόκκινο 5,7. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία τιμή pH την τελευταία ημέρα συντήρησης έφτασε έως τις τιμές 6,5 με 7, περίπου. Το pH των περισσότερων λαχανικών είναι στο εύρος 4,8-6,5 και έτσι τόσο οι μυκητιακές όσο και οι βακτηριακές ομάδες μπορεί να προκαλέσουν την αλλοίωση τους (Beuchat, 2002). Τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε σχεδόν ουδέτερο pH (\geq pH 4,5) (Hoagland et al., 2018). Ωστόσο, τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα ανάπτυξης και σε χαμηλότερες τιμές pH. Οι μύκητες είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητοι στο pH και μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα συνήθως εντός του εύρους pH 3-8 (Baldwin et al., 1999; Moss, 2008).

Στον 2^ο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας, στους 4 °C, οι μετρήσεις pH των δειγμάτων M, S, B σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης καταδεικνύουν και για τις τρεις περιπτώσεις αυξητική τάση έως την τελευταία ημέρα συντήρησης όπως παρουσιάζεται και στο ακόλουθο **Διάγραμμα 3.27**. Την τελευταία μέρα συντήρησης, για τα δείγματα M το pH καταμετρήθηκε 6,89 (\pm 0,06), για τα δείγματα S καταμετρήθηκε 6,81 (\pm 0,01) και για τα δείγματα B 6,86 (\pm 0,07).



Διάγραμμα 3.27: Παρουσίαση της μεταβολής του pH στους 4 °C, όπου: (●) δείγματα S, (■) δείγματα M και (●) δείγματα B.

Ομοίως, οι μετρήσεις pH των δειγμάτων στους 10 °C συναρτήσει του χρόνου συντήρησης καταδεικνύουν αυξητική τάση και στις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων, όπως παρουσιάζεται στο ακόλουθο **Διάγραμμα 3.28**. Πιο συγκεκριμένα, για τα δείγματα M το pH καταμετρήθηκε $6,71 (\pm 0,06)$, για τα δείγματα S καταμετρήθηκε $6,70 \pm 0,12$ και για τα δείγματα B καταμετρήθηκε $6,61 (\pm 0,15)$.



Διάγραμμα 3.28: Παρουσίαση της μεταβολής του pH στους 10 °C, όπου: (●) δείγματα S, (●) δείγματα M και (●) δείγματα B

Συνεπώς, και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζεται παρόμοια μεταβολή pH ανάμεσα στα δείγματα M, S και B τόσο στους 4 °C όσο και στους 10 °C.

3.3. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου

Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων λάχανου και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας, παρουσιάζονται στα **Σχήματα 3.1-3.2**.

Ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων M, S, B των 4 °C και 10 °C, σύμφωνα με τον οργανοληπτικό έλεγχο, παρατίθεται στο ακόλουθο **Σχήμα 3.1**. Στους 4 °C, τα δείγματα M και S από την ημέρα 0 των δειγματοληψιών έως την ημέρα 5 αξιολογήθηκαν ως “φρέσκα” Όσον αφορά το χρώμα, την οσμή και την εμφάνιση. Από την ημέρα 7 παρουσίασαν προφίλ “ημι-φρέσκου προϊόντος” έως ότου την ημέρα 10 όπου πραγματοποιήθηκε η απόρριψή τους οργανοληπτικά. Τα δείγματα B εμφάνισαν πιο γρήγορη αλλοίωση καθώς από την ημέρα 9 οργανοληπτικά απορρίπτονταν. Στους 10 °C, τα δείγματα M, S, B απορρίφθηκαν σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα και συγκεκριμένα την ημέρα 8. Τα δείγματα M και S ως προς την οσμή απορρίφθηκαν από την ημέρα 7 ενώ την μέρα 8 απορρίφθηκαν και ως προς τις τρεις ιδιότητες. Τα δείγματα B απορρίφθηκαν και ως προς τις τρεις ιδιότητες από την ημέρα 7. Συνεπώς, τα δείγματα M και S παρουσίασαν μερικώς καλύτερο οργανοληπτική αξιολόγηση συγκριτικά με τα

δείγματα B εφόσον παρατηρείται παράταση το χρόνου ζωής των δειγμάτων κατά μία ημέρα(shelf-life extension).

		<i>Listeria monocytogenes</i>								
		M			S			B		
Days of storage		Col	Od	Ap	Col	Od	Ap	Col	Od	Ap
4 °C	0	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow
	7	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
	9	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Red
	10	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
10 °C	1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	4	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow
	6	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
	7	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Red
	8	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
	8	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Score key:		Green 1	Yellow 2	Red 3						
								Col= Color		
								Od= Odor		
								Ap= Appearance		

Σχήμα 3.1: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων M, S, B του 1^{ου} κύκλου της πειραματικής διαδικασίας στους 4 °C και 10 °C

Ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων M, S, B των 4 °C και 10 °C, σύμφωνα με τον οργανοληπτικό έλεγχο, παρατίθεται στο ακόλουθο **Σχήμα 3.2**. Στους 4 °C, τα δείγματα M και S παρουσίασαν προφίλ “φρέσκου” προϊόντος έως την μέρα 5 των δειγματοληψιών αξιολογώντας το χρώμα, την οσμή και την εμφάνιση. Τα συγκεκριμένα δείγματα απορρίφθηκαν την μέρα 10 αξιολογώντας τις τρεις παραπάνω ιδιότητες. Τα δείγματα B, επίσης, έως την ημέρα 5 των δειγματοληψιών παρουσίασαν προφίλ “φρέσκου” προϊόντος, ωστόσο η απόρριψη πραγματοποιήθηκε από την ημέρα 9. Στους 10 °C, καλύτερο οργανοληπτικό προφίλ παρουσίασαν τα δείγματα S. Η απόρριψή τους πραγματοποιήθηκε την ημέρα 9. Τα δείγματα B ως προς και τις τρεις ιδιότητες απορρίφθηκαν την ημέρα 9 ωστόσο την μέρα 6 απορρίφθηκαν ως προς την οσμή. Συνεπώς, τα δείγματα M, S, B στους 4 °C παρουσίασαν καλύτερο οργανοληπτικό προφίλ και ειδικότερα τα δείγματα M και S παρουσίασαν παράταση του χρόνου ζωής κατά μία μέρα (shelf-life extension).

		Escherichia coli O157:H7								
		M			S			B		
Days of storage		Col	Od	Ap	Col	Od	Ap	Col	Od	Ap
4 °C	0	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	7	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
	9	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
10	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	
10 °C	1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	4	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	6	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow
	7	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
	7	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
	8	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Key score:		Green 1	Yellow 2	Red 3						
								Col=	Color	
								Od=	Odor	
								Ap=	Appearance	

Σχήμα 3.2: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων M, S, B του 2ου κύκλου της πειραματικής διαδικασίας στους 4 °C και 10 °C

Η μικροβιολογική αλλοίωση του λάχανου σχετίζεται και με την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Πιο συγκεκριμένα κατά τη μικροβιολογική αλλοίωση τα περισσότερα φρεσκο-κομμένα λαχανικά παρουσιάζουν αποχρωματισμό της επιφάνειάς τους, απώλεια υγρασίας, δυσάρεστη οσμή και γέυση, αλλαγή υφής ακόμη και ανάπτυξη μικροβιακών αποικιών στις επιφάνειές τους (Sapers Miller et al., 2001; O'Connor-Shaw, 1994). Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, οργανοληπτικά η απόρριψη του λάχανου πραγματοποιήθηκε λόγω μαυρίσματος των φύλλων αλλά κυρίως λόγω της οσμής, η οποία όπως προαναφέρθηκε στην **Ενότητα 3.1.1** είναι πιθανό να οφείλεται στην παραγωγή μεταβολιτών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια με αποτέλεσμα η οσμή να επηρεάζεται από την παραγωγή αιθανόλης, οργανικών οξέων, εστέρων και CO₂. Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου της παρούσας εργασίας, παρατηρείται ότι η θερμοκρασία καθορίζει σημαντικά τη συντήρηση του τροφίμου καθώς και στους δύο κύκλους της πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα που συντηρήθηκαν τους 4 °C παρουσίασαν αύξηση του χρόνου ζωής κατά μία ημέρα. Σύμφωνα και με τους García-Gimeno & Zurera-Cosano (1997) διαφορές παρουσίασαν οι σαλάτες λαχανικών αποθηκευμένες στους 4 °C και 15 °C καθώς οι σαλάτες αποθηκευμένες στους 4 °C έπειτα από 60 ώρες συντήρησης από ένα προφίλ πολύ καλό χαρακτηρίστηκαν, επίσης, με καλό προφίλ μετά το πέρας των

συγκεκριμένων ωρών. Αντίθετα, οι σαλάτες που αποθηκεύτηκαν στους 15 °C, έπειτα από το πέρας των 60 ωρών χαρακτηρίστηκαν με όχι τόσο καλή εμφάνιση.

3.4. Αποτελέσματα ταχέων μεθόδων

3.4.1. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT-IR και την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, από τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν, και από τους δύο κύκλους της πειραματικής πορείας, μελετήθηκε η περιοχή μεταξύ των 1800 cm^{-1} έως 870 cm^{-1} (Al.-Jowder et. al., 1999; Ellis et. al., 2002; Di Egidio et. al., 2009). Αντιπροσωπευτικές περιοχές στις οποίες εντοπίζονται οι δονήσεις δεσμών μορίων που καταδεικνύουν την αλλοίωση του λάχανου είναι: η περιοχή $1200\text{-}870\text{ cm}^{-1}$ στην οποία εντοπίζονται οι δονήσεις των δεσμών των σακχάρων και ειδικότερα της γλυκόζης (Lin et. al., 2009) , η περιοχή $1200\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ στην οποία εντοπίζονται δονήσεις μορίων που αποτελούνται από άτομα H (Hamidabadi Sherani et. al., 2017), η περιοχή $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ στην οποία εντοπίζονται δονήσεις αμιδίου I και II καθώς και πρωτεΐνες ή πεπτίδια και στα 1740 cm^{-1} εντοπίζονται δονήσεις μορίων που καταδεικνύουν την ύπαρξη λιπαρών οξέων (Lin et. al., 2009). Σύμφωνα και με τους Arrais et al. (2004) και Arrais et al.(2011) στο φασματοσκοπικό εύρος $1800\text{ cm}^{-1} - 1650\text{ cm}^{-1}$ παρουσιάζονται δονήσεις δεσμών που αντιστοιχούν σε καρβονυλομάδα και συνεπώς όπως προαναφέρθηκε η καρβονυλομάδα είναι πιθανό να αντιστοιχεί στην ύπαρξη λιπαρών οξέων ως μέρος της καρβονυλομάδας στην καρβοξυλομάδα τους. Στο φασματοσκοπικό εύρος $1200\text{ cm}^{-1} - 1000\text{ cm}^{-1}$ εντοπίζεται η δόνηση δεσμού αιθερομάδας C-O. Ωστόσο, στην παρούσα ερευνητική εργασία λόγω της στερεής μορφής λάχανου με την οποία αναλύθηκε με τη χρήση του οργάνου FTIR 6200 JASCO, τα φάσματα δεν παρουσίασαν αποτελεσματικά κορυφές με αποτέλεσμα την μη επιτυχή ανίχνευση της αλλοίωσης με τη χρήση του συγκεκριμένου αισθητήρα.

Πίνακας 3.1: Παρουσίαση αντιπροσωπευτικών περιοχών στο FTIR

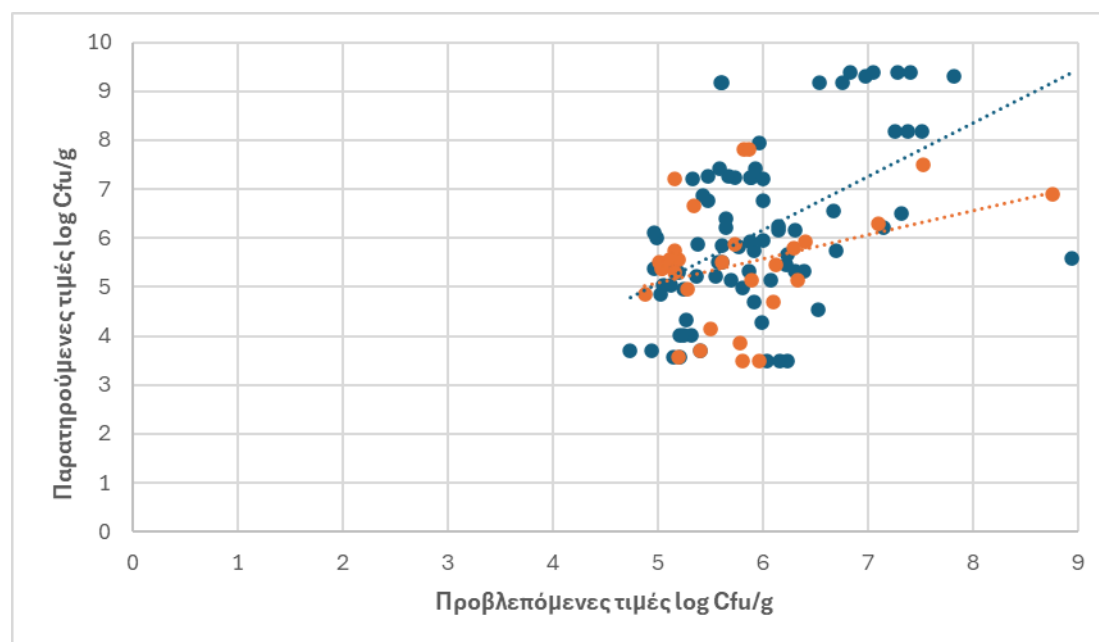
Περιοχή FTIR φάσματος (cm^{-1})	Δονήσεις δεσμών	Αναφορά
1200-870 cm^{-1}	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Lin et. al., 2009
1200-1500 cm^{-1}	CCH, HCH, COH, HCO	Hamidabadi Sherani et. al., 2017
1650-1550 cm^{-1}	Αμίδιο I και II, πρωτεΐνες, πεπτίδια	Lin et. al., 2009
1740 cm^{-1}	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$	Lin et. al., 2009

Για την εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού της OMX κατά τη συντήρηση των δειγμάτων λάχανου M, S, B των δύο θερμοκρασιών και των δύο κύκλων της πειραματικής διαδικασίας, δημιουργήθηκε μοντέλο σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα από το όργανο FTIR 6200 JASCO. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι δείκτες απόδοσης σχετικά με την αξιολόγηση του μοντέλου Όσον αφορά την επικύρωση και την πρόβλεψη. Για την δημιουργία του μοντέλου, πραγματοποιήθηκε η χρήση των δεδομένων όπως αναφέρεται στην **Ενότητα 2.6.1**.

Πίνακας 3.1 : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R για τα δεδομένα του οργάνου FTIR 6200 JASCO

ΟΡΓΑΝΟ	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	lope	Offset	R ²	RMSE
FTIR 6200 JASCO	Επικύρωση CV	0,490	2,639	0,258	1,244
	Πρόβλεψη (n=78)	1,092	0,381	0,114	1,464
	Ανάπτυξη (n=151)	1,000	3·10 ⁻¹³	0,279	1,145

Σύμφωνα με τα δεδομένα του **Πίνακα 3.1** που προκύπτουν από το όργανο FTIR 6200 JASCO παρατηρείται μη ικανοποιητική συσχέτιση με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX καθώς η τιμή του R² για την πρόβλεψη είναι 0,114 και του RMSE είναι 1,464. Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα.



Διάγραμμα 3.29: Συσχέτιση των τιμών επικύρωσης CV (●) και πρόβλεψης (●) τιμών για την εκτίμηση της OMX από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας FTIR

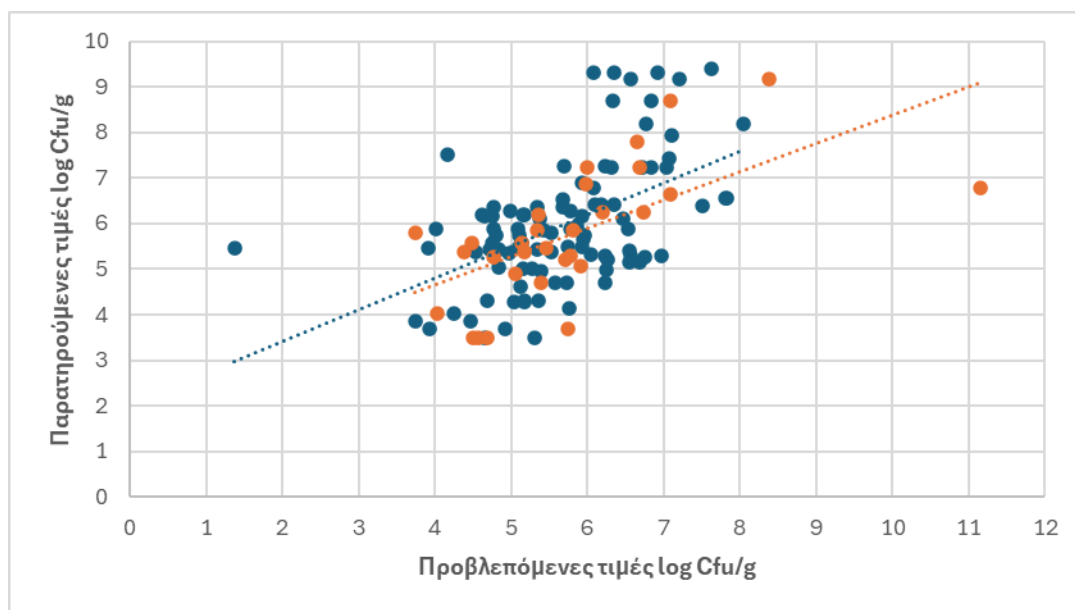
3.4.2. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI με τη χρήση του αισθητήρα VideometerLab και την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R

Για την εκτίμηση του πληθυσμού της OMX κατά τη συντήρηση των δειγμάτων λάχανου M, S, B και των δύο θερμοκρασιών, των δύο περιπτώσεων, δημιουργήθηκε μοντέλο σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα από το όργανο VideometerLab. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι δείκτες απόδοσης για την αξιολόγηση του μοντέλου Όσον αφορά την επικύρωση και την πρόβλεψή του. Για τη πραγματοποίηση του συγκεκριμένου μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα δεδομένα (**Ενότητα 2.6.1**).

Πίνακας 3.2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R για τα δεδομένα του οργάνου VideometerLab

ΟΡΓΑΝΟ	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	Slope	Offset	R ²	RMSE
VideometerLab	Επικύρωση CV	0,623	2,162	0,396	1,212
	Πρόβλεψη (n=98)	0,695	0,273	0,273	1,224
	Ανάπτυξη (n=197)	1	$2 \cdot 10^{-13}$	0,466	0,950

Σύμφωνα με τα δεδομένα του **Πίνακα 3.2** που προκύπτουν από το όργανο VideometerLab παρατηρείται μη ικανοποιητική συσχέτιση με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX καθώς για την πρόβλεψη η τιμή του R² είναι 0,273 και για το RMSE είναι 1,224. Ακολούθως, παρατίθεται το διάγραμμα συσχέτισης των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών και παρουσιάζονται τα παραπάνω αποτελέσματα σύμφωνα με την ευθεία: $y=ax+\beta$, όπου: α: η κλίση της ευθείας και β: ο σταθερός όρος.



Διάγραμμα 3.30: Συσχέτιση των τιμών επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τη χρήση του αισθητήρα VideometerLab

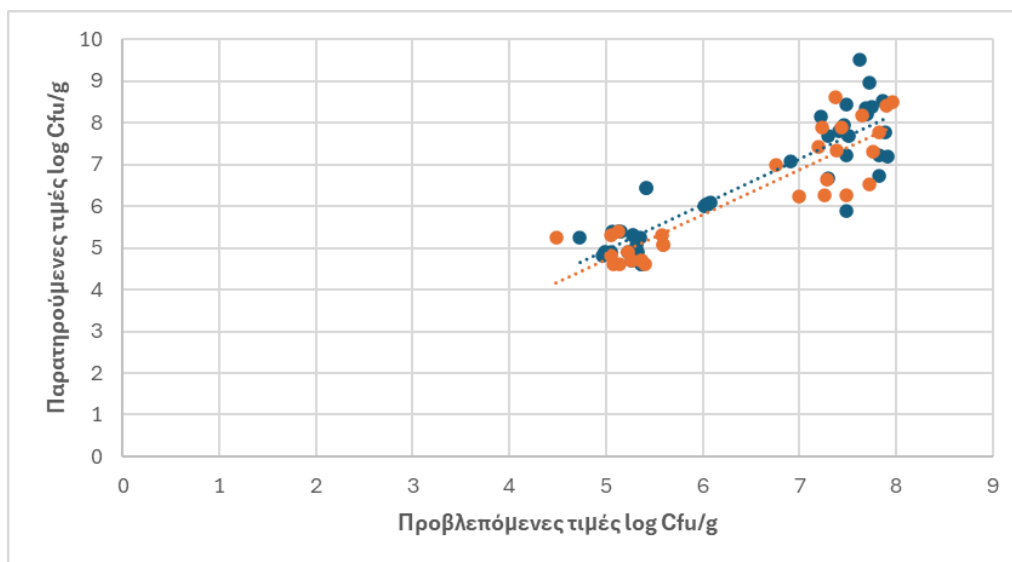
3.4.3. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI με τη χρήση του αισθητήρα VideometerLite και την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R

Ομοίως, για την εκτίμηση της OMX κατά τη συντήρηση των δειγμάτων M, S, B των 2 θερμοκρασιών, και των δύο τμημάτων της πειραματικής διαδικασίας, δημιουργήθηκε μοντέλο σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα από το όργανο VideometerLite. Στον ακόλουθο πίνακα, παρουσιάζονται οι δείκτες απόδοσης για την αξιολόγηση του μοντέλου Όσον αφορά την επικύρωση και την πρόβλεψή του. Για τη δημιουργία του μοντέλου, πραγματοποιήθηκε η χρήση των κατάλληλων δεδομένων όπως αναφέρεται στην **Ενότητα 2.6.1**.

Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R για τα δεδομένα του οργάνου VideometerLite

ΟΡΓΑΝΟ	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	Slope	Offset	R ²	RMSE
VideometerLite	Επικύρωση CV	1,076	0,661	0,807	0,633
	Πρόβλεψη (n=48)	1,088	0,489	0,795	0,722
	Ανάπτυξη (n=79)	1	$3 \cdot 10^{-14}$	0,814	0,559

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 3.3** από το όργανο VideometerLite παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση των συγκεκριμένων δεδομένων με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX καθώς για την πρόβλεψη η τιμή R^2 είναι 0,795 και η τιμή του RMSE είναι 0,722. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το διάγραμμα των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών στο οποίο παρατίθενται τα παραπάνω αποτελέσματα σε σχέση με την ευθεία: $y=ax+\beta$.



Διάγραμμα 3.3 : Συσχέτιση των τιμών επικύρωσης (●) και των τιμών της πρόβλεψης (●) για την εκτίμηση της OMX με τη χρήση του αισθητήρα VideometerLite

4. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας επιβεβαιώνεται ότι η χαμηλή θερμοκρασία στο εύρος 0-5 °C, όπως προαναφέρθηκε, αυξάνει τη διάρκεια ζωής του λάχανου διατηρώντας σε χαμηλότερα επίπεδα τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με την ανάπτυξη των παθογόνων, στον 1^ο κύκλο της πειραματικής διαδικασίας παρατηρείται ότι στα δείγματα M, S, B στους 4 °C, η ανάπτυξη του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* ήταν μικρότερη από ότι στα δείγματα M, S, B στους 10 °C. Επίσης, στους 4 °C παρατηρείται και διαφορά στον πληθυσμό της *Listeria monocytogenes* ανάμεσα στα δείγματα M, S, B και συγκεκριμένα στα δείγματα M, S ο πληθυσμός την τελευταία ημέρα συντήρησης καταμετρήθηκε ένα λογάριθμο μικρότερο. Αντίθετα στους 10 °C, τα επίπεδα της *Listeria monocytogenes* ήταν ίδια και στα τρία δείγματα. Στον 2^ο κύκλο, παρατηρείται, επίσης, στα δείγματα M, S, B στους 4 °C μικρότερη πληθυσμιακή αύξηση και στα δείγματα M και S να υπάρχει περιορισμός ανάπτυξης του *Escherichia coli* O157:H7 συγκριτικά με τα δείγματα B. Ομοίως, με τον 1^ο κύκλο, τα δείγματα στους 10 °C, δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά μεταξύ τους ως προς την ανάπτυξη του παθογόνου. Συνεπώς, σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα καταδεικνύεται η βιοπροστατευτική δράση των οξυγαλακτικών καλλιεργειών αλλά σημαντικό ρόλο κατέχει και η αντιμικροβιακή ιδιότητα του λάχανου ως προς τα χαμηλά σχετικά επίπεδα των μικροοργανισμών.

Σύμφωνα με την καταμέτρηση του pH, τόσο στον 1^ο όσο και στον 2^ο κύκλο της πειραματικής πορείας, τα δείγματα M, S, B παρουσίασαν σχεδόν όμοια μεταβολή pH. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές pH κυμαίνονταν στο εύρος 6 έως 7, δηλαδή σε σχεδόν ουδέτερο pH που όπως προαναφέρθηκε η ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών ευνοείται σε ουδέτερο pH. Η αύξηση του pH οφείλεται στη μικροβιακή δραστηριότητα.

Οργανοληπτικά, και στους δύο κύκλους της πειραματικής πορείας, παρατηρείται ότι τα δείγματα M, S, B που ήταν αποθηκευμένα σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, MAP στους 4 °C, η απόρριψή τους πραγματοποιήθηκε μία ημέρα αργότερα συγκριτικά με τα δείγματα M, S, B στους 10 °C. Συνεπώς, παρατηρείται παράταση του της διάρκειας ζωής τους (shelf-life) κατά μία ημέρα. Οργανοληπτικά, η απόρριψη του λάχανου πραγματοποιήθηκε, κυρίως, λόγω οσμής. Σχετικά με το χρώμα,

η ανάπτυξη σκούρου χρώματος, λόγω του φαινομένου της ενζυμικής αμαύρωσης, δεν ήταν έντονη. Σε αυτό οφείλεται η δράση της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας, MAP με χαμηλά επίπεδα O_2 με αποτέλεσμα τον περιορισμό της οξείδωσης.

Σχετικά με τα δεδομένα των φασματοσκοπικών τεχνικών ανάλυσης και την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R καλύτερη συσχέτιση των φασματοσκοπικών δεδομένων με την εκτίμηση της OMX παρουσίασε ο αισθητήρας VideometerLite. Αντίθετα, η εφαρμογή του μοντέλου εκτίμησης της OMX στα δείγματα λάχανου M, S, B δεν ήταν ικανοποιητική σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από τους αισθητήρες VideometerLab και FTIR όπως προκύπτει και από τις τιμές R^2 και RMSE. Συνεπώς, για την αξιολόγηση της αλλοίωσης προτιμότερη εμφανίζεται η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης, MSI.

Βιβλιογραφία:

Alegbeleye, O., & Sant'Ana, A. S. (2022). Survival and growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vegetable salads. *Food Control*, 138, 109023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109023>

Al-Jowder, O., Defernez, M., Kemsley, E.K., Wilson, R.H., (1999). Mid-infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of meat products. *J. Agric.Food Chem.* 47, 3210– 3218.

Altunatmaz, S. S., Issa, G., & Aydin, A. (2012). Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1436–1443. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822012000400027>

Aminu, F., & Ali. (2017). Worldwide Knowledge Sharing Platform | www. International Journal of Advanced Academic Research | Sciences, 3(2), 2488–9849. <https://www.ijaar.org/articles/Volume3-Number2/Sciences-Technology-Engineering/ijaar-ste-v3n2-feb17-p1.pdf>

Angeliki Doukaki, Papadopoulou, O. S., Chrysavgi Tzavara, Aikaterini-Malevi Mantzara, Konstantina Michopoulou, Chrysoula Tassou, Panagiotis Skandamis, George-John Nychas, & Nikos Chorianopoulos. (2024b). Monitoring the Bioprotective Potential of *Lactiplantibacillus pentosus* Culture on Pathogen Survival in and the Shelf-Life of Fresh Ready-to-Eat Salads Stored under Modified Atmosphere Packaging. *Pathogens*, 13(7), 557–557. <https://doi.org/10.3390/pathogens13070557>

Argyri, A. A., Nisiotou, A. A., Mallouchos, A., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2014). Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat shocked green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.003>

Arrais, A., Diana, E., Gervasio, G., Gobetto, R., Marabello, D., & Pier Luigi Stanghellini. (2004). Synthesis, Structural and Spectroscopic Characterization of Four [(η⁶-PAH)Cr(CO)₃] Complexes (PAH = Pyrene, Perylene, Chrysene, 1,2-Benzanthracene). *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2004(7), 1505–1513. <https://doi.org/10.1002/ejic.200300369>

Arrais, A., Diana, E., Marabello, D., Gervasio, G., & Stanghellini, P. L. (2011). Syntheses of chromium tricarbonyl organometals of 1-methyl-naphthalene and different polycyclic aromatic hydrocarbons, characterisation of the (C₁₁H₁₀)Cr(CO)₃ isomers and the crystal structure of the [(η⁶-5,6,7,8,9,10-C₁₁H₁₀)Cr(CO)₃] complex. *Journal of Organometallic Chemistry*, 696(11), 2299–2305. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.12.005>

Balarabe Sarki Sagagi, Abdu Muhammad Bello, & Haruna Abubakar Danyaya. (2022b). Assessment of accumulation of heavy metals in soil, irrigation water, and vegetative parts of lettuce and cabbage grown along Wawan Rafi, Jigawa State, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(10). <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10360-w>

Baldwin, E. A., Burns, J. K., Kazokas, W., Brecht, J. K., Hagenmaier, R. D., Bender, R. J., & Pesis, E. (1999). Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. *Postharvest*

Biology and Technology, 17(3), 215–226. [https://doi.org/10.1016/s0925-5214\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/s0925-5214(99)00053-8)

Brocklehurst, T. F., Zaman-Wong, C. M., & Lund, B. M. (1987). A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 409–415

Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Garcí'a-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2008). Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Control*, 19(5), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.014>

Cartea, M. E., & Velasco, P. (2007). Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 213–229. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9072-2>

Chitarra, M.I.F. and Chitarra, A.B. (2005) Pós-Colheita de Frutas e Hortalias Fisiologia e Manuseio. 2nd Edition, UFLA, Lavras, 785. - References - Scientific Research Publishing. (n.d). [Www.scirp.org](http://www.scirp.org). <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1130505>

Di Egidio, V., Sinelli, N., Limbo, S., Torri, L., Franzetti, L., Casiraghi, E., (2009). Evaluation of shelf-life of fresh-cut pineapple using FT-NIR and FT-IR spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 54, 87–92.

Doulgeraki, Agapi I., et al. “Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Industrially Fermented Greek Table Olives.” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 50, no. 1, Jan. 2013, pp. 353–356, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.003>.

Ellis, D.I., Broadhurst, D., Kell, D.B., Jem, J., Goodacre, R., Rowland, J.J., 2002. Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2822–2828.

Esteve, M. (2020). Mechanisms Underlying Biological Effects of Cruciferous Glucosinolate-Derived Isothiocyanates/Indoles: A Focus on Metabolic Syndrome. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00111>

Fadlelmoula, A., Pinho, D., Carvalho, V. H., Catarino, S. O., & Minas, G. (2022). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines*, 13(2), 187. <https://doi.org/10.3390/mi13020187>

García-Gimeno, R. M., & Zurera-Cosano, G. (1997). Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01238-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01238-x)

Gorny, R.J. (2001), “A summary of CA and MA recommendations for selected fresh-cut fruits and vegetables”. In: *Optimal controlled atmospheres for horticultural perishables*. Postharvest Horticulture Series No 22A, Davis, USA, pp.104-152

Griffith, P.R. and De Haseth, J.A. (1986) Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Chem Anal Ser Monogr Anal Chem Appl*, 83. - References - Scientific Research Publishing.(2016).Scirp.org. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1784222>

Hamidabadi Sherahi, M., Fathi, M., Zhandari, F., Hashemi, S. M. B., & Rashidi, A. (2017). Structural characterization and physicochemical properties of *Descurainia sophia* seed gum. *Food Hydrocolloids*, 66, 82-89.

HIGDON, J., DELAGE, B., WILLIAMS, D., & DASHWOOD, R. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 55(3), 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.009>

Hoagland, L., Ximenes, E., Ku, S., & Ladisch, M. (2018). Foodborne pathogens in horticultural production systems: Ecology and mitigation. *Scientia Horticulturae*, 236, 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.040>

Hu, W., Tanaka, S., Uchino, T., Kawasaki, T., Daisuke Hamanaka, & Hori, Y. (2003). Effect of Initial Low Oxygen Concentration on Respiration and Quality of Fresh-cut Cabbages. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 48(1/2), 195–207. <https://doi.org/10.5109/4543>

Kaji, H., Ueno, M., & Y Osajima. (1993). Storage of Shredded Cabbage under a Dynamically Controlled Atmosphere of High O₂ and High CO₂. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57(7), 1049–1052. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1049>

Kamarinou, Christina S., et al. “Mapping the Key Technological and Functional Characteristics of Indigenous Lactic Acid Bacteria Isolated from Greek Traditional Dairy Products.” *Microorganisms*, vol. 10, no. 2, 23 Jan. 2022, p. 246, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020246>.

Kodogiannis, V. S., Pachidis, T., & Kontogianni, E. (2014). An intelligent based decision support system for the detection of meat spoilage. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 34, 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.engappai.2014.05.001>

Kowalska, B., & Szczech, M. (2022b). Differences in microbiological quality of leafy green vegetables. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 29(2), 238–245. <https://doi.org/10.26444/aaem/149963>

Lasch, P., Boese, M., Pacifico, A., & Diem, M. (2002). FT-IR spectroscopic investigations of single cells on the subcellular level. *Vibrational Spectroscopy*, 28(1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0924-2031\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/s0924-2031(01)00153-9)

Lin, M., Rasco, B.A., Cavinato, A.G., Al-Holy, M., (2009). Infrared (IR) Spectroscopy—Near Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy, in: Sun, D.W. (Ed.), *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Academic Press, pp.119-143.

Luka, B. S., Mactony, M. J., Vihikwagh, Q. M., Toluwaleyi Hannah Oluwasegun, Riyang Zakka, Joshua, B., & Muhammed, I. B. (2024). Microwave-based and convective drying of cabbage (*Brassica oleracea* L. var *capitata* L.): Computational intelligence modeling, thermophysical properties, quality and mid-infrared spectrometry. *Measurement Food*, 15, 100187–100187. <https://doi.org/10.1016/j.meafoo.2024.100187>

Moleyar, V. and Narasimham, P. (1994), “Modified atmosphere packaging of vegetables: an appraisal”. *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 31, pp. 267–278

- Moss, M. O. (2008). Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1239–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03705.x>
- Mueller, M., & Tainter, C. R. (2023, July 13). *Escherichia Coli Infection*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Nakajima, S., Genkawa, T., Miyamoto, A., & Ikehata, A. (2021). Useful tissues in cabbage head for freshness evaluation with visible and near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 339, 128058. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128058>
- O'Connor-Shaw, R. E., Roberts, R., Ford, A. L., & Nottingham, S. M. (1994). Shelf life of minimally processed honeydew melon, kiwifruit, papaya, pineapple and cantaloupe. *Journal of Food Science*, 59, 1202–1206, 1215
- 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.
- Pavli, F., Kovaïou, I., Apostolakopoulou, G., Kapetanakou, A., Skandamis, P., Nychas, G.-J., Tassou, C., & Chorïanopoulos, N. (2017). Alginate-Based Edible Films Delivering Probiotic Bacteria to Sliced Ham Pretreated with High Pressure Processing. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1867. <https://doi.org/10.3390/ijms18091867>
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., & Ercolini, D. (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*, 109, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.014>
- Rogalla, D., & Bomar, P. A. (2023, April 3). *Listeria Monocytogenes*. Nih.gov; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534838/>
- Salunkhe, D. K., Kadam, S. S. (1998). *Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage, and processing*, (1st ed.), 299-372. CRC Press
- Sapers, G. M., Miller, R. L., Pilizota, V., & Mattrazzo, A. M. (2001). Antimicrobial treatments for minimally processed cantaloupe melon. *Journal of Food Science*, 66, 345–349
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K. P., & Rai, M. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae*, 108(3), 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.017>
- Sofia P.M. Silva, Teixeira, J. A., & Célia C.G. Silva. (2023). Recent advances in the use of edible films and coatings with probiotic and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, 56, 103196–103196. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103196>
- Stea, T. H., Nordheim, O., Bere, E., Stornes, P., & Eikemo, T. A. (2020). Fruit and vegetable consumption in Europe according to gender, educational attainment and regional affiliation—A cross-sectional study in 21 European countries. *PLOS ONE*, 15(5), e0232521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232521>
- Tirioni, E., Centorotola, G., Pomilio, F., Torresi, M., Bernardi, C., & Stella, S. (2024). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) delicatessen foods: Prevalence, genomic

characterization of isolates and growth potential. *International Journal of Food Microbiology*, 410, 110515–110515. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110515>

Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Panagou, E., & Nychas, G.-J. (2016b). Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*, 161, 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.019>

Umboh, S. D., Salaki, C. L., Tulung, M., Mandey, L. C., & Maramis, R. T. (2016). The isolation and identification of fungi from the soil in gardens of cabbage were contaminated with pesticide residues in subdistrict Modinding. *International Journal of Research in Engineering and Science*, 4(7), 25-32.

Value-added food products processing for Micro-income generation of rural communities in Myanmar.(2024). Fao.org. <https://www.fao.org/4/ad379e/AD379E00.htm#TOC>

Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1561–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>

Wachtel, M. R., Whitehand, L. C., & Mandrell, R. E. (2002). Prevalence of *Escherichia coli* Associated with a Cabbage Crop Inadvertently Irrigated with Partially Treated Sewage Wastewater. 65(3), 471–475. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.3.471>

Wold, S., Sjöström, M. and Eriksson, L. (2001) ‘PLS-regression: A basic tool of Chemometrics’, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), pp. 109–130. doi:10.1016/s0169-7439(01)00155-1.

Γεώργιος Ι. Ζερβάκης, 2011. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Εισαγωγή στη Μυκητολογία. Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, Θ.Π. ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ – Μ.Α. ΚΟΥΠΠΑΡΗ, ΑΘΗΝΑ 2010

Ταραντίλης, Π.Α. and Παππάς, Χ.Σ. (2015). Ενόργανη Χημική Ανάλυση Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. ΑΘΗΝΑ: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, pp.65–86.

Χ. Προεστός, Π. Μαρκάκη (2017), ΤΡΟΦΙΜΑ: ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ, ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ & ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ Da Vinci