

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΜΕ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ Σ. ΟΛΓΑ



Διδακτορική διατριβή

Οκτώβριος 2013

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΜΕ
ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

**ASSESSMENT OF MEAT SPOILAGE WITH NOVEL
TECHNIQUES**

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ Σ. ΟΛΓΑ
Διδακτορική διατριβή

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων

Γεώργιος -Ιωάννης Νυχάς - Καθηγητής

Μέλη

Ευστάθιος Πανάγου - Επίκουρος Καθηγητής

Παναγιώτης Σκανδάμης - Επίκουρος Καθηγητής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος -Ιωάννης Νυχάς - Καθηγητής

Ευστάθιος Πανάγου - Επίκουρος Καθηγητής

Παναγιώτης Σκανδάμης - Επίκουρος Καθηγητής

Μόσχος Πολυσίου - Καθηγητής

Κωνσταντίνος Γιαλούρης - Αναπληρωτής Καθηγητής

Κωνσταντίνος Κουτσουμανής - Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιωάννης Κουρκουτάς - Επίκουρος Καθηγητής

Οκτώβριος 2013

«Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής
από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως »
(Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)

Ever tried. Ever failed.

No matter.

Try again. Fail again.

Fail better.

S. Beckett

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το κρέας εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε νερό και της αφθονίας σε θρεπτικά συστατικά θεωρείται ένα από τα πιο ευαλλοιώτα τρόφιμα. Η αλλοίωση του κρέατος είναι ένα οικολογικό φαινόμενο το οποίο αποδίδεται σχεδόν ολοκληρωτικά στη μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία ποικίλει και εξαρτάται από τα είδη των μικροοργανισμών που απαντώνται σε αυτό, τα χαρακτηριστικά του κρέατος, τον τρόπο συσκευασίας και το περιβάλλον στο οποίο αποθηκεύεται. Η μικροβιακή αλλοίωση προκαλεί το σχηματισμό γλοιώδους υφής και δυσάρεστων οσμών, κάνοντας το ανεπιθύμητο στον καταναλωτή. Είναι λοιπόν σημαντικό, να βρεθούν γρήγορα και αξιόπιστα συστήματα ώστε να μπορεί να παρακολουθείται η ποιότητα και φρεσκάδα του κρέατος κατά την παραγωγή και διάθεση του.

Ο γενικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της αλλοίωσης του κρέατος με διαφορετικές ταχείες αναλυτικές τεχνικές. Η μικροβιολογική εξέλιξη της χλωρίδας του κρέατος παρακολουθούνταν παράλληλα με το μεταβολικό της προφίλ. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα, που αφορούσε αλλοίωση χοιρινού κιμά σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15 και 20°C) και δύο συσκευασίες (αέρας και MAP), εφαρμόστηκαν ποικίλες ταχείες αναλυτικές τεχνικές με σκοπό να διερευνηθούν οι βιοχημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης του κρέατος. Στο δεύτερο πείραμα έγινε εμβολιασμός στείρου ιστού κρέατος με επιλεγμένους μικροοργανισμούς σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (4 και 10°C) και δύο συσκευασίες (αέρας και MAP), με σκοπό τη μελέτη των μεταβολικών προϊόντων που παράγονται κατά τη συντήρηση του κρέατος. Οι αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν στη μελέτη αυτή, ήταν φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), ηλεκτρονική μύτη (Libra Nose), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεής φάσης (HP/SPME, GC/MS) και διάφορες μοριακές τεχνικές (Rep-PCR, Sau-PCR και PFGE).

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), η οποία είναι μια απλή, εύχρηστη και ταχεία μέθοδος που δε καταστρέφει το δείγμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της ποιότητας του κρέατος. Για αυτό το λόγο, δείγματα χοιρινού κιμά αναλύθηκαν και με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τα φάσματα

δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Διακριτικής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) ώστε να γίνει εφικτή η πρόβλεψη της ποιοτικής κλάσης του κρέατος το οποίο ήταν ήδη χαρακτηρισμένο ως φρέσκο, σχετικά-φρέσκο ή αλλοιωμένο από την οργανοληπτική ανάλυση, ενώ για την εκτίμηση του πληθυσμού των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Γραμμικής Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-R). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η PLS-DA έδειξε σωστή κατηγοριοποίηση σε ποσοστό 87,7% των δειγμάτων χοιρινού κιμά που είχαν συντηρηθεί αερόβια και 79,3% των δειγμάτων που είχαν συντηρηθεί σε MAP σε σχέση με τον οργανοληπτικό τους προφίλ. Αντίστοιχα, από τις τιμές που προέκυψαν από τους δείκτες επίδοσης των μοντέλων που αναπτύχθηκαν, φαίνεται πως υπήρξε καλός συσχετισμός μεταξύ των δεδομένων του FTIR και των μικροβιολογικών δεδομένων. Ο δείκτης προκατάληψης (B_f) για όλες τις μικροβιακές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στη μονάδα, αποδεικνύοντας ότι δεν υπήρξε κάποια συστηματική απόκλιση (υπερ ή υπο-εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού) από τα μοντέλα. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των εκτιμήσεων και των παρατηρήσεων ήταν 7,5% και 7,9% και 6,0% και 5,9%, για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και τις *Pseudomonas* spp., στην αερόβια συντήρηση και στην συντήρηση σε MAP αντίστοιχα.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική μύτη ως μια γρήγορη τεχνική για την εκτίμηση της αλλοίωσης του χοιρινού κρέατος. Τα πτητικά συστατικά χοιρινού κιμά αναλύθηκαν στην ηλεκτρονική μύτη και τα δεδομένα που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και στη συνέχεια αναλύθηκαν με Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων (Discriminant Function Analysis, DFA) και Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης (Support Vector Machines, SVM). Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως υπήρξε σωστή κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας με ανάλυση DFA. Η ακρίβεια πρόβλεψης για τα δείγματα που είχαν συσκευαστεί σε αέρα και σε MAP ήταν 86% και 82% αντίστοιχα. Επίσης, το μοντέλο που αναπτύχθηκε με SVM ήταν σε θέση να εκτιμήσει το μικροβιακό φορτίο της κάθε μικροβιακής ομάδας ικανοποιητικά.

Κατόπιν, χρησιμοποιήθηκαν 2 ακόμα ταχείες αναλυτικές τεχνικές, η HPLC για τον προσδιορισμό των οργανικών οξέων και η GC/MS για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων που ανευρίσκονται στον χοιρινό κιμά κατά την συντήρησή του. Λήφθηκαν ενδιαφέρουσες

πληροφορίες για την εξέλιξη της αλλοίωσης υπό διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης και εντοπίστηκαν αρκετές ενώσεις οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης. Επιπλέον, τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν με PLS-R για την GC/MS και με SVM για την HPLC έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στις εκτιμήσεις των μικροβιακών ομάδων (π.χ. η τιμή του συντελεστή συσχέτισης για την OMX στην αερόβια συσκευασία ήταν 0,792 και 0,866 για την HPLC και την GC/MS αντίστοιχα). Επίσης, η ανάλυση με DFA είχε ακρίβεια πρόβλεψης σε ποσοστό 97,60% για την HPLC και 76,06% για την GC/MS επί του συνόλου των δειγμάτων που είχαν συντηρηθεί σε MAP αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η GC/MS χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει τις πτητικές ουσίες που υπάρχουν κατά την αλλοίωση στείρου μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου ιστού κρέατος με επιλεγμένους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με PLS-DA και ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα. Από τα αποτελέσματα, φάνηκαν να υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των πτητικών ουσιών και των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών.

Τέλος, εξετάστηκε η ποικιλομορφία, καθώς και η εξέλιξη του βακτηρίου *B. thermosphacta* σε επίπεδο στελέχους, το οποίο απομονώθηκε από χοιρινό κιμά υπό διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας (αέρας και τροποποιημένη ατμόσφαιρα) και θερμοκρασίας (0, 5, 10 και 15°C) από το επιλεκτικό υπόστρωμα για τον *Brochothrix* spp. Επιλέχθηκαν 3 μοριακές τεχνικές και προέκυψαν διαφορετικά αποτελέσματα τα οποία αποδίδονται στο διαφορετικό βαθμό διακριτικής ικανότητας της κάθε μοριακής τεχνικής. Η διαφοροποίηση των στελεχών βασίστηκε κυρίως στη θερμοκρασία και τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα στελέχη ανήκουν στο είδος *Brochothrix thermosphacta*.

ABSTRACT

Quality is generally a subjective and sometimes elusive term. Freshness and safety of muscle food products are generally considered the most important contributors to quality. The spoilage of meat may arise from several intrinsic and extrinsic factors including physical damage or chemical changes. However, it is generally accepted that detectable organoleptic spoilage is a result of decomposition and the formation of metabolites caused by the growth of microorganisms. Muscle foods are described as spoiled if organoleptic changes make them unacceptable to the consumer. It is therefore crucial to have valid methods to monitor freshness and quality. One challenge facing the meat industry is to obtain reliable information on meat quality throughout the production process, which would ultimately provide a guaranteed quality of meat products for consumers. The ideal method for the on-line microbiological analysis of meat would be rapid, non-invasive, reagentless, and relatively inexpensive and these requirements can be met via the application of a spectroscopic approach, in combination with any appropriate data analysis strategy based on statistics or machine learning.

In the current thesis, the microbial association of meat was monitored in parallel with the chemical changes, pH measurements and sensory analysis. For this purpose, two different experiments were designed and several chemical analytical techniques were applied to quantify biochemical changes in an attempt to monitor meat spoilage. In the first experiment, fresh minced pork was stored aerobically and under modified atmospheres packaging (MAP) at five different temperatures (0, 5, 10, 15 and 20°C) and microbiological analysis in terms of total viable counts, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae* and yeast and moulds was performed in parallel with Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, electronic nose (Libra Nose), high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography/mass spectroscopy (HS/SPME GC/MS), and several molecular techniques (Rep-PCR, Sau-PCR and PFGE). In the second experiment sterile tissue of pork meat fillet was inoculated with selected spoilage microorganisms at two different temperatures (4 and 10 °C) and two packaging conditions (air and MAP), in order to study the metabolic profile produced during storage of meat with GC/MS.

The first component of the study was designed to evaluate the potential of FTIR spectroscopy as a rapid, reagent-less and non-destructive analytical technique in order to quantify biochemical changes occurring in fresh minced pork meat in the attempt to monitor spoilage. For this reason, partial least squares (PLS) models were constructed to correlate spectral data from FTIR with minced pork meat spoilage during storage (aerobic and MAP) of meat samples at different storage temperatures (0, 5, 10, and 15°C). Spectral data were collected from the surface of meat samples in parallel with microbiological analysis to enumerate the population of total viable counts, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae*. Qualitative interpretation of spectral data was based on sensory evaluation, using a three point hedonic scale, discriminating meat samples in three quality classes, namely fresh, semi-fresh and spoiled. The purpose of the developed models was to classify minced pork samples in the respective quality class, and also to correlate the population dynamics of the microbial association with FTIR spectra. The obtained results demonstrated good performance in classifying meat samples in one of the three pre-defined sensory classes. The overall correct classification rate for the three sensory classes was 94.0% and 88.1% during model calibration and validation, respectively for minced pork stored at aerobic conditions. Furthermore, PLS regression models were also employed to provide quantitative estimations of microbial counts during meat storage. The performance was based on graphical plots and statistical indices (bias factor, accuracy factor, standard error of calibration, standard error of prediction, and correlation coefficient). The values of the bias factor were close to unity for all microbial groups indicating no systematic bias of the models. Moreover, the calculated values of the accuracy factor showed that the average deviation between predictions and observations was 7.5% and 7.9%, 6.0% and 5.9% for total viable counts and *Pseudomonas* spp., stored at air and MAP respectively. Finally, correlations above 0.80 between observed and estimated counts were observed for both training and test data sets.

The performance of a portable quartz microbalance based electronic nose has been evaluated in monitoring aerobically and under MAP packaged minced pork spoilage at different storage temperatures (0, 5, 10, 15, and 20°C). Electronic nose data were collected from the headspace of meat samples in parallel with data from microbiological analysis for the enumeration of the population dynamics of total viable counts, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae*. Qualitative interpretation of electronic nose data was

based on sensory evaluation discriminating samples in three quality classes (fresh, semi-fresh, and spoiled). First, the data collected from e-nose were subjected on Principal Component Analysis (PCA) in order to minimize the dimensionality of the data. The subjected data were used as input on Discriminant Function Analysis (DFA) and Support Vector Machine (SVM). DFA was used in order to classify pork samples in the respective quality class, while Support Vector Machine (SVM) regression models using radial basis kernel function were developed in order to correlate the population dynamics of the microbial association with electronic nose sensor responses. The obtained results demonstrated good performance in discriminating meat samples in one of the three pre-defined quality classes. Overall classification accuracies of prediction was 86% and 82% were obtained for samples stored under aerobic and MAP conditions respectively. Additionally, SVM regression model development, can be efficiently used for the estimation of the population of various microbial groups, which was demonstrated by the correlation for each group of microorganism.

Two further studies were conducted using rapid analytical methods such as HPLC analysis of organic acids and GC/MS to monitor the changes in organic acids and volatile compounds respectively, which are present in the meat substrate during storage. Minced pork samples stored under aerobic and MAP at 0, 5, 10, 15 and 20°C were monitored with both analytical methods, and several compounds found to be possible chemical indicators. Moreover, the applied PLS-R models gave estimations of the different microbial populations (e.g. TVC: 0.792 for the HPLC and 0.866 for the GC/MS models) and the FDA facilitated the discrimination of the samples regarding their freshness (correct classification of 97.60% for HPLC and 76.06% for GC/MS). Additionally, the GC/MS was used to identify the volatile compounds present in the sterile meat. Interesting information about the evolution of spoilage under different group of inoculated microorganism and different temperature and packaging conditions was demonstrated. The results were analyzed by PLS-DA and one-way-anova. The results provided correlations between volatiles and specific spoilage microorganisms.

Finally, a total of 306 colonies were isolated from the selective medium for *Brochothrix* spp., during the spoilage of minced pork stored at 0, 5, 10 and 15 °C and packed aerobically and under modified atmosphere packaging conditions (MAP). *Brochothrix* biodiversity was assessed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and representative strains were further analyzed by Rep-PCR using primer (GTG)₅ and Sau-PCR with primers SAG1 and SAG2. Although, different

results were obtained from the different methods, a significant diversity among isolates recovered from aerobic conditions was observed. On the contrary, isolates from MAP showed a lower degree of heterogeneity. The storage conditions affected the *Brochothrix* diversity, the strains isolated in the initial stage being different from the ones present at the final stage of storage at chill temperatures. A representative number of isolates, based on the results of the clustering by molecular methods, were subjected to 16S rRNA gene sequencing, revealing that all belonged to *Brochothrix thermosphacta*.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Ανθρώπου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στους επιβλέποντες μου, καθηγητή Γ.-Ι. Νυχά και επίκουρο καθηγητή Ε. Πανάγου για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερα τους ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά τον επίκουρο καθηγητή Π. Σκανδάμη, ο οποίος μοιράστηκε πολλές φορές τους προβληματισμούς μου δίνοντας μου πολύτιμες συμβουλές.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής τον καθηγητή Μ. Πολυσίου, τον αναπληρωτή καθηγητή Κ. Γιαλούρη, τον αναπληρωτή καθηγητή Κ. Κουτσομανή, και τον επίκουρο καθηγητή Ι. Κουρκουτά για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή και το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη του παρόντος κειμένου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Prof. L. Cocolin για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο εργαστήριο του, στο Πανεπιστήμιο του Τορίνο. Η συμβολή του στη διεξαγωγή μέρους των πειραμάτων της παρούσας διατριβής ήταν καθοριστική.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους, συνεργάτες και συμφοιτητές μου όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον λέκτορα Α. Μαλλούχο, την μεταδιδάκτορα Α. Δουλγεράκη και την μεταδιδάκτορα Α. Αργύρη για τις πολύτιμες συμβουλές τους, που με βοήθησαν καθοριστικά σε πολλά στάδια της εργαστηριακής μου πορείας. Επίσης ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Α. Γκρούντα, τον φοιτητή Α. Δροσάτο και τον Β. Ηλιόπουλο για την βοήθεια τους στην εκπόνηση εργαστηριακών πειραμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που όλα αυτά τα χρόνια με εμπύχωνε και με προέτρεπε να ολοκληρώσω γρήγορα την παρούσα διατριβή και τους φίλους μου για την υπομονή, τη συμπαράσταση και την κατανόηση τους όταν έπρεπε να λείπω από κοντά τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	i
ABSTRACT	iv
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	viii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ix
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	xv
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	xxvii
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ	xxxiii
Κεφάλαιο 1 Γενική Εισαγωγή	1
Εισαγωγή	2
1.1. Σύσταση του κρέατος	3
1.2. Παράγοντες που καθορίζουν τη μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων	5
1.2.1. Μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος	5
1.2.1.1. Βακτήρια που σχετίζονται με την αλλοίωση του κρέατος	6
1.2.2. Πηγές μικροβιακής επιμόλυνσης	10
1.2.3. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση και τη διάρκεια ζωής του κρέατος	12
1.2.3.1. Θερμοκρασία	12
1.2.3.2. Συσκευασία	13
1.3. Χημικές αλλαγές στο κρέας	16
1.3.1. Χημικές αλλαγές σε αερόβιες συνθήκες	17
1.3.2. Χημικές αλλαγές σε συνθήκες περιορισμού του οξυγόνου	20
1.4. Ανίχνευση μεταβολικών προϊόντων αλλοίωσης	21
1.5. Στόχοι της μελέτης	31
Κεφάλαιο 2 Υλικά και Μέθοδοι	35
2.1. Μικροβιολογικές Αναλύσεις	36
2.1.1. Προετοιμασία δείγματος	36
i) Μελέτη της αλλοίωσης χοιρινού κιμά συσκευασμένου σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15, και 20°C	36

ii) Μελέτη της εξέλιξης της μικροχλωρίδας και των μεταβολικών προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης στείρου ιστού χοιρινού κρέατος εμβολιασμένου με επιλεγμένα στελέχη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών συσκευασμένου σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4 και στους 10°C	37
2.1.1.2. Προετοιμασία στείρου ιστού κρέατος	37
2.1.1.3. Παρασκευή εμβολίου και διαδικασία εμβολιασμού	39
2.1.2. Δειγματοληψία	40
2.2. Φυσικοχημικές Αναλύσεις	41
2.2.1. Προσδιορισμός pH	41
2.2.2. Προσδιορισμός οργανικών οξέων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	41
2.2.2.1. Προετοιμασία δείγματος	41
2.2.2.2. Ανάλυση δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	42
2.2.2.3. Ανάλυση χρωματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα	43
2.2.3. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR)	44
2.2.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων	44
2.2.3.2. Συλλογή φασματικών δεδομένων με το φασματοφωτόμετρο FTIR/ATR	45
2.2.3.3. Ανάλυση φασματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα	45
2.2.4. Ηλεκτρονική Μύτη (Quartz microbalance-based electronic nose)	47
2.2.4.1. Προετοιμασία δείγματος	47
2.2.4.2. Ανάλυση δειγμάτων με την Ηλεκτρονική Μύτη	47
2.2.4.3. Ανάλυση του πτητικού προφίλ με μαθηματικά μοντέλα	50
2.2.5. Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης HS/SMPE GC/MS	52
2.2.5.1. Προετοιμασία δείγματος	52
2.2.5.2. Συνθήκες ανάλυσης με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)	53
2.2.5.3. Ανάλυση του πτητικού προφίλ με μαθηματικά μοντέλα	54
2.4. Οργανοληπτική Αξιολόγηση	54

2.5. Ανάλυση δεδομένων	55
2.5.1. Κινητική αύξησης των μικροοργανισμών	55
2.5.2. Δείκτες επίδοσης μοντέλων	56
2.5.3. Στατιστική ανάλυση	57
2.5.3.1 Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων (Discriminant Factor Analysis, DFA)	57
2.5.3.2. Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)	59
2.5.3.3. Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)	60
2.5.3.4. Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης (Support Vector Machines, SVM)	60
2.6. Μοριακές αναλύσεις	63
2.6.1 Απομόνωση των στελεχών από το επιλεκτικό υπόστρωμα για <i>Brochothrix</i> spp.	63
2.6.2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE)	64
2.6.3. Απομόνωση DNA	65
2.6.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (Rep-PCR)	65
2.6.5. Sau-PCR	66
Κεφάλαιο 3 Εκτίμηση της αλλοίωσης χοιρινού κιμά με μικροβιολογικές και φυσικοχημικές μεθόδους	68
3.1. Εισαγωγή	69
3.2. Υλικά και μέθοδοι	73
3.2.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας	73
3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	74
3.3.1. Εκτίμηση της αλλοίωσης χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C	74
3.3.1.1. Εξέλιξη της μικροβιακής χλωρίδας	74
3.3.1.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση του χοιρινού κιμά	75
3.3.1.3. Ανάλυση του pH	79
3.3.2. Ανάλυση με το FTIR/ATR	84

3.3.2.1. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες	86
3.3.2.1.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	87
3.3.2.1.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα	88
3.3.2.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας	94
3.3.2.2.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	95
3.3.2.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα	97
3.3.2.3. Συζήτηση	101
3.3.3. Ανάλυση χοιρινού κιμά με ηλεκτρονική μύτη	106
3.3.3.1. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες	106
3.3.3.1.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	107
3.3.3.1.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τις αποκρίσεις των αισθητήρων	114
3.3.3.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας	117
3.3.3.2.1. Αξιολόγηση της εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	118
3.3.3.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τις αποκρίσεις των αισθητήρων	125
3.3.3.3. Συζήτηση	127
3.3.4. Ανάλυση χοιρινού κιμά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	131
3.3.4.1 Ανάλυση οργανικών οξέων	131
3.3.4.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες	138
3.3.4.2.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	138
3.3.4.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με το εμβαδόν των κορυφών των οργανικών οξέων	143
3.3.4.3. Ανάλυση χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας	145
3.3.4.3.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	146
3.3.4.3.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με το εμβαδόν των κορυφών των οργανικών οξέων	151
3.3.4.4. Συζήτηση	153
3.3.5. Ανάλυση χοιρινού κιμά με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης HS/SPME	157

3.3.5.1. Ανάλυση πτητικών ενώσεων	157
3.3.5.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες	172
3.3.5.2.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	172
3.3.5.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα	174
3.3.5.3. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες	178
3.3.5.3.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	178
3.3.5.3.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα	180
3.3.5.4. Συζήτηση	184
Κεφάλαιο 4 Γονοτυπικός χαρακτηρισμός του μικροοργανισμού <i>Brochothrix thermosphacta</i> κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά	188
4.1. Εισαγωγή	189
4.2. Υλικά και μέθοδοι	191
4.3. Αποτελέσματα	191
4.4. Συζήτηση	202
Κεφάλαιο 5 Εκτίμηση της αλλοίωσης στείρου χοιρινού φιλέτου εμβολιασμένου με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς με μικροβιολογικές και φυσικοχημικές μεθόδους	205
5.1. Εισαγωγή	206
5.2. Υλικά και Μέθοδοι	209
5.2.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας	209
5.3. Αποτελέσματα	210
5.3.1 Εκτίμηση της αλλοίωσης στείρου χοιρινού φιλέτου εμβολιασμένου με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 4 και 10°C	210
5.3.1.1. Εξέλιξη της μικροβιακής χλωρίδας	210
5.3.1.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση του στείρου μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου χοιρινού φιλέτου	213
5.3.2. Ανάλυση στείρου χοιρινού φιλέτου με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης HS/SPME	223
5.3.2.1. Ανάλυση πτητικών ενώσεων	223
5.3.2.2. Αξιολόγηση των σημαντικότερων πτητικών ενώσεων	268

5.3.2.2.1. Αερόβια συντήρηση στους 4°C	268
5.3.2.2.2. Αερόβια συντήρηση στους 10°C	271
5.3.2.2.3. Συντήρηση σε MAP στους 4°C	274
5.3.2.2.3. Συντήρηση σε MAP στους 10°C	277
5.3.2.3. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας	278
5.4. Συζήτηση	280
Κεφάλαιο 6 Γενικά συμπεράσματα	284
6.1 Γενικά συμπεράσματα	285
6.2. Μελλοντική έρευνα	288
Κεφάλαιο 7 Βιβλιογραφία	290
Παράρτημα I	
Παράρτημα II	
Παράρτημα III	

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 2.1: Φασματοφωτόμετρο Nicolet	45
Εικόνα 2.2: Η φορητή ηλεκτρονική μύτη (Libra Nose) μαζί με τον Η/Υ σε λειτουργία κατά τη διάρκεια μιας μέτρησης χρονικού διαστήματος 5 λεπτών σε δείγμα χοιρινού κιμά	49
Εικόνα 2.3: Δύο χαρακτηριστικές καμπύλες απόκρισης αισθητήρων κατά την ανάλυση της υπερκείμενης φάσης δείγματος χοιρινού κιμά κατά τη διάρκεια μιας μέτρησης χρονικού διαστήματος 5 λεπτών	51
Εικόνα 3.3.1: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε αερόβιες συνθήκες ♦: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ■: <i>Pseudomonas</i> spp, ▲: <i>Brochothrix thermosphacta</i> , x: Γαλακτικά βακτήρια, ☆: <i>Enterobacteriaceae</i> , * : Ζύμες	80
Εικόνα 3.3.2: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. ♦: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ■: <i>Pseudomonas</i> spp, ▲: <i>Brochothrix thermosphacta</i> , x: Γαλακτικά βακτήρια, ☆: <i>Enterobacteriaceae</i> , * : Ζύμες	81
Εικόνα 3.3.3: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε αερόβιες συνθήκες. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης έπειτα από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ♦: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ■: <i>Pseudomonas</i> spp, ▲: <i>Brochothrix thermosphacta</i> , x: Γαλακτικά βακτήρια, ☆: <i>Enterobacteriaceae</i> , * : Ζύμες	82
Εικόνα 3.3.4: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης έπειτα από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ♦: Ολική Μεσόφιλη	83

Χλωρίδα, ■: *Pseudomonas* spp, ▲: *Brochothrix thermosphacta*, x: Γαλακτικά βακτήρια, ☆: *Enterobacteriaceae*, ✱: Ζύμες

Εικόνα 3.3.5: Τυπικό φασματογράφημα στους κυματαριθμούς 1800-900cm⁻¹ από ένα φρέσκο και ένα αλλοιωμένο δείγμα χοιρινού κιμά συντηρημένο για 85

α) 12 και 171 ώρες σε θερμοκρασία 0°C σε αερόβιες συνθήκες και β) 16 και 131 ώρες σε θερμοκρασία 10°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Εικόνα 3.3.6: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης στο εύρος 1800-900cm⁻¹ του φάσματος. Οι επιλεγμένες περιοχές συμβολίζονται με μαύρο (○) 87

Εικόνα 3.3.7: Βελτιστοποίηση του μοντέλου παλινδρόμησης (PLS-R) χρησιμοποιώντας λανθάνουσες μεταβλητές με εύρος 1 έως 20 κατά την εκπαίδευση και την επικύρωση των δεδομένων έπειτα από διασταυρούμενη επικύρωση με τη μέθοδο leave-one-out cross validation (LOOCV) 92

Εικόνα 3.3.8: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των *Pseudomonas* spp. (α) και των γαλακτικών βακτηρίων (β) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS-R (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) 93

Εικόνα 3.3.9: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης στο εύρος 1800-900cm⁻¹ του φάσματος. Οι επιλεγμένες περιοχές συμβολίζονται με μαύρο (○) 95

Εικόνα 3.3.10: Βελτιστοποίηση του μοντέλου παλινδρόμησης (PLS-R) χρησιμοποιώντας λανθάνουσες μεταβλητές με εύρος 1 έως 20 κατά την εκπαίδευση και την επικύρωση των δεδομένων έπειτα από διασταυρούμενη επικύρωση με τη μέθοδο leave-one-out cross validation (LOOCV) 99

Εικόνα 3.3.11: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών του *B. thermosphacta* (α) και των γαλακτικών βακτηρίων (β) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 100

Εικόνα 3.3.12: Πίνακας συσχέτισης του Pearson για τους 8 αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης 108

Εικόνα 3.3.13: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη 109

συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5, 10, 15 και 20°C) (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα)

Εικόνα 3.3.14: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των *Pseudomonas* spp. από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε αερόβιες συνθήκες 116

Εικόνα 3.3.15: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των γαλακτικών βακτηρίων από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε αερόβιες συνθήκες 117

Εικόνα 3.3.16: Πίνακας συσχέτισης του Pearson για τους 8 αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης 120

Εικόνα 3.3.17: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5, 10, 15 και 20°C) (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα) 120

Εικόνα 3.3.18: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του *Br. thermosphacta* από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας 126

Εικόνα 3.3.19: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της OMX από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας 127

Εικόνα 3.3.20: Μεταβολικό προφίλ οργανικών οξέων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες στους 10°C για ένα φρέσκο, ένα **σχετικά φρέσκο** και ένα **αλλοιωμένο** δείγμα 132

Εικόνα 3.3.21: Μεταβολικό προφίλ οργανικών οξέων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 0°C για ένα φρέσκο, ένα σχετικά φρέσκο και ένα αλλοιωμένο δείγμα	132
Εικόνα 3.3.22: Αλλαγές στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος κατά τη συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C	135
Εικόνα 3.3.23: Αλλαγές στη συγκέντρωση του μυρμηκικού οξέος κατά τη συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C	136
Εικόνα 3.3.24: Αλλαγές στη συγκέντρωση του οξικού οξέος κατά τη συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C	137
Εικόνα 3.3.25: Γραφική απεικόνιση της στατιστικής σημαντικότητας ($\alpha=0,05$) των κορυφών των οργανικών οξέων κατά την αερόβια συντήρηση χοιρινού κιμά. Τα πράσινα σημεία υποδηλώνουν μεταβλητές (οργανικά οξέα) που δεν είναι στατιστικά σημαντικές, ενώ αντίθετα τα κόκκινα σημεία χαρακτηρίζουν στατιστικά σημαντικές μεταβλητές	139
Εικόνα 3.3.26: Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ομαδοποίησης από τα δείγματα χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης ανά ποιοτική κατηγορία (φρέσκο , σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο)	140
Εικόνα 3.3.27: Διάγραμμα θερμικής απεικόνισης για τα δείγματα που συντηρήθηκαν αερόβια. Το πράσινο χρώμα σημαίνει χαμηλή συσχέτιση ενώ το κόκκινο χρώμα σημαίνει υψηλή συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού των χρωματογραφικών περιοχών και της αντίστοιχης κλάσης ποιότητας όπως προέκυψε από την οργανοληπτική αξιολόγηση (φρέσκο , σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο)	140
Εικόνα 3.3.28: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε κατηγορία της οργανοληπτικής αξιολόγησης	141
Εικόνα 3.3.29: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης δύο παραγόντων για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες	142

συνθήκες στις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά Φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα)

Εικόνα 3.3.30: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών των *Pseudomonas* spp. κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 144

Εικόνα 3.3.31: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 145

Εικόνα 3.3.32: Γραφική απεικόνιση της στατιστικής σημαντικότητας ($\alpha=0,05$) των κορυφών των οργανικών οξέων κατά την συντήρηση σε MAP χοιρινού κιμά. Τα πράσινα σημεία υποδηλώνουν μεταβλητές (οργανικά οξέα) που δεν είναι στατιστικά σημαντικές, ενώ αντίθετα τα κόκκινα σημεία χαρακτηρίζουν στατιστικά σημαντικές μεταβλητές 146

Εικόνα 3.3.33: Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ομαδοποίησης από τα δείγματα χοιρινού κιμά ανά ποιοτική κατηγορία (φρέσκο, σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο) κατά τη συντήρηση σε MAP 147

Εικόνα 3.3.34: Διάγραμμα θερμικής απεικόνισης για τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε MAP. Το πράσινο χρώμα σημαίνει χαμηλή συσχέτιση ενώ το κόκκινο χρώμα σημαίνει υψηλή συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού των χρωματογραφικών περιοχών και της αντίστοιχης κλάσης ποιότητας όπως προέκυψε από την οργανοληπτική αξιολόγηση (φρέσκο, σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο) 148

Εικόνα 3.3.35: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε κατηγορία της οργανοληπτικής αξιολόγησης 149

Εικόνα 3.3.36: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης δύο παραγόντων για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά Φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα) 150

- Εικόνα 3.3.37:** Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών του *B. thermosphacta* κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 152
- Εικόνα 3.3.38:** Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 152
- Εικόνα 3.3.39:** Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασία 10°C έπειτα από 67 ώρες συντήρησης 158
- Εικόνα 3.3.40:** Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασία 0°C έπειτα από 118 ώρες συντήρησης 158
- Εικόνα 3.3.41:** Μεταβολή του οξικού οξέος σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 162
- Εικόνα 3.3.42:** Μεταβολή της αιθανόλης σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 164
- Εικόνα 3.3.43:** Μεταβολή της εξανόλης σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 165
- Εικόνα 3.3.44:** Μεταβολή της πεντανάλης σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 166

- Εικόνα 3.3.45:** Μεταβολή της βουτανο-2,3-διόνης σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (◆), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 168
- Εικόνα 3.3.46:** Μεταβολή της επταν-2-όνης σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (◆), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 168
- Εικόνα 3.3.47:** Μεταβολή του ισοαμυλικού αιθυλεστέρα σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (◆), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 170
- Εικόνα 3.3.48:** Μεταβολή του βενζολίου σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (◆), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*) 171
- Εικόνα 3.3.49:** Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και θερμοκρασίες συντήρησης 0, 5, 10, 15 και 20°C (● - Φρέσκα, ▲ - Σχετικά Φρέσκα, ◆ - Αλλοιωμένα) 174
- Εικόνα 3.3.50:** Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 176
- Εικόνα 3.3.51:** Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών *Pseudomonas* spp. κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 176
- Εικόνα 3.3.52:** Συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των σημαντικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης σε σχέση με τις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες κατά την αλλοίωση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες 177
- Εικόνα 3.3.53:** Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη 180

συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας συνθήκες και θερμοκρασίες συντήρησης 0, 5, 10, 15 και 20°C (●- Φρέσκα, ▲ - Σχετικά Φρέσκα, ◆ - Αλλοιωμένα)

Εικόνα 3.3.54: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών του βακτηρίου *B. thermosphacta* κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 182

Εικόνα 3.3.55: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης) 182

Εικόνα 3.3.56: Συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των σημαντικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης σε σχέση με τις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες κατά την αλλοίωση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας 183

Εικόνα 4.1: Πρότυπα του γονιδιακού DNA από τα στελέχη του βακτηρίου *Brochothrix* spp., που έχουν απομονωθεί από χοιρινό κιμά συντηρημένο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* (σειρές 2-24 και 26-29) και δείκτης PFG (σειρές 1, 15 και 30) 195

Εικόνα 4.2: Προϊόντα της Rep-PCR από τα στελέχη του βακτηρίου *Brochothrix* spp., (σειρές 2-6, 8-19) που έχουν απομονωθεί από χοιρινό κιμά συντηρημένο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας. Σειρές 1 και 20: δείκτης με κλίμακα 100bp, σειρά 7: τυφλό δείγμα 196

Εικόνα 4.3: Προϊόντα της Sau-PCR από τα στελέχη του βακτηρίου *Brochothrix* spp., (σειρές 2-19) που έχουν απομονωθεί από χοιρινό κιμά 197

συντηρημένο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας.
Σειρές 1 και 20: δείκτης με κλίμακα 100bp

Εικόνα 4.4: Δενδρόγραμμα των προφίλ των *Brochothrix* spp., που λαμβάνονται μετά από Sau-PCR 198

Εικόνα 4.5: Ανάλυση διασποράς των προφίλ που λαμβάνονται από τις απομονώσεις του *Brochothrix* spp., που ανακτήθηκαν κατά την αλλοίωση του χοιρινού κιμά σε 0, 5, 10 και 15°C σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με PFGE, Rep-PCR και Sau-PCR. Ο συντελεστής ομοιότητας ήταν 86%. Οι ομάδες υποδεικνύονται με λατινικούς αριθμούς και αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.2. 199

Εικόνα 5.3.1: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης γλωρίδας σε στείρο ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10°C σε αερόβιες συνθήκες. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, x: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες 215

Εικόνα 5.3.2: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης γλωρίδας σε στείρο ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, x: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες 216

Εικόνα 5.3.3: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης γλωρίδας σε στείρο ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10°C σε αερόβιες συνθήκες. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης μετά από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* 219

και *P. putida*, x: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες

Εικόνα 5.3.4: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης γλωρίδας σε στείρο ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10 °C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης μετά από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, x: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες

Εικόνα 5.3.5: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση στείρου φιλέτου εμβολιασμένου με *L. sakei* και *Ln mesenteroides* σε θερμοκρασία 10°C την αρχή της αλλοίωσης

Εικόνα 5.3.6: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση στείρου φιλέτου εμβολιασμένου με *P. fragi* σε θερμοκρασία 4°C μετά από 116 ώρες συντήρησης

Εικόνα 5.3.7: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση στείρου φιλέτου σε θερμοκρασία 4°C μετά από 80 ώρες συντήρησης

Εικόνα 5.3.8: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αλλοίωση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στείρου φιλέτου εμβολιασμένου με *P. fragi*, *P.*

putida, *L. sakei* και *Ln mesenteroides* σε θερμοκρασία 10 °C μετά από 6 ώρες συντήρησης

Εικόνα 5.3.9: Μεταβολή της αιθανόλης σε α) αέρα στους 4°C, β) αέρα στους 10°C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης γλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

248

Εικόνα 5.3.10: Μεταβολή της ακεταλδεϋδης σε α) αέρα στους 4°C, β) αέρα στους 10°C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης γλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

261

Εικόνα 5.3.11: Μεταβολή της ακετοΐνης σε α) αέρα στους 4°C, β) αέρα στους 10°C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης γλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

263

Εικόνα 5.3.12: Μεταβολή του εξανοϊκού μεθυλεστέρα σε α) αέρα στους 4°C, β) αέρα στους 10°C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης γλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

264

Εικόνα 5.3.13: Μεταβολή της λινανοόλης σε α) αέρα στους 4°C, β) αέρα στους 10°C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης

267

χλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

Εικόνα 5.3.14: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 4°C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για το μη εμβολιασμένο κρέας και για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση) 270

Εικόνα 5.3.15: Διάγραμμα θερμικής απεικόνισης για τα δείγματα που συντηρήθηκαν αερόβια στους 10°C. Το πράσινο χρώμα σημαίνει χαμηλή συσχέτιση ενώ το κόκκινο χρώμα σημαίνει υψηλή συσχέτιση μεταξύ πτητικών ουσιών και των ομάδων των μικροοργανισμών (στείρα μη εμβολιασμένα δείγματα, δείγματα εμβολιασμένα με γαλακτικά βακτήρια, ψευδομονάδες και κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών) 273

Εικόνα 5.3.16: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 10 °C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση) 247

Εικόνα 5.3.17: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 4°C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση) 275

Εικόνα 5.3.18: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 10°C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση) 278

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Σύσταση του κρέατος υγιών ενηλικιωμένων θηλαστικών μετά τη νεκρική ακαμψία	4
Πίνακας 1.2: Γένη βακτηρίων που απαντώνται στο κρέας	8
Πίνακας 1.3: Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά τη συντήρηση του κρέατος σε αέρα και τροποποιημένες ατμόσφαιρες	11
Πίνακας 1.4: Ειδικοί αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί που ανευρίσκονται σε νωπό κρέας σε θερμοκρασίες από 0-4°C σε διαφορετικές ατμόσφαιρες συσκευασίας	15
Πίνακας 1.5: Κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών του κρέατος (1= πρώτο, 12= τελευταίο) κατά την ανάπτυξη της εφήμερης αλλοιωγόνου χλωρίδας σε μυϊκό ιστό	18
Πίνακας 1.6: Παράγοντες και πρόδρομες ουσίες που επηρεάζουν την παραγωγή των δύσοσμων τελικών προϊόντων των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Moraxella</i> spp.) μετά από εμβολιασμό σε ζωμό, σε στείρο πρότυπο σύστημα και σε κρέας	24
Πίνακας 1.7: Παράγοντες και πρόδρομες ουσίες που επηρεάζουν το μέγιστο σχηματισμό τελικών προϊόντων των γαλακτικών βακτηρίων (<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Carnobacterium</i> spp.) μετά από εμβολιασμό σε ζωμό, σε στείρο πρότυπο σύστημα και σε κρέας	25
Πίνακας 1.8: Ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό, την πρόβλεψη ή την εκτίμηση της ποιότητας του κρέατος	27
Πίνακας 3.3.1: Κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού κιμά κατά την αερόβια συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Baranyi & Roberts.	77
Πίνακας 3.3.2: Κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Baranyi & Roberts.	78

Πίνακας 3.3.3: Οργανοληπτική αξιολόγηση του χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες σε σύγκριση με την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και το pH	79
Πίνακας 3.3.4: Οργανοληπτική αξιολόγηση του χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε σύγκριση με την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και το pH	79
Πίνακας 3.3.5: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-DA	90
Πίνακας 3.3.6: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά με τα φασματικά δεδομένα σε δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες	91
Πίνακας 3.3.7: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, όπως προέκυψε έπειτα από ανάλυση PLS-DA	96
Πίνακας 3.3.8: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα με τα φασματικά σε δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες	98
Πίνακας 3.3.9: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων εκπαίδευσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	112
Πίνακας 3.3.10: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	113
Πίνακας 3.3.11: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	114

Πίνακας 3.3.12: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης για τη συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων των δειγμάτων χοιρινού κιμά με τις αποκρίσεις των αισθητήρων κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες	116
Πίνακας 3.3.13: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων εκπαίδευσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	123
Πίνακας 3.3.14: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	124
Πίνακας 3.3.15: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	125
Πίνακας 3.3.16: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης για τη συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων των δειγμάτων χοιρινού κιμά με τις αποκρίσεις των αισθητήρων κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας	126
Πίνακας 3.3.17: Μεταβολές στο εμβαδόν των κορυφών κατά την έναρξη της συντήρησης (0 ώρες) και στο τέλος της διάρκειας ζωής του χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα	133
Πίνακας 3.3.18: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση του χοιρινού κιμά όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	139
Πίνακας 3.3.19: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από διακριτική ανάλυση παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης	143

Πίνακας 3.3.20: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με SVM συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά την αερόβια συντήρηση	145
Πίνακας 3.3.21: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP του χοιρινού κιμά όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	147
Πίνακας 3.3.22: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από διακριτική ανάλυση παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης	150
Πίνακας 3.3.23: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα των δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας	153
Πίνακας 3.3.24: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C	159
Πίνακας 3.3.25: Πίνακας διπλής εισόδου για την ταξινόμηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες, όπως προέκυψε έπειτα από ανάλυση με DFA με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	173
Πίνακας 3.3.26: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα με τα φασματικά δεδομένα σε δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες	177
Πίνακας 3.3.27: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, όπως προέκυψε έπειτα από διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης	179
Πίνακας 3.3.28: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα με τα φασματικά σε δείγματα κιμά συντηρημένα σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες	183

Πίνακας 4.1: Πληθυσμός εκφρασμένος σε log CFU/g του χοιρινού κιμά κατά την συντήρησή του (αρχή, μέση και τέλος) σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στο επιλεκτικό υπόστρωμα STAA	192
Πίνακας 4.2: Κατανομή των διαφορετικών ομάδων του βακτηρίου <i>Brochothrix thermosphacta</i> κατά την αλλοίωση του χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας	200
Πίνακας 5.3.1: Κινητικοί παράμετροι της αύξησης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες 4 και 10°C όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο των Baranyi & Roberts	217
Πίνακας 5.3.2: Κινητικοί παράμετροι της ανάπτυξης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 4 και 10°C όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο των Baranyi & Roberts	218
Πίνακας 5.3.3: Οργανοληπτική αξιολόγηση του μη εμβολιασμένου και του εμβολιασμένου στείρου κρέατος με επιλεγμένους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες	221
Πίνακας 5.3.4: Οργανοληπτική αξιολόγηση του μη εμβολιασμένου και του εμβολιασμένου στείρου κρέατος με επιλεγμένους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας	222
Πίνακας 5.3.5: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος	226
Πίνακας 5.3.6: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε αερόβιες συνθήκες στους 10°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος	233
Πίνακας 5.3.7: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) στους 4°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος	240

Πίνακας 5.3.8: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) στους 10°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος	247
Πίνακας 5.3.9: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 4°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)	269
Πίνακας 5.3.10: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 10°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)	272
Πίνακας 5.3.11: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 4°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)	276
Πίνακας 5.3.12: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 10°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)	277
Πίνακας 5.3.13: Οι σημαντικότερες ουσίες σε σχέση με την οργανοληπτική αξιολόγηση κατά την αερόβια συντήρηση στους 10°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)	279
Πίνακας 5.3.14: Οι σημαντικότερες ουσίες σε σχέση με την οργανοληπτική αξιολόγηση κατά την συντήρηση σε MAP στους 4°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)	280

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

A_f	Συντελεστής ακριβείας
ATR	Εξασθενημένη ολική ανάκλαση
B_f	Συντελεστής προκατάληψης
FTIR	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
GC/MS	Αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας
DFA	Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων
HCA	Ιεραρχική ομαδοποίηση
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HP/SPME	Υπερκείμενος χώρος/ μικροεκχύλιση στερεής φάσης
Lag phase	Διάρκεια φάσης προσαρμογής
MAP	Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
μ_{max}	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης
one-way-anova	Ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα
PCA	Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών
PC	Κύριες Συνιστώσες
PFGE	Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου
PLS-DA	Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων Διακριτικής Ανάλυσης
PLS-R	Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων Γραμμικής Παλινδρόμησης
Rep-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας
RT	Χρόνος κατακράτησης
SD	Τυπική απόκλιση
SEC	Τυπικό Σφάλμα Εκπαίδευσης
SEP	Τυπικό Σφάλμα Πρόβλεψης
SVM	Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης

Κεφάλαιο 1

Γενική Εισαγωγή

Εισαγωγή

Το κρέας είναι ένα από τα πλέον ευαλλοιώτα τρόφιμα. Η αλλοίωση του κρέατος θεωρείται ένα οικολογικό φαινόμενο, το οποίο προκαλεί αλλαγές στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά (ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους) κατά τη διάρκεια της συντήρησής του με τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των βακτηρίων που βρίσκονται στην επιφάνεια του κρέατος. Ο ρόλος της μικροβιακής χλωρίδας είναι θεμελιώδης, αφού τα προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού είναι αυτά που προκαλούν τις οργανοληπτικές μεταβολές και οδηγούν στην απόρριψη του προϊόντος. Τυπικά χαρακτηριστικά της αλλοίωσης είναι η αλλαγή του αρώματος από το χαρακτηριστικό φρέσκο άρωμα σε ένα δυσάρεστο, όπως και η εμφάνιση γλοιώδους υφής στην επιφάνεια του κρέατος. Ως σημείο της αλλοίωσης ορίζεται το ανώτατο αποδεκτό επίπεδο μικροοργανισμών καθώς και το σημείο μέχρι να εμφανιστούν μη αποδεκτές οσμές και γεύσεις. Τα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης γίνονται ορατά σε διαφορετικό μικροβιακό πληθυσμό που σχετίζεται με τον τύπο του κρέατος και το pH. Σε κρέατα με υψηλό pH (>6) η αλλοίωση γίνεται εμφανής σε χαμηλό πληθυσμό περίπου $6 \log \text{CFU/cm}^2$ ενώ σε κρέατα με χαμηλότερο pH ο πληθυσμός κυμαίνεται από 7 έως $8 \log \text{CFU/cm}^2$ ανάλογα με τη σύνθεση των μυών και το επίπεδο του γλυκογόνου (Ellis et al., 2004). Γενικά, η διάρκεια ζωής του κρέατος είναι ο χρόνος αποθήκευσης μέχρι την αλλοίωσή του (Borch et al., 1996, Nychas et al, 2008).

Η αλλοίωση ενός τροφίμου, κυρίως κατά τα πρώτα σημάδια της εμφάνισής της, χαρακτηρίζεται από τα υποκειμενικά κριτήρια του καταναλωτή όσον αφορά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Συγκεκριμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως υφή, εμφάνιση και γεύση, αποτελούν κριτήρια για να θεωρηθεί ένα τρόφιμο ως αλλοιωμένο (Paramithiotis et al, 2009, Nychas et al., 2007). Πολλές ομάδες μικροοργανισμών συμβάλλουν στην αλλοίωση του κρέατος υπό κατάλληλες συνθήκες. Μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος ενδογενών ή/και εξωγενών παραγόντων, συνήθως μόνο ένα είδος μικροοργανισμού από τη συνολική μικροχλωρίδα καθίσταται υπεύθυνο για την αλλοίωση του κρέατος, καθώς ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζει την αλλοίωση είναι η θερμοκρασία. Η θερμοκρασία έχει άμεση σχέση με τον ειδικό ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών και με τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής τους. Όλοι αυτοί οι παράγοντες, οδηγούν στην επικράτηση συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών,

οι οποίοι αποτελούν μέρος της αρχικής μικροχλωρίδας, είναι γνωστοί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί και είναι υπεύθυνοι για τον τύπο της αλλοίωσης σε ένα τρόφιμο (Ercolini et al., 2006, Mataragas et al., 2006, Nychas & Skandamis, 2005, Nychas et al., 2007). Ο τύπος της αλλοίωσης ποικίλει ανάλογα με τον μικροοργανισμό που επικρατεί, τον τύπο του κρέατος (υψηλό ή χαμηλό pH, ενζυμική δραστηριότητα), τη σύνθεση του προϊόντος (π.χ., σύσταση σε σάκχαρα, λιπίδια) και το περιβάλλον συντήρησης (θερμοκρασία, σύσταση συσκευασίας κ.λπ.). Ένα αλλοιωμένο τρόφιμο δεν σημαίνει απαραίτητα ότι είναι μη ασφαλές τρόφιμο που θα οδηγήσει σε τροφική δηλητηρίαση. Όμως, η αλλοίωση των τροφίμων είναι εξαιρετικής σημασίας λόγω της σπατάλης των τροφίμων, των οικονομικών απωλειών και της έλλειψης εμπιστοσύνης που προκαλείται στους καταναλωτές, καθώς είναι γνωστό ότι το ¼ της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων χάνεται εξαιτίας της μικροβιακής δραστηριότητας (Nychas et al., 2007, Papadopoulou et al., 2011).

Το κεφάλαιο αυτό θα επικεντρωθεί στη μικροβιολογία του κρέατος, στην παράταση της διάρκειας ζωής του και στις νέες τάσεις, που σχετίζονται με τις ταχείες τεχνικές ελέγχου για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης.

1.1. Σύσταση του κρέατος

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ως κρέας χαρακτηρίζονται τα αυτοτελή σώματα ή τμήματα σωμάτων των θερμόαιμων ζώων ή πτηνών κατάλληλα προς διατροφή του ανθρώπου και διατιθέμενα στην κατανάλωση ως έχουν, χωρίς καμία επεξεργασία εκτός της ψύξης. Η χημική σύσταση του κρέατος ποικίλει και εξαρτάται από το είδος, το φύλο και την ηλικία του ζώου, το είδος της διατροφής του, τη μεταχείριση του ζώου πριν και κατά τη σφαγή, τη διάρκεια και τη θερμοκρασία ωρίμανσης και συντήρησης του κρέατος. Η χημική σύνθεση ενός μύος ενηλικιωμένου θηλαστικού μετά τη νεκρική ακαμψία παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1). Το κρέας, αποτελείται κυρίως από νερό, πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες. Βιταμίνες, ένζυμα ή χρωστικές αποτελούν δευτερεύοντα συστατικά. Εξαιτίας της υψηλής ενεργότητας ύδατος (a_w) και της αφθονίας σε θρεπτικά συστατικά, το κρέας συνιστά ένα εξαιρετικό μέσο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, δεδομένου ότι οι αλλαγές που

συμβαίνουν κατά την αλλοίωση λαμβάνουν χώρα στην υδατική φάση του κρέατος. Αυτές οι ουσίες καταβολίζονται από όλους σχεδόν τους μικροοργανισμούς και καθιστούν το κρέας ιδιαίτερα ευπαθές και ευαλλοίωτο προϊόν (Argyri, 2010a, Drosinos & Board 1995, Nychas et al. 2007).

Πίνακας 1.1: Σύσταση του κρέατος υγιών ενηλικιωμένων θηλαστικών μετά τη νεκρική ακαμψία^a

Συστατικό	% βάρος
Νερό	75.0
Πρωτεΐνη	19.0
Ινώδης	11.5
Σαρκοπλασματικές	5.50
Συνδετικός ιστός	2.0
Λίπος	2.50
Υδατάνθρακες και γαλακτικό οξύ	1.20
Γαλακτικό οξύ	0.90
Γλυκόζη 6-P	0.15
Γλυκογόνο	0.10
Γλυκόζη και ενδιάμεσα γλυκολιτικής οδού	0.05
Διαλυτά μη πρωτεϊνούχα συστατικά:	2.30
Άζωτο	1.65
Κρεατινίνη	0.55
Ινωσίνη	0.30
ATP, AMP	0.10
Αμινοξέα	0.35
Καρνοσίνη, ανσερίνη	0.35
Ανόργανα	0.65
Ολικός διαλυτός φώσφορος	0.20
Κάλιο	0.35
Νάτριο	0.05
Μαγνήσιο	0.02
Άλλα μέταλλα	0.23
Βιταμίνες	Ίχνη

Τροποποιήθηκε από τους Adams & Moss (1995) και Nychas et al. (2007).

1.2. Παράγοντες που καθορίζουν τη μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων

Σε κάθε οικοσύστημα τροφίμων υπάρχουν πέντε βασικές συνιστώσες οι οποίες επηρεάζουν την θανάτωση, επιβίωση και αύξηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Αυτές είναι οι ενδογενείς, εξωγενείς, συνδυαστικοί παράγοντες (implicit), παράγοντες που αφορούν στην επεξεργασία και οι αναδυόμενες επιδράσεις (emergent effects), δηλαδή παράγοντες οι οποίοι αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και προκαλούν μεγαλύτερα αποτελέσματα από ό,τι θα είχε ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά (Nychas & Skandamis, 2005).

Οι ενδογενείς παράγοντες έχουν σχέση με τη βιολογική δομή του τροφίμου και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του. Πιο συγκεκριμένα είναι το pH, η ενεργότητα ύδατος, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, η ρυθμιστική ικανότητα, η σύσταση και η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (ιδιαίτερα γλυκόζη) και τέλος η παρουσία φυσικών ή προστιθέμενων αντιμικροβιακών συστατικών. Οι εξωγενείς παράγοντες αφορούν τη θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία και την ατμόσφαιρα όπου αποθηκεύεται το τρόφιμο και αναλύονται παρακάτω. Η φυσική ή χημική επεξεργασία ενός τροφίμου επιδρά στα χαρακτηριστικά του προϊόντος και καθορίζει τη σύσταση της μικροχλωρίδας (πλύσιμο, τεμαχισμός, παστερίωση, συσκευασία, ακτινοβολία). Οι συνδυαστικοί βιοτικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στη διαδοχή και επικράτηση των μικροβίων της αλλοίωσης, καθώς σχετίζονται με τις ιδιότητες των ίδιων των μικροοργανισμών και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις που μπορούν να δρουν μεταξύ τους ανταγωνιστικά ή συνεργιστικά, όπως αυτές καθορίζονται από το περιβάλλον μέσα στο οποίο βρίσκονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Συχνά, αυτοί οι μεμονωμένοι παράγοντες αλληλεπιδρούν ώστε να παράγουν μία πρόσθετη ή συνεργιστική επίδραση στην τελική ποιότητα του κρέατος (Borch et al., 1996, Huis in 't Veld, 1996, Nychas & Skandamis, 2005)

1.2.1. Μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μικροοργανισμοί είναι απόντες, μη ανιχνεύσιμοι ή σε πολύ χαμηλά επίπεδα στους μυϊκούς ιστούς των υγιών ζώντων ζώων. Κατά τη σφαγή των ζώων, οι προστατευτικοί μηχανισμοί καταστρέφονται (δέρμα, τρίχωμα, φυσικοί

αντιμικροβιακοί μηχανισμοί όπως λυσοζύμη) και το κρέας εκτίθεται σε πιθανούς παράγοντες επιμόλυνσης. Παράμετροι όπως θερμοκρασία, μέθοδος επεξεργασίας ή συσκευασία, καθώς και η φυσική κατάσταση του ζώου κατά τη σφαγή ή η μικροβιακή εξάπλωση στους χώρους σφαγής είναι δυνατόν να συνεισφέρουν στην ταχύτερη μικροβιακή αλλοίωση εάν η διαδικασία σφαγής δεν ελέγχεται αποτελεσματικά (Nychas & Skandamis, 2005, Nychas et al., 2007, 2008).

Η αρχική μικροχλωρίδα του κρέατος αποτελείται από τη φυσική μικροχλωρίδα και την περιβαλλοντική μόλυνση που προέρχεται από το χειρισμό του, ενώ μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροχλωρίδας είναι ικανό να αναπτυχθεί και να φτάσει σε σχετικά μεγάλους πληθυσμούς. Το κλάσμα αυτό είναι γνωστό ως ειδικοί αλλοιωγόνοι οργανισμοί (specific spoilage organisms, SSO) και έχει υιοθετηθεί για το χαρακτηρισμό του κλάσματος της συνολικής μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση (Ercolini et al., 2006, Huis in't Veld, 1996, Nychas et al., 2008, Nychas & Skandamis, 2005). Η αλλοίωση προκύπτει ως αποτέλεσμα της αύξησης των μικροοργανισμών και έπειτα από ένα επίπεδο προκαλεί μεταβολές στη φυσική, χημική και βιοχημική σύσταση του κρέατος, με αποτέλεσμα το κρέας να γίνεται μη ελκυστικό για τον καταναλωτή και ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση (Fung, 2010).

1.2.1.1. Βακτήρια που σχετίζονται με την αλλοίωση του κρέατος

Το εσωτερικό του κρέατος που προέρχεται από υγιή ζώα και από υγιεινές συνθήκες σφαγής είναι στείρο ή σχεδόν στείρο. Η επιφάνειά του όμως μολύνεται κατά τη διάρκεια της σφαγής ή στη διάρκεια των μετέπειτα χειρισμών με διάφορους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ζύμες και μύκητες), είτε αλλοιωγόνους είτε παθογόνα βακτήρια. Κυρίως αρνητικά κατά Gram βακτήρια αποτελούν τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς του φρέσκου κρέατος, όπως τα αερόβια ψυχρότροφα είδη *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* και *Aeromonas*, και το προαιρετικά αναερόβιο είδος *Shewanella putrefaciens*. Σε υψηλούς πληθυσμούς απαντώνται και θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως *Lactobacillus* και *Brochothrix thermosphacta* (Adams & Moss 1995, Borch et al. 1996, Dainty & Mackey 1992, Drosinos & Board 1995, Lambert et al. 1991, Nychas et al. 2007). Παρ' όλα αυτά, λίγοι μικροοργανισμοί κυριαρχούν κατά την αλλοίωση του κρέατος και

είναι αυτοί οι οποίοι χαρακτηρίζουν τον τύπο της αλλοίωσης (Nychas et al., 1998). Οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια και *Shewanella putrefaciens* αποτελούν την κύρια μικροβιακή χλωρίδα σε νωπό κρέας χαμηλού ή υψηλού pH, το οποίο διατηρείται σε συνθήκες ψύξης κάτω από αερόβιες ή συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Garcia-Lopez et al., 1998, Stanbridge & Davis, 1998). Στον Πίνακα 1.2 αναφέρονται τα είδη των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται συχνότερα στο φρέσκο, επεξεργασμένο ή συσκευασμένο κρέας.

Τα βακτήρια στα οποία επικεντρώθηκε η παρούσα μελέτη βρίσκονται μέσα στις κύριες ομάδες των βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του κρέατος, δηλαδή *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια και *Enterobacteriaceae*.

- *Pseudomonas* spp: Οι ψευδομονάδες είναι αρνητικά κατά Gram ψυχρότροφα ραβδία και απαρτίζουν ένα μεγάλο γένος βακτηρίων, αποτελούμενο από πέντε ομάδες βάσει των φυλογενετικών μελετών rRNA. Μεταξύ των πιο σημαντικών ειδών των ψευδομονάδων στην αλλοίωση του κρέατος είναι τα βακτήρια *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava* και *Pseudomonas syringae*, ενώ έπειτα από φαινοτυπικό και μοριακό χαρακτηρισμό των ψυχρότροφων βακτηρίων που απομονώθηκαν από φρέσκο και αλλοιωμένο κρέας κατέληξαν σε τρία κυρίαρχα είδη ψευδομονάδων, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas ludensis* (Doulgeraki et al., 2013). Η κύρια πηγή άνθρακα του κρέατος, δηλαδή η γλυκόζη, έχει βρεθεί ότι μεταβολίζεται ταχύτερα από τα υποχρεωτικά αερόβια στελέχη των ψευδομονάδων σε κρέας που συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες, σε σύγκριση με τα προαιρετικά αναερόβια στελέχη του *B. thermosphacta*.

Πίνακας 1.2: Γένη βακτηρίων που απαντώνται στο κρέας^α

Γένη	Χρώση Gram	Φρέσκο κρέας	Επεξεργασμένο κρέας	Κρέας συσκευασμένο σε κενό
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	X	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX		X
<i>Alcaligenes</i>	-	X		
<i>Bacillus</i>	+	X	X	
<i>Brochothrix</i>	+	X	X	XX
<i>Carnobacterium</i>	+	X		XX
<i>Chromobacterium</i>	-	X		
<i>Citrobacter</i>	-	X		
<i>Clostridium</i>	+	X		
<i>Corynebacterium</i>	+	X	X	X
<i>Enteterobacter</i>	-	X	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X	XX
<i>Escherichia</i>	-	X		
<i>Flavobacterium</i>	-	X		
<i>Hafnia</i>	-	X		X
<i>Kurthia</i>	+	X		X
<i>Lactococcus</i>	+	X	X	
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX	XX
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X	X
<i>Listeria</i>	+	X	X	
<i>Micterium</i>	+	X	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X	X
<i>Moraxella</i>	-	XX		
<i>Pantoea</i>	-	X		
<i>Pediococcus</i>	+	X	X	X
<i>Proteus</i>	-	X		X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX		X
<i>Psychter</i>	-	XX		
<i>Salmonella</i>	-	X	X	X
<i>Serratia</i>	-	X	X	X
<i>Shewanella</i>	-	X		
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X	X
<i>Yersinia</i>	-	X		X

X= είναι γενικά γνωστό ότι υπάρχει. XX= υπάρχει πιο συχνά.

^α: Πίνακας από τους Nychas et al., 2007.

Οι ψευδομονάδες καταβολίζουν διαδοχικά την D-γλυκόζη και το L- και D-γαλακτικό οξύ με την οξείδωση της γλυκόζης και 6-φωσφορικής γλυκόζης μέσω του εξωκυτταρικού μονοπατιού το οποίο οδηγεί σε μία παροδική συσσώρευση της συγκέντρωσης σε D-γλυκονικό οξύ και 6-φωσφογλυκονικού οξέος. Μετά την κατανάλωση της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος ακολουθεί η χρησιμοποίηση των αμινοξέων, με αποτέλεσμα την παραγωγή διάφορων δύσοσμων πτητικών προϊόντων (Doulgeraki & Nychas, 2013, Gill & Newton, 1977, Paramithiotis et al., 2009,).

- *Brochothrix thermosphacta*: Ο *Brochothrix thermosphacta* είναι ένα ψυχρότροφο, θετικό κατά Gram, ραβδόμορφο βακτήριο, χωρίς ικανότητα κίνησης και σχηματισμού σπορίων, προαιρετικά αναερόβιο, το οποίο εμπλέκεται συχνά στην αλλοίωση κρέατος ή στα προϊόντα κρέατος (Kilcher et al., 2010). Ο *B. thermosphacta*, αποτελεί ένα σημαντικό ποσοστό της αλλοιωγόνου χλωρίδας του κρέατος που συντηρείται αερόβια και περιστασιακά έχει βρεθεί να είναι η κυρίαρχη μικροχλωρίδα. Ο *B. thermosphacta* μπορεί να αναπτύσσεται σε αερόβιες και σε αναερόβιες συνθήκες και να παράγει δυσάρεστες οσμές, όπως ακετοΐνη, διακετύλιο, 3-μεθυλοβουτανόλη, οξικό, ισοβουτυρικό, 2-μεθυλοβουτυρικό, ισοβαλερικό ή γαλακτικό οξύ, διοξειδίο του άνθρακα και αιθανόλη (Kilcher et al., 2010, Papadopoulou et al., 2012, Pennacchia et al., 2009).

- Γαλακτικά βακτήρια: Τα γαλακτικά βακτήρια είναι μία ετερογενής ομάδα μικροοργανισμών. Είναι θετικά κατά Gram, αρνητικά στην καταλάση, χωρίς δυνατότητα παραγωγής σπορίων, προαιρετικά αναερόβια, αυστηρά ζυμωτικά. Από πλευράς μεταβολισμού, τα γαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες: (α) τα ομοζυμωτικά είδη (homofermenters), τα οποία μετατρέπουν τη γλυκόζη σε 90% γαλακτικό οξύ κατά το γλυκολυτικό σχήμα Embden-Meyerhof, και (β) τα ετεροζυμωτικά είδη (heterofermenters), τα οποία μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα (κύκλος φωσφοροπεντοζών). Παρ' όλα αυτά, οι διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να προκαλέσουν την αλλαγή της ομοζυμωτικής διεργασίας σε ετεροζυμωτική (Doulgeraki et al., 2010b, Singh et al., 2009). Τα γαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην εφήμερη αλλοιωγόνο χλωρίδα του κρέατος και προκαλούν αλλοιώσεις σε κρέας το οποίο αποθηκεύεται σε συνθήκες με

αυξημένη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα. Τα πιο συχνά απαντώμενα γένη σε κρέας το οποίο είναι συσκευασμένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή σε κενό ανήκουν στα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* και *Weissella* (Doulgeraki et al., 2010b, Paramithiotis et al., 2009). Η αλλοίωση που προκαλείται από τα γαλακτικά βακτήρια δεν είναι τόσο έντονη όσο αυτή που προκαλείται από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα οποία παράγουν δύσοσμες πτητικές ουσίες σήψης (putrefaction). Η αλλοίωση από τα γαλακτικά βακτήρια προκαλεί όξινο άρωμα (souring) εξαιτίας των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων που είναι κυρίως γαλακτικό, μυρμηκικό, οξικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (Nychas et al., 2008).

Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζονται τα μεταβολικά προϊόντα τα οποία παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση του κρέατος σε αέρα και τροποποιημένες ατμόσφαιρες

1.2.2. Πηγές μικροβιακής επιμόλυνσης

Όπως έχει αναφερθεί, το κρέας μέχρι τη σφαγή είναι σχεδόν στείρο. Κατά τη σφαγή και τη μετέπειτα επεξεργασία του ένα σφάγιο είναι δυνατόν να επιμολυνθεί με μικροοργανισμούς και έχουν αναγνωριστεί διάφορες πηγές μικροβιακής επιμόλυνσης από την ώρα της σφαγής μέχρι την επεξεργασία και διανομή του κρέατος. Έτσι, είναι δυνατόν να υπάρξει επιμόλυνση μέσω έμμεσης επαφής από τον αέρα του χώρου επεξεργασίας (den Aantrekker et al., 2003, Gustavsson & Borch, 1993, Rahkio & Korkeala, 1997), με μεταφορά των μικροοργανισμών οι οποίοι βρίσκονται στις εξωτερικές επιφάνειες του σφαγίου (δέρμα, τρίχωμα, πόδια) αλλά και μικροοργανισμών οι οποίοι απαντώνται στο γαστρεντερικό σωλήνα ή στους λεμφαδένες του ζώου (Antic et al., 2010, Legg et al., 1999, Samelis, 2006), μέσω του εξοπλισμού και των εργαλείων κοπής και επεξεργασίας του σφαγίου αλλά και με την επαφή του προσωπικού που χειρίζεται τα σφάγια (den Aantrekker et al., 2003, Gill, 1998, Gounadaki et al., 2008, Fernandes, 2009, Kennedy et al., 2005, Legg et al., 1999, McMeekin, 1982, Nychas et al. 2007, Perez-Rodriguez et al., 2010, Vorst et al., 2006).

Πίνακας 1.3: Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά τη συντήρηση του κρέατος σε αέρα και τροποποιημένες ατμόσφαιρες^α

Μικροοργανισμοί	Μεταβολικά προϊόντα	
	Αερόβια	Αναερόβια
<i>Pseudomonas</i> spp.	Αμμωνία, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθυλεστέρες, μεθυλεστέρες, πουτρεσκίνη, καδαβερίνη	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη, 3-μεθυλοβουτανάλη, βουτανεδιόλη	Γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ διακετύλιο, ισοβουτυρικό οξύ, ισο-βαλερικό οξύ, αιθανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη, 3-μεθυλοβουτανάλη, 2,3 βουτανεδιόλη, λιπαρά οξέα
<i>Enterobacter</i> spp.	Εστέρες, υδρόθειο, αμίνες	-
Γαλακτικά βακτήρια	L, D-γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, H ₂ O ₂ , αιθανόλη, λιπαρά οξέα, υδρόθειο	L, D-γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, H ₂ O ₂ , αιθανόλη, λιπαρά οξέα, υδρόθειο

^α: Όπως τροποποιήθηκε από Νυχάς, σημειώσεις μικροβιολογίας τροφίμων, ΓΠΑ.

Ένα ευρύ φάσμα ειδών μικροοργανισμών κυρίως αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus* και *Vibrio*) έχει βρεθεί να αποικεί στο τρίχωμα και το δέρμα των σφαγίων ή έχει απομονωθεί από δείγματα που προέρχονται από επιφάνειες των σφαγίων (Gill et al., 1998, Gustavsson & Borch, 1993, Nychas et al., 2008). Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Antic et al. (2010), μελέτησαν τη μεταφορά από το δέρμα των ζώων απευθείας στο κρέας και αναφέρουν ότι η οικογένεια *Enterobacteriaceae* καθώς και το βακτήριο *Escherichia coli* ήταν τα πιο συχνά απαντώμενα στο τρίχωμα των ζώων, ενώ δεν βρέθηκε καθόλου *Salmonella* spp. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών, όπως *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, και *Campylobacter* spp., βρίσκονται συχνά σε μονάδες επεξεργασίας κρέατος (Arthur et al., 2004, Bacon et al., 2002, Berends et al., 1998, Ghafir et al., 2007).

1.2.3. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση και τη διάρκεια ζωής του κρέατος

Η επιβίωση και η αύξηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα επηρεάζεται από μία ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (ατμόσφαιρα της συσκευασίας), το pH, η δραστηριότητα του νερού, τα συστατικά του κρέατος και η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα. Οι παράγοντες αυτοί παίζουν ρόλο στη διατήρηση της ποιότητας του κρέατος για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα (Koutsoumanis et al., 2006, Lambert et al., 1991). Στην παρούσα μελέτη, οι κυριότεροι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν η θερμοκρασία και η συσκευασία και θα αναλυθούν εκτενέστερα στο παρακάτω κεφάλαιο.

1.2.3.1. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αλλοίωση και την ασφάλεια του κρέατος (Lambert et al., 1991, McDonald & Sun, 1999). Μικροβιακή αύξηση έχει παρατηρηθεί σε εύρος θερμοκρασιών από -5 έως 90°C σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, εφόσον το νερό που είναι απαραίτητο για την αύξηση των μικροοργανισμών είναι σε υγρή μορφή και είναι διαθέσιμο (Adam & Moss, 1995).

Για τη μικροβιολογία τροφίμων έχουν σημασία κυρίως οι μεσόφιλοι και οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί. Ο ρυθμός αύξησης των ψυχρότροφων μικροοργανισμών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και γίνεται χαμηλότερος καθώς η θερμοκρασία μειώνεται (Abd El-Rhman et al., 1998). Η συντήρηση ευπαθών προϊόντων σε θερμοκρασίες ψύξης μπορούν να αλλάξουν το ρυθμό και τη φύση της αλλοίωσης. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατόν να υπάρξουν ποιοτικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης, καθώς οι χαμηλές θερμοκρασίες ασκούν επιλεκτική δράση, εμποδίζοντας τους μεσόφιλους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν και οδηγούν στην κυριαρχία των ψυχρότροφων μικροοργανισμών. Όσον αφορά τους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς, παρ' όλο που έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης, η διαδικασία συμβαίνει με αργούς ρυθμούς, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της αλλοίωσης (Argyri 2010a, Ercolini et al., 2006).

Ακολουθώντας τις απαιτήσεις των καταναλωτών όσον αφορά το φρέσκο κρέας, οι οποίες αυξήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες, η ανάγκη για συνεχές συστηματικό έλεγχο και καταγραφή της θερμοκρασίας του νωπού κρέατος σε όλη τη διαδρομή του στην ψυκτική αλυσίδα από την παραγωγή του μέχρι την τελική κατανάλωση έγινε επιτακτική (Koutsoumanis et al., 2006, Nychas et al., 2008). Οι τρόποι μείωσης της θερμοκρασίας ξεκινούν κατά τη σφαγή του ζώου. Σε πρώτη φάση πρέπει να φτάσει η θερμοκρασία του σφάγιου στους 7°C, όπως ορίζει ο κανονισμός της Ε.Ε., ενώ κατά τη διαδικασία αυτή είναι δυνατόν να παρατηρηθεί αύξηση μικροοργανισμών (παθογόνων και αλλοιωγόνων). Στη συνέχεια, όποια περαιτέρω διαδικασία, όπως π.χ. τεμαχισμός, θα αυξήσει τη θερμοκρασία των τεμαχίων κρέατος, οπότε απαιτείται επιπλέον ψύξη. Ακολουθεί η διανομή του κρέατος σε υπεραγορές, μονάδες λιανικής πώλησης και τέλος στον καταναλωτή, κατά τη διάρκεια της οποίας το κρέας αποθηκεύεται σε φορτηγά, αποθήκες, ψυγεία υπεραγορών και τέλος στο οικιακό ψυγείο. Όλα τα παραπάνω αποτελούν κομβικά σημεία για την ασφάλεια, την ποιότητα και την εμπορική διάρκεια ζωής του κρέατος (Koutsoumanis & Sofos, 2004, Nychas et al., 2008, Verbeke et al., 1999). Φαίνεται πως οι αλλαγές στη θερμοκρασία έχουν επιπτώσεις στο προϊόν. Η έκταση του σοκ που παθαίνουν οι μικροοργανισμοί λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας σε βαθμούς ψύξης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος των μικροοργανισμών, η φάση αύξησης των κυττάρων, η διαφορά θερμοκρασίας και ο ρυθμός ψύξης (Adam & Moss, 1995).

1.2.3.2. Συσκευασία

Η συσκευασία των τροφίμων είναι απαραίτητη για την προστασία των προϊόντων, καθώς περιέχει το προϊόν προστατευμένο από διάφορους παράγοντες υποβάθμισης (απώλεια υγρασίας, προστασία από επιμολύνσεις με μικροοργανισμούς κ.λπ.), λειτουργεί ως εργαλείο διαφήμισης στον καταναλωτή και παρέχει εύκολη και άνετη χρήση. Η τοποθέτηση του κρέατος σε διαφανή πλαστικά υλικά συσκευασίας επιτρέπει την αξιολόγηση του προϊόντος από τους καταναλωτές και συγχρόνως δημιουργεί ένα προϊόν ελκυστικό, υγιεινό και βολικό στη χρήση. Η συσκευασία των τροφίμων αποσκοπεί πλέον σε πολλαπλούς στόχους, πέρα από τις συμβατικές ιδιότητες προστασίας και παρέχει πολλές λειτουργίες στο περιεχόμενο προϊόν (McMillin, 2008). Οι πιο σημαντικές ιδιότητες

είναι η επέκταση της εμπορικής διάρκειας ζωής του προϊόντος, η βελτίωση της εμφάνισής και παρουσίασης του προϊόντος, η μείωση της χρήσης συντηρητικών και η ελαχιστοποίηση των αποβλήτων. Η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι αναγνωρισμένη ως μία από τις πιο αποτελεσματικές εφαρμογές για την επέκταση της διάρκειας ζωής του νωπού κρέατος και χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία κρέατος (Koutsoumanis et al., 2008). Ο ορισμός που έχει δοθεί από τους Young et al. (1988), για την τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι «Ο εγκλεισμός του τροφίμου σε πλαστικά συσκευασίας (μεμβράνες), στο εσωτερικό των οποίων η αέρια σύσταση έχει τροποποιηθεί με σκοπό τη μείωση της αναπνοής, την ελάττωση της μικροβιακής αύξησης και την επιβράδυνση της ενζυμικής αλλοίωσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος». Για να δημιουργηθεί μία συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, μείγμα αερίων εμφυσάται μέσα σε εγκεκριμένο περιέκτη, με καθορισμένη διαπερατότητα στα αέρια και αποθηκεύεται συνήθως σε θερμοκρασίες ψύξης (McMillin, 2008). Διάφορα μείγματα αερίων έχουν δοκιμαστεί έτσι ώστε το μείγμα αερίων να έχει επίδραση στη σταθερότητα του προϊόντος. Οι συχνότερα εφαρμοζόμενες μέθοδοι τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι: i) συσκευασία σε κενό (vacuum packaging) και ii) συσκευασία όπου εμφυσάται αέριο μείγμα (gas-flush packaging). Παραδείγματα τέτοιων συσκευασιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4. Τα αέρια που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι διοξείδιο του άνθρακα, μονοξείδιο του άνθρακα, άζωτο, οξυγόνο και αργό. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) επιλέγεται εξαιτίας της βακτηριοστατικής δράσης του, η οποία παρατείνει τη φάση προσαρμογής ή το χρόνο διπλασιασμού των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού αύξησής τους όπως επίσης προκαλεί αλλαγή της κυρίαρχης μικροχλωρίδας σε βακτηριακές ομάδες με χαμηλότερο δυναμικό αλλοίωσης (Koutsoumanis et al., 2008). Το οξυγόνο στη συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες παρεμποδίζει την αύξηση των αυστηρά αναερόβιων παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ., *Clostridium botulinum*) και διατηρεί το χρώμα του κρέατος. Γενικά, το χρώμα του κρέατος εξαρτάται από τις μορφές της χρωμοπρωτεΐνης του κρέατος, τη μυοσφαιρίνη. Έτσι, παρουσία οξυγόνου, η μυοσφαιρίνη μπορεί να οξυγονωθεί, σχηματίζοντας την οξυμυοσφαιρίνη που προσδίδει στο κρέας ένα λαμπερό ερυθρό χρώμα, ή να οξειδωθεί σε μεταμυοσφαιρίνη, η οποία έχει ένα καστανό χρώμα (Viana et al., 2005). Τέλος, υψηλή συγκέντρωση του αερίου αυτού στη συσκευασία προκαλεί την οξείδωση και τάγγιση των

λιπιδίων. Το μονοξειδίο του άνθρακα (CO) αντιδρά με την μυοσφαιρίνη σχηματίζοντας την καρβοξυμυοσφαιρίνη, προσδίδοντας στο κρέας ένα σταθερό φωτεινό κόκκινο χρώμα (Viana et al., 2005, Zhou et al., 2010). Το άζωτο (N₂) είναι αδρανές αέριο και δεν αντιδρά με τις χρωστικές του κρέατος και δεν απορροφάται από το κρέας. Συνεπώς διατηρεί την ακεραιότητα της συσκευασίας καθώς παραμένει στον υπερκείμενο χώρο αυτής (Zhou et al., 2010). Επιπλέον, το άζωτο αντικαθιστά το οξυγόνο εντός του περιέκτη, επιβραδύνοντας έτσι την οξειδωτική τάγγιση του λίπους όπως και την αύξηση των αερόβιων μικροοργανισμών.

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να προσαρμόζονται σε ένα περιβάλλον είναι θεμελιώδους σημασίας για την επιβίωση και αύξηση τους. Η αύξηση της μικροχλωρίδας του νωπού κρέατος εξαρτάται από την ατμόσφαιρα που είναι συσκευασμένο το κρέας. Το είδος της αλλοίωσης του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες χαρακτηρίζεται από σήψη και σχετίζεται με την πρωτεολυτική δραστηριότητα και την παραγωγή δυσάρεστων οσμών από την κυριαρχία και τη δραστηριότητα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και κυρίως από *Pseudomonas* spp (Koutsoumanis et al., 2008, Nychas et al., 1998). Η διάρκεια ζωής του κρέατος μπορεί να παραταθεί εάν στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας αυξηθεί το ποσοστό του διοξειδίου του άνθρακα (Stanbridge & Davies, 1998). Συγχρόνως, η συσκευασία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τους χειρισμούς του κρέατος, καθώς προστατεύει το κρέας από την απώλεια υγρασίας, την απώλεια θρεπτικών συστατικών, από αλλαγές στην υφή του και από πιθανή επιμόλυνση με μικροοργανισμούς (Doulgeraki, 2010a, Paramithiotis et al., 2009, Viana et al., 2005, Zhou et al., 2010).

Πίνακας 1.4: Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που ανευρίσκονται σε νωπό κρέας σε θερμοκρασίες 0-4°C σε διαφορετικές ατμόσφαιρες συσκευασίας^a

Ατμόσφαιρα συσκευασίας	Κρέας και Πουλερικά
Αέρας	<i>Pseudomonas</i> spp.
>50% CO ₂ με O ₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
50% CO ₂	<i>Enterobacteriaceae</i> , Γαλακτικά βακτήρια
<50% CO ₂ με O ₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , Γαλακτικά βακτήρια
100% CO ₂	Γαλακτικά βακτήρια
Κενό	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brochothrix thermosphacta</i>

^a:Τροποποίηση από Nychas et al. (2007)

Ο κυριότερος σκοπός της συσκευασίας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι ο περιορισμός της αύξησης των αερόβιων μικροοργανισμών εξαιτίας της σχετικά υψηλής συγκέντρωσης σε διοξείδιο του άνθρακα και ιδιαίτερα των βακτηρίων *Pseudomonas* spp., τα οποία ευθύνονται για την ταχεία αλλοίωση του κρέατος (Insausti et al., 2002). Θετικά κατά Gram βακτήρια, κυρίως ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, και *Carnobacterium* spp.) αναπτύσσονται σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και πρέπει να τονιστεί ότι η αλλοίωση που προκαλείται από τα γαλακτικά βακτήρια είναι ηπιότερη σε σχέση με αυτή που προκαλούν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια καθώς τα πρώτα δεν έχουν έντονη πρωτεολυτική δράση. Τέλος, τα γαλακτικά βακτήρια και ο *Brochothrix thermosphacta* αποτελούν τους πιο σημαντικούς μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση του κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Adam & Moss, 1995, Law & Kolstad, 1983).

Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί η ανάγκη για ανάπτυξη νέων τύπων συσκευασίας τροφίμων με σκοπό τη βελτίωση των προϊόντων και την αύξηση της διάρκειας ζωής τους. Μία ποικιλία διαφορετικών ειδών συσκευασίας έχουν δοκιμαστεί, εκ των οποίων αξίζει να αναφερθούν οι αλλαγές στην ατμόσφαιρα συσκευασίας του προϊόντος μέσω ταμπλετών δέσμευσης οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα, ή προσθήκη διαφορετικής αναλογίας μείγματος αερίου, ο έλεγχος της υγρασίας καθώς και η εφαρμογή αντιμικροβιακών ουσιών πάνω στη συσκευασία (Paramithiotis et al., 2009).

1.3. Χημικές αλλαγές στο κρέας

Η συμβολή των ενζύμων στην αλλοίωση του κρέατος είναι αμελητέα σε σύγκριση με τη δράση της μικροβιακής χλωρίδας (Nychas & Tassou, 1997, Tsigarida & Nychas, 2001). Η μεταθανάτια γλυκόλυση, η οποία προκαλείται από τα ένζυμα που βρίσκονται στο κρέας, παύει μετά το θάνατο του ζώου, καθώς το pH από 7 φθάνει την τιμή 5,4-5,5, οπότε, η αλλοίωση του κρέατος οφείλεται στη μικροβιακή δραστηριότητα και στη συσσώρευση των μεταβολικών τους προϊόντων, παρά στη δραστηριότητα των ενζύμων (Nychas et al., 1998).

Το κρέας, εξαιτίας της υψηλής ενεργότητας ύδατος και των άφθονων θρεπτικών συστατικών του, αποτελεί ένα εξαιρετικό μέσο για την υποστήριξη της αύξησης των μικροοργανισμών, δεδομένου ότι οι αλλαγές που γίνονται κατά την αλλοίωση του κρέατος λαμβάνουν χώρα στην υδατική φάση του κρέατος (Nychas et al., 1998). Στην υδατική φάση του κρέατος απαντώνται ουσίες όπως γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, ουρία και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες καταβολίζονται από όλα σχεδόν τα βακτήρια του οικοσυστήματος του κρέατος (Drosinos, 1994, Gill, 1976, Nychas et al., 1998, 2007). Παρ' όλο που οι μικροοργανισμοί του κρέατος είναι κατεξοχήν πρωτεολυτικοί, αναπτύσσονται αρχικά χρησιμοποιώντας ως θρεπτικά υποστρώματα τους υδατάνθρακες καθώς και μη πρωτεϊνικό άζωτο (Adam & Moss, 1995, Nychas et al., 2007). Η σειρά με την οποία καταβολίζονται οι ουσίες αυτές παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.5. Η συγκέντρωση της γλυκόζης, του γαλακτικού οξέος, διάφορων αμινοξέων καθώς και των νουκλεοτιδίων, της ουρίας και των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, μπορεί να επηρεάσει το είδος (πρωτεολυτικό/ σακχαρολυτικό) και το ρυθμό της αλλοίωσης. Επιπλέον, οι ουσίες αυτές είναι οι πρόδρομες ενώσεις των μικροβιακών μεταβολιτών που γίνονται αντιληπτές ως αλλοίωση (Nychas et al., 1998, 2008). Εκτεταμένη πρωτεόλυση συμβαίνει στα προχωρημένα στάδια της αλλοίωσης και αφού το κρέας έχει απορριφθεί από οργανοληπτικής σκοπιάς (Adams & Moss, 1995).

1.3.1. Χημικές αλλαγές σε αερόβιες συνθήκες

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella* και *Acinetobacter* αποτελούν την κυριότερη αλλοιωγόνο μικροβιακή χλωρίδα κατά τη συντήρηση του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες. Ωστόσο, το χαμηλό pH του κρέατος περιορίζει την αύξηση πολλών στελεχών των *Moraxella* και *Acinetobacter*, με συνέπεια να μην έχουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος. Εντέλει, οι ψευδομονάδες κυριαρχούν λόγω του ταχύτερου ρυθμού ανάπτυξής τους και της μεγαλύτερης συγγένειας με το οξυγόνο και καταβολίζουν τη γλυκόζη ταχύτερα από άλλα βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις στο κρέας (Nychas et al., 2007). Οξειδωση της γλυκόζης από τα βακτήρια αυτά οδηγεί σε παροδική συσσώρευση πυροσταφυλικού και γλυκονικού οξέος και αύξηση του 6-φωσφωγλυκονικού οξέος. Μετά την εξάντληση της γλυκόζης, του γλυκονικού και του

γαλακτικού οξέος ακολουθεί ο καταβολισμός των αμινοξέων παράγοντας υποπροϊόντα, όπως σουλφίδια και μεθυλεστέρες, τα οποία αποτελούν την πρώτη ένδειξη αλλοίωσης κρέατος που συντηρείται αερόβια σε συνθήκες ψύξης (Dainty et al., 1989a,b). Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης τρία είδη του γένους *Pseudomonas*, συγκεκριμένα *P. fragi*, *P. fluorescens* και *P. lundensis* είναι τα πιο σημαντικά (Doulgeraki & Nychas, 2013, Ercolini et al., 2007).

Πίνακας 1.5: Κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών του κρέατος (1= πρώτο, 12= τελευταίο) κατά την αύξηση της εφήμερης αλλοιωγόνου χλωρίδας σε μυϊκό ιστό*

Υπόστρωμα	Αερόβια					Αναερόβια ^β				
	A	B	Γ	Δ	E	A	B	Γ	Δ	E
Γλυκόζη	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Φωσφορική 6 γλυκόζη	2			2					2	
Γαλακτικό οξύ	3	2		3						
Πυροσταφυλικό οξύ	4	3				2 ^γ				
Γλυκονικό οξύ	5	4				2 ^γ				
Φωσφορικό 6 γλυκογόνο	6									
Προπιονικό οξύ		5								
Μυρμηκικό οξύ							1 ^α			
Αιθανόλη		6								
Οξικό οξύ		7				2 ^α				
Αμινοξέα	7	8	2	4		2 ^α	1 ^γ		3	2
Σερίνη και κυστεΐνη							1 ^γ			
Κρεατίνη	8									
Κρεατινίνη	9									
Κιτρικό οξύ	10									
Ασπαρτικό οξύ	11									
Γλουταμινικό οξύ	12					2 ^γ				
Ριβόζη				3						
Γλυκερόλη				4						
Λιπίδια										

^α: A: *Pseudomonas* spp., B: *Shewanella putrefaciens*, Γ: *Brochothrix thermosphacta*, Δ: *Enterobacter* spp., E: Γαλακτικά βακτήρια.

^β: Υπό συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου και/ή αναστολή με CO₂

^γ: Χωρίς συγκεκριμένη σειρά

*: Πίνακας από Nychas et al., 2007.

Όταν ο πληθυσμός των ψευδομονάδων φτάσει σε 7-8 λογαρίθμους, αρχίζει να σχηματίζεται γλοιώδες υμένιο (γλίτσα) στην επιφάνεια των τροφίμων και να παράγονται δύσοσμα πτητικά προϊόντα (Nychas & Skandamis, 2005). Επίσης, η *P. fragi* είναι η κυρίως υπεύθυνη για την παραγωγή αιθυλεστέρων σε κρέας που αποθηκεύεται αερόβια. Επιπλέον, η απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων αμμωνίας και αμινών κατά την αποικοδόμηση αμινοξέων και πρωτεϊνών συμβάλλει στην ανάπτυξη των οσμών αλλοίωσης (Koutsoumanis et al., 2008, Nychas et al., 2007). Οι Stutz et al. (1991), παρατήρησαν πως οι πτητικές ενώσεις ακετόνη, μεθυλαιθυλκετόνη, διμεθυλσουλφίδιο και διμεθυλδισουλφίδιο, αυξάνονται συνεχώς κατά την αερόβια αλλοίωση βοδινού κρέατος σε διάφορες θερμοκρασίες. Το υδρόθειο δίνει πράσινο χρωματισμό στο κρέας, καθώς συνδυάζεται με τη χρωστική των μυών και δημιουργεί τη σουλφομυογλοβίνη (sulphyomyoglobin). Οι αμίνες πουτρεσκίνη, καδαβερίνη, ισταμίνη, τυραμίνη, σπερμίνη και σπερμιδίνη βρέθηκαν σε χοιρινό και βοδινό κρέας, πουλερικά και ψάρια σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης και σε κενό (Nychas et al., 2007). Τα ψυχρότροφα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (π.χ. *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*) εμφανίζονται επίσης σε κρέας που συντηρείται υπό ψύξη σε αερόβιες συνθήκες, αλλά ο πληθυσμός τους δεν συμβάλλει σημαντικά στη μικροβιακή χλωρίδα της αλλοίωσης, ενώ περισσότερο αποτελούν δείκτες ασφάλειας τροφίμων (Nychas et al., 1998). Από τα θετικά κατά Gram βακτήρια, ο *Brochothrix thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια έχουν ανιχνευθεί σε κρέας που συντηρείται αερόβια υπό ψύξη, αλλά μόνο ο *B. thermosphacta* είναι σημαντικός τόσο για την αερόβια όσο και για την αναερόβια αλλοίωση του κρέατος. Ο *B. thermosphacta* καταβολίζει τη γλυκόζη και το γλουταμινικό οξύ παράγοντας ένα μείγμα τελικών προϊόντων, όπως ακετοΐνη, οξικό, ισο-βουτυρικό και ισοβαλερικό οξύ, 2,3-βουτανοδιόλη, διακετύλιο, 3-μεθυλοβουτανάλη, 2-μεθυλοπροπανόλη και 3-μεθυλοβουτανόλη, κατά τον αερόβιο μεταβολισμό του σε υποστρώματα που περιέχουν γλυκόζη, ριβόζη ή γλυκερόλη ως την κύρια πηγή άνθρακα (Nychas & Skandamis, 2005). Γενικά τα θετικά κατά Gram βακτήρια δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες (Nychas et al., 2007).

1.3.2. Χημικές αλλαγές σε συνθήκες περιορισμού του οξυγόνου

Η συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP) είναι αναγνωρισμένη ως μία από τις πλέον αποτελεσματικές εφαρμογές για την επέκταση της διάρκειας ζωής του φρέσκου κρέατος και των προϊόντων του και χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία κρέατος. Η παρουσία του διοξειδίου του άνθρακα στην υπερκείμενη φάση των συσκευασμένων κρεάτων οδηγεί σε αναστολή της μικροβιακής αύξησης και στη μετατόπιση της κυρίαρχης μικροχλωρίδας σε βακτηριακές ομάδες με χαμηλότερο δυναμικό αλλοίωσης (Koutsoumanis et al., 2008). Καθώς το οξυγόνο μειώνεται, η δράση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όπως οι ψευδομονάδες, καταστέλλεται. Η αλλοίωση των τροφίμων σε συσκευασίες με συνθήκες περιορισμού του οξυγόνου ή σε συσκευασίες με ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με διοξείδιο του άνθρακα οφείλεται κυρίως στα γαλακτικά βακτήρια, στον *B. thermosphacta*, στη *S. putrefaciens* και στο *P. phosphoreum* αν και τα δύο τελευταία βακτήρια ανευρίσκονται κυρίως στο ψάρι (Nychas et al., 2007). Αυτά τα βακτήρια (γαλακτικά βακτήρια και *B. thermosphacta*) μεταβολίζουν τη γλυκόζη για την παραγωγή οργανικών οξέων και η αλλοίωση του κρέατος χαρακτηρίζεται συνήθως από μια όξινη οσμή τυριού (Koutsoumanis et al., 2006). Ωστόσο, η παραγωγή των εν λόγω οσμών είναι δύσκολο να εξηγηθεί από την άποψη της συσσώρευσης οξικού, ισοβουτανοϊκού, L-ισοπεντανόλης, και D-γαλακτικού οξέος, επειδή οι ποσότητες των ουσιών αυτών είναι σχετικά μικρές σε σύγκριση με την ποσότητα του ενδογενούς L-γαλακτικού οξέος του φυσιολογικού pH των μυών. Οι όξινες οσμές τυριού που βρέθηκαν σε βόειο κρέας το οποίο είχε αποθηκευτεί σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με διοξείδιο του άνθρακα παρήχθησαν από τον *B. thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία μπορούν να παράγουν διακετύλιο, ακετοΐνη και αλκοόλες (Nychas et al., 2007). Ο βραδύτερος ρυθμός αύξησης των θετικών κατά Gram βακτηρίων σε συνδυασμό με τη διαφορετική μεταβολική δραστηριότητά τους σε σύγκριση με τις ψευδομονάδες έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική παράταση της εμπορικής διάρκειας ζωής του κρέατος (Koutsoumanis et al., 2006). Οι χημικές αλλαγές που συμβαίνουν σε συνθήκες με περιορισμένο οξυγόνο, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης σε D-γαλακτικό και οξικό οξύ, μπορούν να προσφέρουν ένα αξιόπιστο εργαλείο για την παρακολούθηση της ποιότητας των τροφίμων. Το οξικό οξύ, το οποίο αποτελεί προϊόν της

περαιτέρω οξείδωσης του γαλακτικού οξέος, έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή μοντέλων για την αξιολόγηση της ποιότητας στα πουλερικά, τα ψάρια και στο βόειο κρέας (Nychas et al., 2007). Καθοριστικούς παράγοντες αποτελούν οι ομοζυμωτικοί ή ετεροζυμωτικοί τύποι του μεταβολισμού των γαλακτικών βακτηρίων. Διαφορετικά γαλακτικά βακτήρια παράγουν L ή D μορφές του γαλακτικού οξέος ανάλογα με την παρουσία της γαλακτικής αφυδρογονάσης D-nLDH και/ή L-nLDH. Η αύξηση του οξικού οξέος σε βόειο και χοιρινό κρέας ή σε ψάρι που αποθηκεύεται υπό διαφορετικές συνθήκες κενού ή MAP μπορεί να οφείλεται στη στροφή από τον ομοζυμωτικό μεταβολισμό σε ετεροζυμωτικό μεταβολισμό των γαλακτικών βακτηρίων. Τέλος, οι αλκοόλες, ιδιαίτερα η αιθανόλη και η προπανόλη, φαίνεται να είναι οι πιο πολλά υποσχόμενες ενώσεις ως δείκτες αλλοίωσης στο κρέας και τα προϊόντα κρέατος που συντηρούνται υπό κενό ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Nychas et al., 2007). Τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* μεταβολίζουν τα αμινοξέα παράγοντας αμμωνία, πτητικά σουλφίδια, όπως υδρόθειο, και δύσοσμες αμίνες εξαιτίας της αποικοδόμησης αμινοξέων. Σε συνθήκες περιορισμού του οξυγόνου, η διαδοχή της χρησιμοποίησης των ουσιών του υποστρώματος παραμένει ίδια, εκτός από τη γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ, τα *Enterobacteriaceae* μπορούν να χρησιμοποιήσουν εναλλακτικά και άλλες πηγές άνθρακα (Gill & Newton, 1979, Tsigarida & Nychas, 2001, Paramithiotis et al., 2009). Η παραγωγή τυραμίνης, πουτρεσκίνης και καδαβερίνης έχει επίσης αποδοθεί σε γαλακτικά βακτήρια σε κρέας που συντηρείται υπό κενό ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Dainty et al., 1985).

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1.6 και Πίνακας 1.7) παρουσιάζονται οι παράγοντες και οι πρόδρομες ουσίες που επηρεάζουν την παραγωγή των δύσοσμων τελικών προϊόντων κάτω από διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης από τα πιο συχνά απαντώμενα βακτήρια αλλοίωσης του κρέατος.

1.4. Ανίχνευση μεταβολικών προϊόντων αλλοίωσης

Η αξιολόγηση της αλλοίωσης ενός τροφίμου είναι υποκειμενική, καθώς δεν υπάρχει κοινή συμφωνία για την ανίχνευση των πρώιμων συμπτωμάτων της αλλοίωσης. Τα διαφορετικά εμπόδια που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση του κρέατος (λ.χ., συσκευασία και θερμοκρασία) καθώς και οι διάφοροι ενδογενείς παράγοντες (pH,

ποσοστό γλυκόζης) μπορούν να επηρεάσουν τη διαδοχή των μικροοργανισμών και ιδιαίτερα της εφήμερης αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας. Η απρόβλεπτη επικράτηση ενός ή άλλου είδους βακτηρίων, εξαιτίας των εξωγενών και των ενδογενών παραγόντων που αναφέρθηκαν παραπάνω, επηρεάζουν την παραγωγή των δυνητικά ποιοτικών ή ποσοτικών δεικτών της αλλοίωσης. Συνεπώς, γίνεται ακόμα δυσκολότερη η δυνατότητα της αντικειμενικής αξιολόγησης της αλλοίωσης (Ercolini et al., 2009, Nychas et al., 2008, Nychas & Skandamis 2005, Nychas & Tassou 1997).

Έως τώρα η αξιολόγηση ενός τροφίμου για τη φρεσκότητα, την αλλοίωση και την ασφάλεια γινόταν με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους και με οργανοληπτική αξιολόγηση, μέθοδοι οι οποίες είναι χρονοβόρες, καταστρεπτικές για το δείγμα και δεν παρέχουν την «άμεση απάντηση» που απαιτεί η βιομηχανία. Έτσι, είναι κρίσιμης σημασίας να αντικατασταθούν οι κλασικές μέθοδοι με ταχύτερες και άμεσα εφαρμόσιμες μεθόδους, ακολουθώντας την αναγκαιότητα της παρακολούθησης επιτόπου της γραμμής παραγωγής (Paradouroulou et al., 2013). Συνεπώς, απαιτείται μια ολιστική προσέγγιση, όπου περισσότεροι από ένας δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα, ώστε να μειωθούν οι πληροφορίες που αφορούν την αλλοίωση και λαμβάνονται εκ των υστέρων. Η συσχέτιση μεταξύ της μικροβιακής αύξησης και των χημικών μεταβολών κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης ενός τροφίμου μπορεί να είναι χρήσιμη για την ποσοτικοποίηση του βαθμού και του ρυθμού της αλλοίωσης του τροφίμου (Nychas et al., 2007). Ο ιδανικός δείκτης (μικροβιακός μεταβολίτης) θα πρέπει να ανταποκρίνεται στα ακόλουθα κριτήρια (Jay, 1986): (i) η ουσία θα πρέπει να είναι απύσσωπη ή τουλάχιστον σε χαμηλά επίπεδα στο κρέας, (ii) η ουσία θα πρέπει να αυξάνεται με την αποθήκευση, (iii) η ουσία θα πρέπει να παράγεται από την κυρίαρχη μικροχλωρίδα και (iv) να έχει καλή συσχέτιση με τον οργανοληπτικό έλεγχο. Παρ' όλο που τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες σύνδεσης των μικροβιακών μεταβολιτών με τη μικροβιακή αλλοίωση του κρέατος, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα μία ενιαία μέθοδος για την αξιολόγηση της ποιότητας του κρέατος. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη γενικής συμφωνίας σχετικά με τη μεταβολή της ποιότητας του κρέατος και των προϊόντων του. Οι περισσότερες από τις προτεινόμενες μεθόδους είναι αργές και δίνουν πληροφορίες εκ των υστέρων και έτσι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθούν επί της γραμμής παραγωγής, ενώ οι αλλαγές στον τρόπο της

συντήρησης (π.χ., συσκευασία κενού, συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας κ.λπ.) επηρεάζουν την εφαρμογή της επιλεγμένης μεθοδολογίας (Paramithiotis et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια, διάφορες αναλυτικές τεχνικές έχουν προταθεί για την ταχεία παρακολούθηση της αλλοίωσης του κρέατος (βιοαισθητήρες, ηλεκτρονική μύτη, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας ή φασματοσκοπία μάζας με μετασχηματισμό Fourier). Μη επεμβατικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την έμμεση εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος, οι οποίες βασίζονται στις μηχανικές, οπτικές, διηλεκτρικές ή φασματοσκοπικές ιδιότητες των τροφίμων, ξεκίνησαν να ερευνούνται ως δυνητικοί δείκτες ασφάλειας και ποιότητας του κρέατος. Η κύρια αρχή αυτής της προσέγγισης βασίζεται στην παραδοχή ότι η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο κρέας προκαλεί βιοχημικές αλλαγές εξαιτίας της αύξησης μεταβολικών ουσιών οι οποίες μπορούν να είναι ενδεικτικές της αλλοίωσης. Η ποσοτικοποίηση αυτών των μεταβολικών ουσιών αποτελεί το χαρακτηριστικό αποτύπωμα κάθε βιοχημικής ουσίας και μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τον τύπο και το είδος της αλλοίωσης (Ellis & Goodacre, 2001, Nychas et al., 2008). Για παράδειγμα, στις διηλεκτρικές μεθόδους ανιχνεύονται οι μεταβολές στην αντίσταση και την αγωγιμότητα του μέσου ανάπτυξης εξαιτίας της κατανάλωσης συστατικών από τους μικροοργανισμούς κατά τη δραστηριότητά τους. Επιπλέον, στις φασματοσκοπικές μεθόδους μελετάται το φάσμα που λαμβάνεται, το οποίο απεικονίζει τη χημική σύνθεση του δείγματος. Η ενσωμάτωση των φασμάτων ή άλλων δεδομένων που προέρχονται από βιοαισθητήρες σε μία πλατφόρμα πληροφοριών για την ανάπτυξη ενός “έμπειρου συστήματος” (π.χ., αυτόματος χαρακτηρισμός της οργανοληπτικής κατηγορίας του κρέατος) με βάση τα εξαγόμενα χαρακτηριστικά μπορεί να οδηγήσει σε ένα σύστημα υποστήριξης αποφάσεων για έγκαιρο προσδιορισμό της ασφάλειας/ποιότητας των προϊόντων με βάση το κρέας, αλλά και της αποφυγής των άσκοπων οικονομικών απωλειών. Ωστόσο, λόγω της τεράστιας ποσότητας των πληροφοριών που παρέχονται από αυτές τις μεθόδους, τα δεδομένα που παράγονται καθίστανται δύσχρηστα.

Πίνακας 1.6: Παράγοντες και πρόδρομες ουσίες που επηρεάζουν την παραγωγή των δύσοσμων τελικών προϊόντων των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Moraxella* spp.) μετά από εμβολιασμό σε ζωμό, σε στείρο πρότυπο σύστημα και σε κρέας¹

Τελικό προϊόν	Κρέας και πουλερικά	Παράγοντες	Πρόδρομες ουσίες
<i>Θειώδης ουσίες</i>			
Σουλφίδια	+	Θερμοκρασία και υπόστρωμα	Κυστεΐνη, κυστίνη, μεθειονίνη
Διμεθυσουλφίδια	+		Μεθανεθειόλη, μεθειονίνη
Διμεθυλδισουλφίδια	+		Μεθειονίνη
Μεθυλομερκαπτάνη	+		-
Μεθανεθειόλη	+		Μεθειονίνη
Υδρόθειο	-/+ ^a	Υψηλό pH	Κυστεΐνη, κυστίνη
Διμεθυλτρिसουλφίδια	+	- ^γ	Μεθειονίνη, Μεθανεθειόλη
<i>Εστέρες</i>			
Μεθυλεστέρας	+	Γλυκόζη (I) ^δ	-
Αιθυλεστέρας	+	Γλυκόζη (I)	-
<i>Κετόνες</i>			
Ακετόνη	+	-	-
Βουταν-όνη	+	-	-
Ακετοΐνη/Διακετύλιο	+/- ^β	-	-
<i>Αρωματικοί υδρογονάνθρακες</i>			
Διαθυλβενζένιο	+	-	-
Τριμεθυλβενζένιο	+	-	-
Τολουόλιο	+	-	-
<i>Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες</i>			
Εξάνιο	+	-	-
2,4 διμεθυλοεξάνιο		-	-
Μεθυλοεπτάνιο	+	-	-
<i>Αλδεΐδες</i>			
2-μεθυλοβουτανάλη	+	-	Ισολευκίνη
<i>Αλκοόλες</i>			
Μεθανόλη	+		
Αιθανόλη	+	-	-
2-μεθυλοπροπανόλη	+	-	-
2-μεθυλοβουτανόλη	+	-	Βαλίνη
3-μεθυλοβουτανόλη	-		
<i>Άλλες ουσίες</i>			
Αμμωνία	+	Γλυκόζη (I)	Αμινοξέα
Τριμεθυλαμίνη	+	-	Οξειδίο τριμεθυλαμίνης

^a: Παραγωγή μόνο από το βακτήριο *Shewanella putrefaciens*.

^β: Αυτές οι ουσίες μειώθηκαν κατά την αποθήκευση.

^γ: - = δεν υπάρχουν δεδομένα

^δ: (I) χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης

¹: Τροποποίηση από Nychas et al., 2007

Πίνακας 1.7: Παράγοντες και πρόδρομες ουσίες που επηρεάζουν το μέγιστο σχηματισμό τελικών προϊόντων των γαλακτικών βακτηρίων (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Carnobacterium* spp.) μετά από εμβολιασμό σε ζωμό, σε στείρο πρότυπο σύστημα και σε κρέας¹

Τελικό προϊόν	Κρέας και πουλερικά	Παράγοντες	Πρόδρομες ουσίες
<i>Ομοζυμωτικά στελέχη - αερόβια συντήρηση</i>			
L-γαλακτικό οξύ	+	- ^a	Γλυκόζη
D-γαλακτικό οξύ	+	-	Γλυκόζη
Οξικό οξύ	+	Γλυκόζη (I ^β), O ₂ (h ^γ), E ^δ	γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ
Ακετοΐνη/Διακετύλιο	+	pH (I), Γλυκόζη (h)	Πυροσταφυλικό οξύ
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	+	-	-
Μυρμηκικό οξύ	+	-	Γλυκόζη, οξικό οξύ
Αιθανόλη	+	-	Γλυκόζη
<i>Ομοζυμωτικά στελέχη - διάφορες συνθήκες ατμόσφαιρα</i>			
L-γαλακτικό οξύ	+	-	Γλυκόζη
D-γαλακτικό οξύ	+	-	Γλυκόζη
Οξικό οξύ	+	Γλυκόζη (I), O ₂ (h), E	γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ
Ακετοΐνη	+	pH (I)	Πυροσταφυλικό οξύ
Μυρμηκικό οξύ	+	-	Γλυκόζη, οξικό οξύ
Αιθανόλη	+	-	-

^a :- = δεν υπάρχουν δεδομένα

^β : (I), χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης

^γ : (h), υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου;

^δ : E, απαραίτητα ένζυμα (iLDH, NADH υπεροξειδάση, γαλακτική ή πυροσταφυλική οξειδάση)

¹: Τροποποίηση από Nychas et al., 2007

Η εφαρμογή προηγμένων πολυμεταβλητών στατιστικών μεθόδων όπως διακριτική ανάλυση (Discriminant Analysis, DA), παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression), αλγόριθμοι ομαδοποίησης (Clustering Algorithms) και ευφύων μεθοδολογιών όπως τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANNs), ασαφής λογική (Fuzzy Logic), εξελικτικοί αλγόριθμοι (Evolutionary Algorithms) και γενετικός προγραμματισμός (Genetic Programming) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην αξιολόγηση της αλλοίωσης του κρέατος (Argyri et al., 2010b, Paramithiotis et al., 2009). Επιπλέον, η ανάπτυξη υπολογιστικών πλατφορμών έρευνας και η απευθείας σύνδεση σε βάσεις πειραματικών δεδομένων, όπως είναι η Combase (Baranyi & Tamplin, 2004) και η Sym'Previs (Lerouq et al., 2005), δίνουν στους επιστήμονες με γρήγορο και αποτελεσματικό τρόπο την παροχή, αποθήκευση και ανταλλαγή γνώσεων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.8) παρουσιάζονται ουσίες οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό, την πρόβλεψη ή την εκτίμηση της ποιότητας του κρέατος.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν ταχείες αναλυτικές τεχνικές για την αξιολόγηση του δυναμικού της αλλοίωσης του κρέατος. Αναλυτικές τεχνικές όπως φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, ηλεκτρονική μύτη, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας καθώς και μοριακές τεχνικές, όπως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου.

Πιο συγκεκριμένα, η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και της βιομηχανίας τροφίμων, δεδομένου ότι είναι ταχεία, μη καταστρεπτική τεχνική που δεν απαιτεί κάποιο αντιδραστήριο ή αναλώσιμο, ενώ οι χρήστες μπορούν να συλλέξουν το φάσμα μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την ταυτόχρονη αξιολόγηση των πολλών ιδιοτήτων του κρέατος (Al-Jowder et al., 1997, Argyri et al., 2010b, 2013, Ellis and Goodacre, 2001, Ellis et al., 2004, van de Voort, 1992). Το FTIR έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς μέχρι σήμερα στη βιομηχανία τροφίμων για την αντιμετώπιση της νοθείας και της προέλευσης διαφόρων τροφίμων, όπως ελαιόλαδο, προϊόντα φρούτων, καφές, μέλι, κρασί ή βόειο κρέας (Ammor et al., 2009). Επιπλέον, έρευνες έχουν γίνει για τη διάκριση αποψυγμένων ψαριών από φρέσκα δείγματα ψαριών, τη μελέτη της μικροβιακής αλλοίωσης βόειου και χοιρινού

κρέατος ή πουλερικών με τη χρήση του FTIR. Πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρουν συσχέτιση της μικροβιακής αλλοίωσης (μικροβιακοί πληθυσμοί και οργανοληπτική αξιολόγηση) που συντηρούνται υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας με τα δακτυλικά αποτυπώματα που λαμβάνονται με το FTIR (Argyri et al., 2013, Papadopoulou et al., 2011).

Πίνακας 1.8: Ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό, την πρόβλεψη ή την εκτίμηση της ποιότητας του κρέατος^α

Ουσία	Μέθοδος	Συνθήκες συσκευασίας
Ουσίες χαμηλού μ.β. (γλυκόζη, οξικό, γαλακτικό οξύ)	Ενζυμικά, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	Αέρας, κενό, MAP
Αιθανόλη	Ενζυμικά, αέρια χρωματογραφία	Κενό, MAP
Αμμωνία	Ενζυμικά, χρωματομετρικά	Αέρας
Μεθυλοακετόνη	Αέρια χρωματογραφία	Κενό, MAP
Αιθυλοκετόνη	Αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας	
Διμεθυλσουλφίδιο		
Διμεθυλοδισουλφίδιο	Εκλεκτικός αισθητήρας θείου	
Υδρόθειο		
Διακετύλιο, ακετοΐνη	Χρωματομετρικά	Κενό, MAP
Βιογενής αμίνες	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αισθητήρες, αέρια χρωματογραφία, test strips	Αέρας, κενό, MAP
Διαμίνες	Ενζυμικά συστήματα	Αέρας
Μικροβιακή δραστηριότητα	Ενζυμικά συστήματα	Αέρας
Πτητικά	Ηλεκτρονική μύτη	Αέρας, κενό, MAP
Πρωτεόλυση (αμίδια, αμίνες κλ.π)	FTIR/ υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης / Ηλεκτροφόρηση	Αέρας, κενό, MAP, «έξυπνη» συσκευασία

^α: Πίνακας από Paramithiotis et al., 2009

Η ηλεκτρονική μύτη είναι ένα όργανο τα οποίο αποτελείται από μια σειρά ηλεκτρονικών χημικών αισθητήρων με μερική επιλεκτικότητα και σε συνδυασμό με ένα κατάλληλο πρότυπο σύστημα αναγνώρισης επιτρέπουν την αναγνώριση απλών ή σύνθετων πτητικών προϊόντων (Gardner & Bartlett, 1994). Τα όργανα αυτά, είναι χρήσιμα σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, όπως (i) στον έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας, (ii) στον καθορισμό της διάρκειας ζωής του τροφίμου, (iii) στην εκτίμηση της αλλοίωσης, (iv) στον έλεγχο της νοθείας και (v) στον ποιοτικό έλεγχο (Peris & Escuder-Gilabert, 2009). Την τελευταία δεκαετία η ηλεκτρονική μύτη άρχισε να χρησιμοποιείται σε βιομηχανίες τροφίμων με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας, καθώς είναι κατάλληλο όργανο για επιτόπου εφαρμογή στη γραμμή παραγωγής, παρέχει ταχεία ανάλυση, απαιτεί ελάχιστη προεργασία του δείγματος και επιπλέον δεν χρειάζεται κάποιο ειδικό αντιδραστήριο. Η αλληλεπίδραση των πτητικών ουσιών του δείγματος με τους αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης προκαλεί αλλαγές στην ηλεκτρική αντίσταση του αισθητήρα και δεδομένου ότι η κινητική του αισθητήρα είναι διαφορετική, τα δεδομένα που παράγονται από τους αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης παρέχουν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο σήμα του μείγματος των πτητικών ουσιών που βρίσκονται στον υπερκείμενο χώρο του προς εξέταση δείγματος και μπορούν να μετατραπούν σε ένα πτητικό δακτυλικό αποτύπωμα το οποίο στη συνέχεια αξιολογείται χρησιμοποιώντας κατάλληλες τεχνικές ανάλυσης δεδομένων (Berna et al., 2004, Jurs et al., 2000, Panagou et al., 2008). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ηλεκτρονική μύτη δεν παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με συγκεκριμένες ενώσεις που ευρίσκονται στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος, όπως συμβαίνει με άλλες αναλυτικές τεχνικές (π.χ., GC/MS). Αντίθετα, βασίζεται σε μια ολιστική προσέγγιση, παρέχοντας το «ηλεκτρονικό πτητικό δακτυλικό αποτύπωμα», το οποίο είναι χαρακτηριστικό του κάθε τροφίμου, σε μια δεδομένη χρονική στιγμή (O'Sullivan et al., 2003). Υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία που τεκμηριώνουν τις δυνατότητες της ηλεκτρονικής μύτης σε εφαρμογές στα τρόφιμα, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν την ταξινόμηση των φυτικών ελαίων (Gan et al., 2005), τον έλεγχο της ποιότητας του ελαιόλαδου (Cosio et al., 2007), τη διάκριση των οίνων (Burrati et al., 2007, Penza & Cassano, 2004), τον προσδιορισμό της φρεσκότητας των ψαριών (Di Natale et al., 2001, Olafsdottir et al., 2005), την αξιολόγηση της ποιότητας του κρέατος (Balasubramanian et al., 2009, Rajamaki et al., 2006, Wang et al., 2012), την αξιολόγηση

της ποιότητας των σιτηρών (Magan & Evans, 2000), τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής (Benedetti et al., 2005, Berna et al., 2004, Hernandez et al., 2007) καθώς και την αξιολόγηση της ποιότητας διάφορων τροφίμων (Concina et al., 2009, Panagou et al., 2008).

Διάφοροι πτητικοί ή όχι μικροβιακοί μεταβολίτες έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα κρέατος (π.χ., βόειο, χοιρινό, κοτόπουλο ή προϊόντα με βάση το κρέας) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αέρια χρωματογραφία, και αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (Argyri et al., 2011). Τα πιο κοινά τελικά προϊόντα της γλυκολυτικής οδού είναι το γαλακτικό, το κιτρικό, το μυρμηκικό, το οξικό, το γλυκονικό, το προπιονικό και το ηλεκτρικό οξύ (Dainty, 1996, Nychas et al., 2008). Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για την παρακολούθηση των αλλαγών στον προφίλ των οργανικών οξέων σε κρέας και σε προϊόντα με βάση το κρέας, που συντηρούνται υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας, έχει θεωρηθεί ως μια απλή και πολλά υποσχόμενη μέθοδος (Mataragas et al., 2007, Tsigarida et al., 2003). Οι Nychas και Tassou (1997), μελέτησαν τις αλλαγές στο προφίλ των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών σε κοτόπουλο το οποίο συντηρούνταν αερόβια, υπό κενό και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Οι Bosseli et al. (2008), ασχολήθηκαν με τον προσδιορισμό των φωσφολιπιδίων και τη σύσταση των λιπαρών οξέων ωμού και μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος, ενώ οι Skandamis και Nychas (2001, 2002), μελέτησαν το προφίλ των οργανικών οξέων σε δείγματα βόειου κρέατος και βόειου κιμά τα οποία είχαν συντηρηθεί υπό διάφορες συνθήκες συσκευασίας και θερμοκρασίας με ή χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης. Τέλος, οι Argyri et al. (2011), χρησιμοποίησαν τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση του προφίλ των οργανικών οξέων μέσω της HPLC από βόειο κιμά συντηρημένο υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας, σε συνδυασμό με πολυμεταβλητές στατιστικές μεθόδους σε μία προσπάθεια διάκρισης της ποιοτικής κατηγορίας του κρέατος και της εκτίμησης του πληθυσμού της κάθε βακτηριακής ομάδας ξεχωριστά (ολική μεσόφιλη χλωρίδα, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια, *Enterobacteriaceae* και ζύμες/μύκητες). Η αέρια χρωματογραφία ή η αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των πτητικών ουσιών σε βόειο κρέας με τη φυσική του μικροχλωρίδα και σε εμβολιασμένο βόειο κρέας που συντηρείται αερόβια, σε συνθήκες τροποποιημένης

ατμόσφαιρας ή υπό κενό (Dainty et al., 1989a, Ercolini et al., 2009, Jackson et al., 1992, Stutz et al., 1991), σε κοτόπουλο που συντηρείται υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Rajamaki et al., 2006) και σε βραστό ζαμπόν που συντηρήθηκε υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Leroy et al., 2009). Επιπλέον, η GC/MS χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηρίσει διαφορετικά είδη κρέατος (χοιρινό κρέας, πάπια, χήνα), να αξιολογήσει τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά και να τα κατατάξει ανάλογα με την ποιότητά τους χωρίς την επακόλουθη συντήρησή τους (Soncin et al., 2007). Τέλος, έχει μελετηθεί το πτητικό προφίλ διάφορων ειδών νωπών ή μεταποιημένων κρεάτων (μοσχάρι, χοιρινό ή κοτόπουλο) ώστε να αξιολογηθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους (Rivas-Cañedo et al., 2009, Wettasinghe et al., 2001, Xie et al., 2008).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια γρήγορη, ακριβής, ευαίσθητη και εύκολη τεχνική. Η PCR πολλαπλασιάζει ένα δισεκατομμύριο φορές μία επιλεγμένη περιοχή του γονιδιώματος, απομονώνοντας και καθαρίζοντας το κομμάτι του DNA που πρέπει να εξεταστεί (Vandamme et al., 1996). Με την PCR μπορεί να γίνει διάκριση ανάμεσα σε είδος ή ακόμα και σε επίπεδο στελέχους μικροοργανισμών, ανάλογα με τις συνθήκες λειτουργίας της PCR, δηλαδή την επιλογή του εκκινητή και τις συνθήκες της ενίσχυσης (annealing) της PCR (Doulgeraki et al., 2012). Η επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Rep-PCR) έχει χρησιμοποιηθεί για να γίνει διάκριση μεταξύ στενά συγγενικών ειδών (Gevers et al., 2001), για τον χαρακτηρισμό της αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας βραστού ζαμπόν (Vasilopoulos et al., 2008, 2010), για την ταυτοποίηση στελεχών του *Staphylococcus xylosus* από ζυμούμενα λουκάνικα (Iacumin et al., 2006), για τον χαρακτηρισμό των *Brochothrix* spp. που απομονώθηκαν από φρέσκο κρέας, πουλερικά και ψάρι (Xu et al., 2010) και, τέλος, για ταυτοποίηση των *Brochothrix* spp. που απομονώθηκαν από χοιρινό κιμά συσκευασμένο υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας (Papadopoulou et al., 2012). Η δεύτερη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε, η Sau-PCR, βασίζεται στην πέψη του συνολικού γονιδιώματος από μία ενδονουκλεάση περιορισμού, τη *Sau3A*, δημιουργώντας πολυάριθμα μικρά τμήματα του γονιδιώματος, έτσι ώστε οι θέσεις «στόχου» είναι ευκολότερα προσβάσιμοι στους επιλεγμένους εκκινητές (Corich et al., 2005). Η Sau-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση στελεχών του *Staphylococcus xylosus* από ζυμούμενα λουκάνικα (Iacumin et al., 2006), την ταυτοποίηση γαλακτικών βακτηρίων (Corich et al., 2005), την ταυτοποίηση

στελεχών της *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκε από τρόφιμα, περιβάλλον και ζώα (Cocolin et al., 2004) όπως και ταυτοποίηση των *Brochothrix* spp. που απομονώθηκαν από χοιρινό κιμά συσκευασμένο υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας (Papadopoulou et al., 2012).

Τέλος, η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) αποτελεί μία από τις μοριακές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί την τελευταία δεκαετία για τον προσδιορισμό και την ταξινόμηση των βακτηρίων σε επίπεδο στελέχους. Η PFGE καθιστά εφικτή τη δυνατότητα να διαχωριστούν ακόμη και εξαιρετικά μεγάλα μόρια DNA έπειτα από την πέψη του συνολικού DNA του γονιδιώματος με σπάνιες ενδονουκλεάσες περιορισμού (Tenover et al., 1995). Αυτή η τεχνική θεωρείται το χρυσό πρότυπο (gold standard) για το χαρακτηρισμό των στελεχών, δεδομένου ότι είναι πολύ ακριβής και τα αποτελέσματά της είναι αξιόπιστα και αναπαράξιμα (Doulgeraki et al., 2011). Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μελών πολλών γενών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των *Lactococcus*, *Clostridia*, *Streptomyces* και προβιοτικών γαλακτοβάκιλλους. Επιπλέον, η PFGE σε συνδυασμό με την κατάλληλη μέθοδο της PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο στελεχών (Doulgeraki et al., 2010b).

1.5. Στόχοι της μελέτης

Ο γενικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της αλλοίωσης του κρέατος με διαφορετικές ταχείες τεχνικές ανάλυσης. Η μικροβιολογική εξέλιξη της χλωρίδας του κρέατος παρακολουθούνταν παράλληλα με το μεταβολικό της προφίλ. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα, που αφορούσε αλλοίωση χοιρινού κιμά σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες και δύο συσκευασίες, εφαρμόστηκαν ποικίλες ταχείες αναλυτικές τεχνικές με σκοπό να διερευνηθεί η δυναμική τους στην ποσοτικοποίηση των δεικτών αλλοίωσης. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν ποίκιλα μαθηματικά μοντέλα με σκοπό την πρόβλεψη της ποιοτικής κατηγορίας που είχε χαρακτηριστεί το κρέας και της εκτίμησης του πληθυσμού των μικροβιακών ομάδων που εξετάστηκαν. Στο δεύτερο πείραμα έγινε εμβολιασμός στείρου ιστού κρέατος με επιλεγμένους μικροοργανισμούς σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες και

δύο συσκευασίες, με σκοπό τη μελέτη των μεταβολικών προϊόντων που παράγονται κατά τη συντήρηση του κρέατος.

Οι αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), ηλεκτρονική μύτη (Libra Nose), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεής φάσης (HP/SPME, GC/MS), και διάφορες μοριακές τεχνικές (Rep-PCR, Sau-PCR και PFGE).

Όσον αφορά το πρώτο πείραμα, δείγματα χοιρινού κιμά (από τοπικό κρεοπωλείο) αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και συσκευασίες μέχρι την έντονη αλλοίωση τους. Ειδικότερα, δείγματα χοιρινού κιμά συντηρήθηκαν αερόβια και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (60%CO₂/ 20%O₂/ 20%N₂) σε 5 θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15 και 20°C). Έγιναν μικροβιολογικές, οργανοληπτικές καθώς και βιοχημικές αναλύσεις.

i) Τα δείγματα κρέατος χρησιμοποιήθηκαν αρχικά σε μία προσπάθεια να αξιολογηθούν οι δυνατότητες του FTIR ως μία γρήγορη, μη καταστρεπτική αναλυτική τεχνική για την εκτίμηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής του κρέατος. Έτσι, τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από το FTIR συγκρίθηκαν με τις μικροβιολογικές και οργανοληπτικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας διαφορετικές μαθηματικές προσεγγίσεις (διαφορετικά μαθηματικά μοντέλα), όπως η μέθοδος Παλινδρόμησης και Διακριτική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων.

ii) Ακολούθως, η χρήση ηλεκτρονικής μύτης εξετάστηκε ως μία ταχεία μη καταστρεπτική μέθοδος στα προηγούμενα δείγματα στις ίδιες χρονικές σειρές δειγματοληψίας. Συλλέχθηκαν δεδομένα από τις αποκρίσεις των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης και συγκρίθηκαν με τα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά δεδομένα του κρέατος χρησιμοποιώντας μαθηματικά μοντέλα όπως η Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων και οι Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης (Support vector machines, SVM).

iii) Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για την ανάλυση των οργανικών οξέων του κρέατος. Παρομοίως, αναλύθηκαν δείγματα κρέατος από τις ίδιες χρονικές σειρές της δειγματοληψίας για τις περιπτώσεις του χοιρινού κιμά για την καταγραφή των μεταβολών στο προφίλ των οργανικών οξέων. Τα

αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρωματογραφία συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των μικροβιολογικών και οργανοληπτικών δεδομένων σε μία προσπάθεια ανίχνευσης των μικροβιακών δεικτών και πιθανής συσχέτισης με τις διάφορες ομάδες μικροοργανισμών καθώς και της εξέλιξης της αλλοίωσης του κρέατος υπό διαφορετικές συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι όπως η Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων και οι Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης.

iv) Χρησιμοποιήθηκε η αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεής φάσης σε δείγματα κρέατος από τις ίδιες χρονικές σειρές της δειγματοληψίας για τις περιπτώσεις του χοιρινού κιμά για την καταγραφή των μεταβολών στο πτητικό προφίλ του κρέατος. Τα δεδομένα αξιολογήθηκαν με Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων και με τη μέθοδο Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων Γραμμικής Παλινδρόμησης.

v) Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μοριακές τεχνικές, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων παλίνδρομων αλληλουχιών (Repetitive Extragenic Palindromic, Rep-PCR), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ενδονουκλεάση περιορισμού *Sau3A* (*Sau*-PCR) και η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) σε μία προσπάθεια μελέτης της διαφοροποίησης των επιλεγμένων απομονώσεων σε επίπεδο στελέχους του *Brochothrix* spp. από τον χοιρινό κιμά κατά τη διάρκεια της συντήρησής του σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (0, 5, 10 και 15 °C) και συσκευασίας (αερόβιες συνθήκες και συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας). Η ικανότητα αυτών των μεθόδων, για χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών σε υποείδος ή σε επίπεδο στελέχους, βασίζεται σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος ως εκ τούτου μπορούν να προκύψουν διαφορετικά αποτελέσματα εξαιτίας του διαφορετικού βαθμού διακριτικής ικανότητας της κάθε μοριακής μεθόδου.

Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε στείρος ιστός κρέατος που παρελήφθη από μηρό χοιρινού σφάγιου. Το κρέας συντηρήθηκε στους 4 και στους 10°C αερόβια και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (80% O₂/20% CO₂) μέχρι την έντονη αλλοίωση του, αφού προηγουμένως είχε εμβολιαστεί με μονοκαλλιέργειες ή/και μείγματα καλλιιεργειών επιλεγμένων μικροοργανισμών (*Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus sakei* και *Leuconostoc mesenteroides*). Σκοπός του πειράματος ήταν ο

προσδιορισμός των μεταβολικών προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης από επιλεγμένους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς με αντικειμενικό σκοπό την ταυτοποίησή τους και κατόπιν την πιθανή χρήση τους σαν γρήγορους δείκτες ποιότητας. Έτσι, ταυτόχρονα με τη μελέτη της μικροβιολογικής εξέλιξης της χλωρίδας του κρέατος, μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ του κρέατος με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης και χρησιμοποιήθηκαν πολυμεταβλητές στατιστικές μέθοδοι (Διακριτική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων, Ανάλυση της Διακύμανσης ενός παράγοντα) ώστε να βρεθούν συσχετισμοί μεταξύ των παραγόμενων πτητικών ουσιών και το είδος του μικροοργανισμού ή με το οργανοληπτικό προφίλ του κρέατος.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Μικροβιολογικές Αναλύσεις

2.1.1. Προετοιμασία δείγματος

i) Μελέτη της αλλοίωσης χοιρινού κιμά συσκευασμένου σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15, και 20°C

Φρέσκος Ελληνικής προέλευσης χοιρινός κιμάς (*Biceps femoris*, pH 5,6–5,8) από διαφορετικά σφάγια λήφθηκε αμέσως μετά την άλεση του από τοπικό κρεοπωλείο της Αθήνας και μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο εργαστήριο εντός 30 λεπτών. Μετά την παραλαβή του, ο κιμάς χωρίστηκε σε μερίδες των 100 γραμμαρίων και συσκευάστηκε σε αερόβιες συνθήκες και σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Στην αερόβια συσκευασία, το δείγμα τοποθετήθηκε σε δίσκους από πολυστυρένιο και περιτυλίχθηκε με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου οικιακής χρήσης διαπερατή στο οξυγόνο. Ο βασικός στόχος της παραπάνω διαδικασίας ήταν η προσομοίωση των συσκευασμένων μερίδων κιμά με τις αντίστοιχες που είναι διαθέσιμες στα καταστήματα λιανικής πώλησης. Η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, αποτελείτο από 60% CO₂, 20% O₂ και 20% N₂. Κατά τη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα τα δείγματα συσκευάστηκαν ατομικά σε πλαστικούς περιέκτες διαστάσεων 240mm μήκος, 200mm πλάτος και 90mm ύψος, με διαπερατότητα στα αέρια σε θερμοκρασία 20°C και 50 % σχετική υγρασία περίπου 25, 90, και 6cm³/m² ανά ημέρα/ 10⁵Pa για CO₂, O₂ και N₂ αντίστοιχα (δεδομένα από την εταιρεία, Flexopack S.A., Greece). Η διαδικασία συσκευασίας περιλάμβανε 3 διαδοχικά στάδια στο κλειστικό μηχάνημα HencoVac 1900 (Howden Food Equipment B.V., The Netherlands) του εργαστηρίου: (α) εκκένωση του περιέκτη από τον περιεχόμενο αέρα, (β) διοχέτευση (flashing) του μίγματος τροποποιημένων ατμοσφαιρών σε όγκο 3 λίτρα και (γ) διπλή θερμοκόλληση των περιεκτών. Η αναλογία δείγματος προς όγκο αέριας ατμόσφαιρας της συσκευασίας ήταν κατά μέσο όρο 1:3. Κατόπιν, τα δείγματα συντηρήθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) σταθερής θερμοκρασίας (±0.5°C) σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15 και 20°C) μέχρι την έντονη αλλοίωση του προϊόντος.

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Από κάθε δείγμα ζυγίζονταν ασηπτικά 25 g σε σακούλα Stomacher, προσθέτονταν σε 225ml ορού Ringer (LAB100Z, LAB M, UK) και ομογενοποιούνταν για 60sec, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London). Ακολουθούσε παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1ml δείγματος προηγούμενης αραιώσης σε 9ml ορού Ringer. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών γινόταν για Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), *Pseudomonas* spp, *Brochothrix thermosphacta*, Ζύμες και Μύκητες, *Enterobacteriaceae*, και γαλακτικά βακτήρια ενώ παράλληλα γινόταν οργανοληπτικός έλεγχος (κεφ.: 2.3) και καταγραφή του pH (κεφ.: 2.2.1). Συγχρόνως, δείγματα από όλες τις περιπτώσεις αναλύθηκαν με τις τεχνικές Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (κεφ.: 2.2.2), Ηλεκτρονικής Μύτης (κεφ. 2.2.3), Φασματοσκοπία Μάζας με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infra-Red, FT-IR, κεφ.:2.2.4.), αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (HS/SPME, GC/MS, κεφ.: 2.2.5). Τέλος, μελετήθηκε και ταυτοποιήθηκε η εξέλιξη της μικροχλωρίδας του *Brochothrix thermosphacta* κατά τη την αλλοίωση του κρέατος με μοριακές τεχνικές όπως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων παλίνδρομων αλληλουχιών (Repetitive Extragenic Palindromic, Rep-PCR, κεφ.:2.6.4), Sau-PCR (κεφ.:2.6.5) και ηλεκτροφόρηση πηκτής σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE, κεφ.:2.6.2).

ii) Μελέτη της εξέλιξης της μικροχλωρίδας και των μεταβολικών προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης στείρου ιστού χοιρινού κρέατος εμβολιασμένου με επιλεγμένα στελέχη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών συσκευασμένου σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4 και στους 10°C

2.1.1.2. Προετοιμασία στείρου ιστού κρέατος

Η συμπεριφορά των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών μελετήθηκε σε στείρο ιστό κρέατος. Για την παρασκευή στείρου ιστού κρέατος χρησιμοποιήθηκε μηρός

χοιρινού σφάγιου. Γενικά, από ένα τεμάχιο συνολικού βάρους περίπου 10 κιλών λαμβάνονταν περίπου 160 στείρα φιλέτα των 50g. Η διαδικασία παρασκευής φιλέτων στείρου κρέατος ήταν η εξής: Αρχικά, το τεμάχιο ψεκάστηκε εξωτερικά με οινόπνευμα και πυρακτώθηκε με τη βοήθεια λύχνου Bunsen, ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα επιμόλυνσης. Εντός θαλάμου νηματικής ροής, απομακρύνθηκε η εξωτερική στρώση του κρέατος με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας και νυστεριού. Στη συνέχεια, η εσωτερική στείρα μάζα του κρέατος κόπηκε σε φιλέτα ίσης επιφάνειας και εμβολιάστηκε με την απαραίτητη ποσότητα ενοφθαλμίσματος. Κατόπιν, τα φιλέτα συσκευάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες και σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Στην αερόβια συσκευασία, το δείγμα τοποθετήθηκε σε τρυβλίο. Η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, αποτελείτο από 80% O₂ και 20% CO₂. Κατά τη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα τα δείγματα συσκευάστηκαν ατομικά σε τρυβλία και κατόπιν σε πλαστικούς περιέκτες με την ίδια διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω. Στη συνέχεια, τα δείγματα συντηρήθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) σταθερής θερμοκρασίας ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες (4 και 10°C) μέχρι την έντονη αλλοίωση του προϊόντος. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Το κάθε δείγμα ζυγίζονταν ασηπτικά σε σακούλα Stomacher, προσθέτοντας 50ml ορού Ringer (LAB100Z, LAB M, UK) και ομογενοποιούνταν για 60sec, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London). Ακολουθούσε παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1ml δείγματος προηγούμενης αραιώσης σε 9ml ορού Ringer. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών γινόταν για OMX (έλεγχος για τυχόν επιμολύνσεις), *Pseudomonas* spp, γαλακτικά βακτήρια και περιστασιακά γινόταν έλεγχος για τυχόν επιμολύνσεις σε υποστρώματα κατάλληλα για την ανάπτυξη των *Brochothrix thermosphacta*, Ζυμών και Μυκήτων και των *Enterobacteriaceae*. Παράλληλα γινόταν οργανοληπτικός έλεγχος (κεφ.: 2.3) και καταγραφή του pH (κεφ.: 2.2.1). Συγχρόνως, δείγματα από όλες τις περιπτώσεις αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (HS/SPME, GC/MS, κεφ.: 2.2.5)

2.1.1.3. Παρασκευή εμβολίου και διαδικασία εμβολιασμού

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα εμβολιασμού ήταν αλλοιωγόνοι οι οποίοι είχαν απομονωθεί από προηγούμενα πειράματα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και συγχρόνως είχαν ταυτοποιηθεί με αλληλούχιση της περιοχής 16S rRNA. Οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν ήταν οι *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus sakei* και *Leuconostoc mesenteroides*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί επιλέχθηκαν εξαιτίας της αλλοιωγόνου δράσης τους στο κρέας. Οι *P. fragi* και *P. putida* βρίσκονται μεταξύ των πιο σημαντικών ειδών της αλλοίωσης του κρέατος (Doulgeraki and Nychas, 2013, Ercolini et al., 2007). Αντίστοιχα, τα είδη *Leuconostoc* spp. και *Lactobacillus sakei* έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση κρέατος που είναι συσκευασμένο σε κενό ή σε MAP και συντηρείται σε θερμοκρασίες ψύξης (Doulgeraki et al., 2010b, Ercolini et al., 2006).

Οι καλλιέργειες *L. sakei*, *Ln. mesenteroides* και *Pseudomonas* spp. ανανεώθηκαν δύο φορές σε 100ml MRS broth (Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) και σε 100ml Nutrient broth (Merck, 1.05443) και επώαστηκαν σε θερμοκρασίες 30°C και 25°C για 18 ώρες, αντίστοιχα. Μετά την τελευταία ανανέωση της καλλιέργειας ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000rpm/min σε θερμοκρασία 4°C για 10 λεπτά. Έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ακολούθησε πλύση του ιζήματος με αποστειρωμένο διάλυμα φυσιολογικού ορού (Ringer), καλή ανάδευση για να γίνει επαναιώρηση του ιζήματος και επανάληψη της φυγοκέντρησης για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα. Ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων με κατάλληλο όγκο Ringer, ώστε να δώσει την επιθυμητή, για κάθε περίπτωση, ποσότητα εμβολίου ανά cm² κρέατος. Συγκεκριμένα ο εμβολιασμός των στείρων φιλέτων κρέατος με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς έγινε με εμβάπτιση σε κατάλληλο όγκο διαλύματος εμβολίου δίνοντας περίπου 2 log CFU/cm². Μελετήθηκαν οι εξής περιπτώσεις εμβολιασμών:

- i) *P. fragi*
- ii) *P. putida*

- iii) *L. sakei*
- iv) *L. mesenteroides*
- v) *P. fragi* και *P. putida*
- vi) *L. sakei* και *L. mesenteroides*
- vii) *P. fragi*, *P. putida*, *L. sakei* και *L. mesenteroides*

Επίσης, ταυτόχρονα επώστηκαν δείγματα στείρου μη εμβολιασμένου ιστού κρέατος για έλεγχο τυχών επιμολύνσεων για όλες τις σειρές δειγματοληψίας του πειράματος.

2.1.2. Δειγματοληψία

Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος, παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις 0,1 και 1ml και δείγμα από την κατάλληλη διαδοχική αραιώση ενοφθαλμίστηκε με τη μέθοδο της επίστρωσης ή ενσωμάτωσης για την απαρίθμηση των ακόλουθων μικροοργανισμών:

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX): σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptic Glucose Yeast Agar (TGYA; Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) το οποίο επώστηκε σε θερμοκρασία 30°C για 2 έως 3 ημέρες.

Pseudomonas spp: στο εκλεκτικό υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base (Oxoid, Basingstoke, UK), με την προσθήκη των αντιβιοτικών Ceftriaxone-Fusidic Acid-Cephalexin (C.F.C., Oxoid, Basingstoke, UK) το οποίο επώστηκε σε θερμοκρασία 25°C για 2 έως 3 ημέρες.

Brochothrix thermosphacta: στο επιλεκτικό υπόστρωμα Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base (STAA; Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) με τη προσθήκη αντιβιοτικού (4240052, Biolife, Milan, Italy) το οποίο επώστηκε σε θερμοκρασία 25°C για 2 έως 3 ημέρες.

Ζύμες & Μύκητες: στο εκλεκτικό υπόστρωμα Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (LAB 36, LAB M, UK) με προσθήκη Chloramphenicol (X009, LAB M, UK) το οποίο επώαστηκε σε θερμοκρασία 25°C για 2 έως 5 ημέρες.

Enterobacteriaceae: στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) το οποίο επώαστηκε σε θερμοκρασία 37°C για 18 έως 24 ώρες.

Γαλακτικά βακτήρια: στο επιλεκτικό υπόστρωμα de Man, Rogosa και Sharpe's (Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) με ρύθμιση της τιμής του pH στο 5,7 το οποίο επώαστηκε σε θερμοκρασία 25°C για 3 έως 5 ημέρες.

Τρεις επαναλήψεις από τουλάχιστον τρεις αραιώσεις καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Όλα τα τρυβλία εξετάσθηκαν οπτικά για τυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών για κάθε υπόστρωμα. Επιπλέον, η επιλεκτικότητα του κάθε υποστρώματος ελέγχθηκε σε διαδικασία ρουτίνας με δοκιμές χρώσης Gram και χρήση μικροσκοπίου για τυχαία επιλεγμένες αποικίες από όλα τα υποστρώματα.

2.2. Φυσικοχημικές Αναλύσεις

2.2.1. Προσδιορισμός pH

Σε κάθε δείγμα τροφίμου μετρήθηκε η τιμή του pH (Metrohm 691 pH meter) με εμφύσηση του ηλεκτροδίου στο ομογενοποιημένο δείγμα μετά το τέλος της μικροβιολογικής ανάλυσης.

2.2.2. Προσδιορισμός οργανικών οξέων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

2.2.2.1. Προετοιμασία δείγματος

Η ανάλυση των οργανικών οξέων των δειγμάτων κιμά έγινε με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Συνολικά, 84 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 81 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C αντίστοιχα αναλύθηκαν εις διπλούν από τα ίδια χρονικά σημεία όπως και στις μικροβιακές αναλύσεις.

Για την παρασκευή των δειγμάτων για την χρωματογραφική ανάλυση, δείγματα 2g κρέατος ομογενοποιήθηκαν χειρωνακτικά μέσα σε σωλήνες τύπου Falcon (Biorad) με υάλινη ράβδο σε 4ml δις απιονισμένου νερού, για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C στις 9000rpm/min για 5 λεπτά. Από την υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε 1ml σε φιαλίδιο τύπου erpendorf και προστέθηκε 20μl από 1% διαλύματος αζωτούχου νατρίου (sodium azide) το οποίο δρα ως συντηρητικό και 20μl πυκνού διαλύματος τρι-φθορο-οξικού οξέος (TFA) για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του δείγματος. Κατόπιν, ακολούθησε ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στις 9000rpm/min για 5 λεπτά. Η υπερκείμενη φάση λήφθηκε με τη βοήθεια φίλτρων διαμέτρου 0.22μm (Millipore).

2.2.2.2. Ανάλυση δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η ανάλυση των δειγμάτων κρέατος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Nychas & Skandamis (2001). Ο χρωματογράφος HPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Jasco (Japan) και αποτελείτο από μία παλινδρομική αντλία (model PU-980 Intelligent pump), μία μονάδα τριπλής βαθμίδας (Model LG-980-02 ternary gradient unit) και έναν ανιχνευτή μεταβλητού μήκους κύματος (MD-910 multiwavelength detector). Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος ήταν συνδεδεμένη με υποδοχή όγκου 20μl (loop) και το δείγμα εισαγόταν με μικροσύριγγα μέσω ελαστικού διαφράγματος. Το δείγμα εκλούστηκε ισοκρατικά με τη βοήθεια διαλύτηθειϊκού οξέος σταθερής σύστασης (διάλυμα 0,009N H₂SO₄). Για την παρασκευή του διαλύτη έκλουσης χρησιμοποιήθηκε δις απιονισμένο νερό. Ο διαχωρισμός του δείγματος έγινε μέσω στήλης τύπου Amminex HPX-87H (300 x 7,8mm - Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) με ταχύτητα ροής 0,7ml/min. Η στήλη ήταν τοποθετημένη μέσα σε θερμικό θάλαμο

(φούρνος) ώστε να λειτουργεί σε σταθερή θερμοκρασία στους 65°C. Το δείγμα κατά την έξοδο του από τη στήλη περνούσε από ανιχνευτή απορρόφησης με φίλτρο στη υπεριώδη και στη ορατή περιοχή. Ο ανιχνευτής UV/VIS μεταβλητού μήκους κύματος μετρούσε στο εύρος 200-600nm. Το μήκος κύματος που επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό των οργανικών οξέων για κάθε εκλούμενο συστατικό ήταν τα 210nm. Το σύστημα ήταν εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα (Jasco Chrompass Chromatography Data system v1.7.403.1) σε H/Y που κατέγραφε συνεχώς το σήμα από τον ανιχνευτή. Διαλύματα οργανικών οξέων αναφοράς (κιτρικό, γαλακτικό, οξικό, μηλικό, μυρμηκικό και προπιονικό οξύ) αναλύθηκαν με το ίδιο πρόγραμμα. Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τρία διαλύματα που περιείχαν τα παραπάνω οξέα με τελικές συγκεντρώσεις 1%, 0,1% και 0,001%. Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης που περιγράφεται από την εξίσωση: $Y = a + b X$ (όπου $Y =$ εμβαδόν της εκάστοτε κορυφής και $X =$ συγκέντρωση του οξέος που αναλύθηκε στην HPLC). Ο συντελεστής συσχέτισης για την κάθε καμπύλη ήταν 0,99, γεγονός που μαρτυρά τη γραμμική σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων των οξέων και της ανταπόκρισης του ανιχνευτή. Η συγκέντρωση του κάθε συστατικού εκφράστηκε ως η % περιοχή έκλυσης στο χρωματογράφημα:

% περιοχή έκλυσης = (εμβαδό της υπό εξέταση κορυφής / συνολικό εμβαδό των κορυφών του χρωματογραφήματος) x 100.

2.2.2.3. Ανάλυση χρωματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα

Η ανάλυση των δεδομένων από τα χρωματογραφήματα έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα XLStat software ver. 2006.06 (Addinsoft, Paris, France) και χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό πρόγραμμα MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca).

Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση με Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων (Discriminant Factor Analysis, DFA) ώστε να υπάρξει διαχωρισμός των δειγμάτων κρέατος σε τρεις προκαθορισμένες κατηγορίες ποιότητας. Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης (leave-one-out cross validation). Η ανάλυση έγινε σε όλο το σύνολο των δεδομένων ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Επίσης, αναπτύχθηκαν μοντέλα παλινδρόμησης με την εφαρμογή

Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (Support Vector Machines, SVM-R) ώστε να διερευνηθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μικροβιακού φορτίου των μικροοργανισμών (OMX, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια) με τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί από την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Σε αυτή τη περίπτωση, τα εμβαδά των κορυφών χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητές εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) στα μοντέλα παλινδρόμησης ενώ ως μεταβλητές εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) χρησιμοποιήθηκε το μικροβιακό φορτίο από την κάθε μικροβιακή ομάδα ξεχωριστά. Για κάθε περίπτωση, τα δείγματα αναλύθηκαν πέντε φορές. Ακολούθως, αναπτύχθηκαν πέντε διαφορετικές βάσεις δεδομένων για την εκπαίδευση και την επικύρωση του μοντέλου. Η ακρίβεια της ταξινόμησης (ευαισθησία της πρόβλεψης) με DFA καθορίστηκε από τον αριθμό των σωστών προβλέψεων σε κάθε ποιοτική κατηγορία διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που βρίσκονταν σε αυτή τη κατηγορία όπως και με το σωστό αριθμό ταξινομήσεων (ακρίβεια της πρόβλεψης) και στις 3 κλάσεις προς τον συνολικό αριθμό δειγμάτων. Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων παλινδρόμησης που δημιουργήθηκαν με SVM ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες επίδοσης (B_f), (A_f), (SEC), (SEP), και του συντελεστή συσχέτισης r (βλ. κεφ.: 2.4.2).

2.2.3. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR)

2.2.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Με την Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (FTIR/ATR) έγινε η ανάλυση των δειγμάτων χοιρινού κιμά. Συνολικά, 134 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 132 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας αναλύθηκαν για τις θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C και συσκευασία από τα ίδια χρονικά σημεία όπως και στις μικροβιακές αναλύσεις. Το μέγεθος κάθε δείγματος ήταν 8cm μήκος x 1cm πλάτος x 0,5 cm πάχος.

2.2.3.2. Συλλογή φασματικών δεδομένων με το φασματοφωτόμετρο FTIR/ATR

Οι αναλύσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο τύπου Nicolet 6700 FTIR Spectrometer (Εικόνα 2.1.), το οποίο ήταν εφοδιασμένο με κρύσταλλο ZnSe 45° ATR (Smart ARK Base, ATR) με ανιχνευτή DLaTGS Detector με παράθυρο KBr. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον κρύσταλλο και κατόπιν πιέστηκαν με την ειδική λαβή του μηχανήματος ώστε να υπάρξει η καλύτερη δυνατή επαφή με τον κρύσταλλο. Το φασματοφωτόμετρο ήταν προγραμματισμένο να λειτουργεί με το λογισμικό Omnic Software-έκδοση 7,3 μεταξύ των κυματαριθμών 4,000-650cm⁻¹, ενώ ο αριθμός των σαρώσεων ανά μέτρηση ήταν 100 και η κάθε μέτρηση διαρκούσε 2 λεπτά.

Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν, ενώ η λήψη του φάσματος αναφοράς (background spectra) γινόταν με τη λήψη φάσματος από την καθαρή επιφάνεια του κρυστάλλου κάθε φορά πριν από τη λήψη φάσματος δείγματος. Στο τέλος κάθε μέτρησης, γινόταν καθαρισμός της επιφάνειας του κρυστάλλου με απορρυπαντικό, ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και αιθανόλη και στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί.

2.2.3.3. Ανάλυση φασματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα

Η ανάλυση των δεδομένων από τα φασματογραφήματα έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Unscrambler (version 9.7, CAMO, Norway). Αρχικά, από τα φασματογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν με το FTIR χρησιμοποιήθηκαν οι κυματαριθμοί μεταξύ 1800 και 900cm⁻¹. Στα δεδομένα έγινε ο πρώτος μετασχηματισμός χρησιμοποιώντας τη μέθοδο standard normal variate (SNV), η οποία εφαρμόζεται για να μειώσει την επίδραση του θορύβου ή της μετατόπισης της γραμμής βάσης του μηχανήματος ή όποιες άλλες παρεμβολές οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την πολυμεταβλητή ανάλυση (Sinelli et al., 2005). Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Components



Εικόνα 2.1

Analysis, PCA), για τη μείωση της διάστασης των αρχικών δεδομένων (dimensionality reduction) και ο αριθμός των Κυρίων Συνιστωσών (PCs) ο οποίος εξηγούσε το μεγαλύτερο μέρος της παραλλακτικότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ως ανεξάρτητη μεταβλητή (\mathbf{X}) στην ανάπτυξη του μοντέλου. Για την ποιοτική ανάλυση των δεδομένων (δηλ. την κατάταξη των δειγμάτων κρέατος σε κατηγορίες ποιότητας) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Διακριτικής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) ώστε να αναπτυχθούν μοντέλα που να επιτρέπουν την ανάλυση των δειγμάτων του κρέατος μεταξύ των τριών ποιοτικών κατηγοριών (φρέσκο, σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο) που είχαν ήδη προκαθοριστεί κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση. Για την κωδικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος «ένα έναντι των πολλών» (one-of-many) (Berrueta et al., 2007). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε, ένας πίνακας \mathbf{Y} ('dummy' \mathbf{Y} matrix) από τιμές 0 και 1, ο οποίος περιείχε τόσες στήλες όσες και οι προκαθορισμένες κατηγορίες του κρέατος (3 στη συγκεκριμένη περίπτωση). Το δείγμα το κρέατος έπαιρνε την τιμή 1 για την κατηγορία στην οποία ανήκε και την τιμή 0 για τις άλλες δύο κατηγορίες. Με αυτόν τον τρόπο αναπτύχθηκαν 3 μοντέλα PLS-DA, ένα για κάθε κατηγορία. Για παράδειγμα, ένα φρέσκο δείγμα θα παίρνει την τιμή 1-0-0, ενώ ένα αλλοιωμένο την τιμή 0-0-1. Όσο πιο κοντά στη τιμή 1 βρίσκονταν τα στοιχεία μίας στήλης και τα άλλα στοιχεία στο 0, τότε το δείγμα ήταν πιο πιθανό να είναι μέλος αυτής της συγκεκριμένης κατηγορίας. Η αξιολόγηση του μοντέλου για την πρόβλεψη της ποιοτικής κατάταξης των δειγμάτων κρέατος έγινε με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης των αποτελεσμάτων (leave-one-out cross validation). Η ακρίβεια της ταξινόμησης (ευαισθησία) καθορίστηκε από τον αριθμό των σωστών προβλέψεων σε κάθε κατηγορία ποιότητας διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που βρίσκονταν σε αυτή τη κατηγορία όπως και με το σωστό αριθμό ταξινομήσεων (ακρίβεια της πρόβλεψης) και στις 3 κλάσεις προς τον συνολικό αριθμό δειγμάτων. Στη συνέχεια, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου των διαφορετικών μικροβιακών ομάδων που απαριθμήθηκαν, δημιουργήθηκαν μοντέλα χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Γραμμικής Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R), χρησιμοποιώντας τις τιμές των λανθάνουσων μεταβλητών ως μεταβλητές εισόδου και το μικροβιακό φορτίο της κάθε ξεχωριστής ομάδας μικροοργανισμών ως μεταβλητή εξόδου. Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων που

δημιουργήθηκαν με PLS-R ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες επίδοσης (B_f), (A_f), (SEC), (SEP), και του συντελεστή συσχέτισης r (βλ. κεφ.: 2.4.2). Η βάση δεδομένων (αριθμός φασμάτων) χωρίστηκε σε δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για εκπαίδευση του μοντέλου και σε δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση του μοντέλου. Τα δεδομένα για την επικύρωση του μοντέλου (test data) δεν χρησιμοποιήθηκαν σε κανένα βήμα ανάπτυξης του μοντέλου αλλά χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά για να αξιολογηθεί η επίδοσή του.

2.2.4. Ηλεκτρονική Μύτη (Quartz microbalance-based electronic nose)

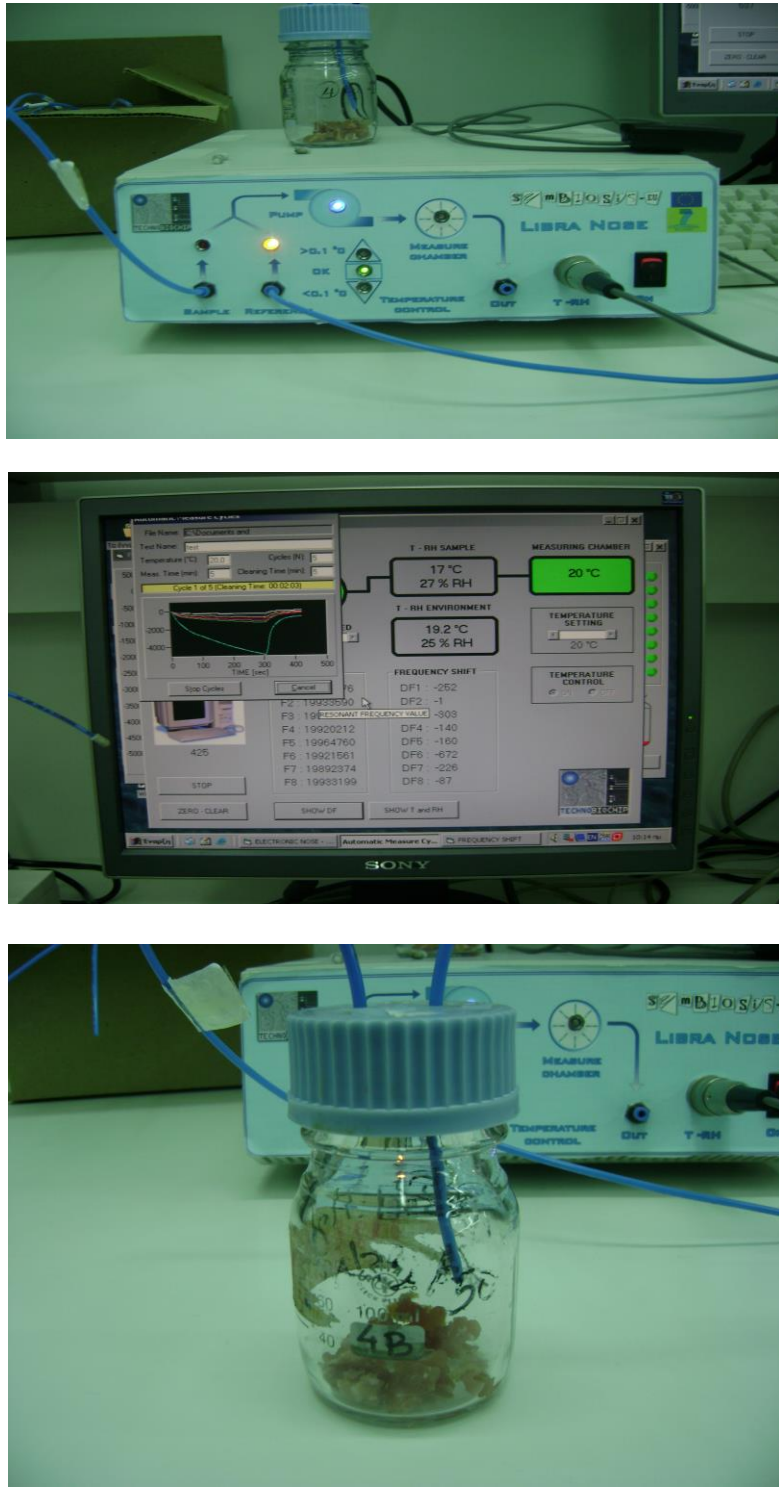
2.2.4.1. Προετοιμασία δείγματος

Τα δείγματα χοιρινού κιμά που αναλύθηκαν με την ηλεκτρονική μύτη, συμπεριλάμβαναν 43 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 43 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η κάθε μέτρηση έγινε εις τριπλούν (129 δείγματα αέρα και 129 δείγματα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας) από κάθε θερμοκρασία και συσκευασία από τα ίδια χρονικά σημεία όπως και στις μικροβιακές αναλύσεις. Το βάρος κάθε δείγματος ήταν 5g.

2.2.4.2. Ανάλυση δειγμάτων με την Ηλεκτρονική Μύτη

Ο προσδιορισμός του πτητικού προφίλ των δειγμάτων κιμά έγινε με τη βοήθεια ηλεκτρονικής μύτης η οποία παραχωρήθηκε από την εταιρεία Technobiochip (Libra Nose, Technobiochip, Napoli, Italy) στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος SYMBIOSIS. Η ηλεκτρονική μύτη ήταν εφοδιασμένη με 8 μη επιλεκτικούς αισθητήρες χαλαζία (quartz crystal microbalance, QMB) επικαλυμμένους με διάφορα παράγωγα πολυ-πυρολών (poly-pyrrole derivatives), η σύνθεση των οποίων έγινε από την ίδια εταιρεία και καλύπτεται από ευρωπαϊκή πατέντα [EP1505095]. Η λειτουργία του κάθε αισθητήρα βασίζεται στην μεταβολή της μάζας (mass variation, Δm) στην επιφάνεια του χαλαζία, εξαιτίας της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ του αισθητήρα και της πτητικής ένωσης. Οι συγκεκριμένοι αισθητήρες έχουν θεμελιώδη συχνότητα ταλάντωσης 20MHz.

Συνεπώς, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μεταβολή στη συχνότητα του χαλαζία, Δf (Hz), από την θεμελιώδη συχνότητα ταλάντωσης, f_0 , όπως αυτή εξηγείται από το νόμο του Sauerbrey's: $\Delta f = -\frac{C_f f_0^2}{A} \Delta m$ όπου A είναι η περιοχή της ευαίσθητης επιφάνειας του αισθητήρα (area of the sensitive layer) και C_f είναι η σταθερά της μάζας (mass sensitivity constant). Εντός της ηλεκτρονικής μύτης, υπήρχε αντλία η οποία ήταν υπεύθυνη για την εκρόφιση των πτητικών συστατικών του δείγματος και τη μεταφορά τους στον θάλαμο μέτρησης καθώς και για την έκπλυση των αισθητήρων με φιλτραρισμένο αέρα πριν από κάθε μέτρηση. Η πίεση της αντλίας διατηρούταν σταθερή συνεχώς. Το όλο σύστημα λειτουργούσε υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (20°C) και σχετικής υγρασίας (25%). Το σήμα απόκρισης των αισθητήρων καταγραφόταν συνεχώς σε ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος ήταν μονίμως συνδεδεμένος με το μηχάνημα. Το δείγμα εισαγόταν σε φιάλη χωρητικότητας 100ml και παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου (20°C \pm 2°C) για 15 λεπτά έως ότου να υπάρξει κορεσμός των πτητικών συστατικών του δείγματος και του υπερκείμενου (κενού) χώρου της φιάλης. Η φιάλη ήταν εφοδιασμένη με ειδικό καπάκι στο οποίο είχαν προσαρμοστεί 2 πλαστικοί σωλήνες διαμέτρου 2mm από τους οποίους γινόταν η εκρόφιση των αέριων συστατικών του δείγματος. Στη συνέχεια, η υπερκείμενη φάση εκροφόταν με τη βοήθεια αντλίας μέσω των πλαστικών σωλήνων και περνούσε από τη συστοιχία των 8 αισθητήρων. Το σήμα απόκρισης καταγραφόταν συνεχώς σε ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος ήταν μονίμως συνδεδεμένος με το μηχάνημα (Εικόνα 2.2). Μία τυπική απόκριση των αισθητήρων παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.3. Για την ανάλυση του κάθε δείγματος ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, η οποία επιλέχθηκε μετά από προκαταρκτικές δοκιμές χρησιμοποιώντας αντίστοιχα δείγματα κρέατος και η οποία αποτελείται από 3 κύκλους, συνολικής διάρκειας 15 λεπτών. Ο πρώτος κύκλος, διάρκειας 5 λεπτών, αφορούσε στον καθαρισμό του θαλάμου μέτρησης με φιλτραρισμένο αέρα. Ο δεύτερος κύκλος, διάρκειας 5 λεπτών, αφορούσε στη μεταφορά των πτητικών συστατικών του δείγματος από την φιάλη μέσω των πλαστικών σωλήνων στο θάλαμο μέτρησης. Ο τρίτος κύκλος, διάρκειας 5 λεπτών, αφορούσε στην εκκένωση και στον καθαρισμό του θαλάμου μέτρησης, με φιλτραρισμένο αέρα. Καθώς η μέτρηση του δείγματος ξεκινάει, η θεμελιώδης συχνότητα ταλάντωσης του κάθε αισθητήρα αλλάζει και μειώνεται σταθερά μέχρι να ληφθεί ένα σταθερό σήμα.



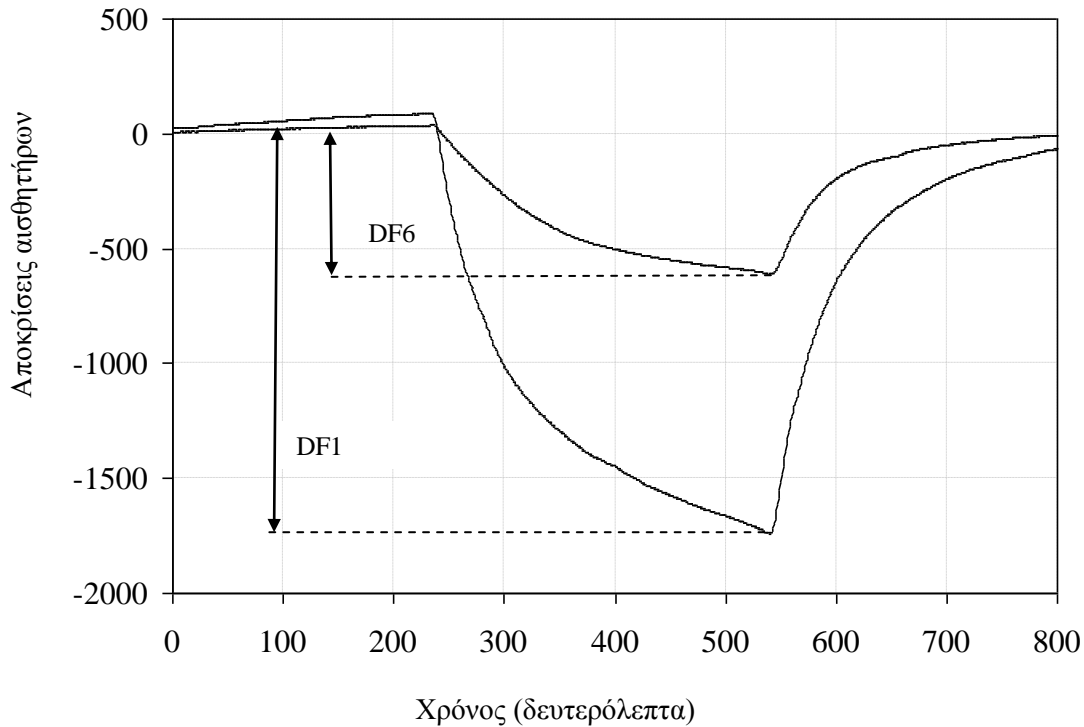
Εικόνα 2.2: Η φορητή ηλεκτρονική μύτη (Libra Nose) μαζί με τον Η/Υ σε λειτουργία κατά τη διάρκεια μιας μέτρησης χρονικού διαστήματος 5 λεπτών σε δείγμα χοιρινού κιμά

Η μέγιστη διαφορά της συχνότητας (Δf_{\max}) μεταξύ της τελικής και της αρχικής συχνότητας του αισθητήρα λήφθηκε ως απόκριση του αισθητήρα και χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των πτητικών αποτυπωμάτων του κάθε δείγματος.

2.2.4.3. Ανάλυση του πτητικού προφίλ με μαθηματικά μοντέλα

Η ανάλυση και ερμηνεία των δεδομένων βασίστηκε σε πολυμεταβλητές στατιστικές μεθόδους ανάλυσης όπως PCA, DFA και SVM. Η ανάλυση των δεδομένων με PCA και DFA έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα XLStat software ver. 2006.06 (Addinsoft, Paris, France), ενώ για SVM χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Statistica ver. 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Αρχικά τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε PCA και επιλέχθηκαν οι κατάλληλες κύριες συνιστώσες (Principal Components, PC's). Στο επόμενο βήμα τα μετασχηματισμένα δεδομένα (PC's) υποβλήθηκαν σε DFA ώστε να υπάρξει διαχωρισμός των δειγμάτων κρέατος στις 3 προκαθορισμένες κατηγορίες ποιότητας, για κάθε μία θερμοκρασία ξεχωριστά. Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης (leave-one-out cross validation). Τα ίδια μετασχηματισμένα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ώστε να γίνει ανάλυση με SVM για την ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις 3 κλάσεις ποιοτικής κατηγορίας. Σε αυτή τη περίπτωση, η ανάλυση έγινε σε όλο το σύνολο των δεδομένων ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν μοντέλα με τις Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης ώστε να διερευνηθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μικροβιακού φορτίου των μικροοργανισμών (OMX, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια) με τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί από την ηλεκτρονική μύτη. Σε αυτή τη περίπτωση, οι μετασχηματισμένες (με PCA) αποκρίσεις από τους αισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητές εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) στα μοντέλα παλινδρόμησης ενώ ως μεταβλητές εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) χρησιμοποιήθηκε το μικροβιακό φορτίο από την κάθε μικροβιακή ομάδα ξεχωριστά. Για κάθε περίπτωση, τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν. Ακολούθως, αναπτύχθηκαν τρεις διαφορετικές βάσεις δεδομένων για την εκπαίδευση και την επικύρωση του μοντέλου (three-fold training and test procedure). Ειδικότερα, στη πρώτη βάση δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του μοντέλου οι μετρήσεις από την πρώτη και τη δεύτερη επανάληψη

(train set 1) ενώ για την επικύρωση η τρίτη επανάληψη (test set 1). Στη δεύτερη και την τρίτη βάση δεδομένων, τα δεδομένα της εκπαίδευσης προήλθαν από την 1 και την 3 επανάληψη (train set 2) και την 2 και 3 επανάληψη (train set 3) αντίστοιχα, ενώ της επικύρωσης του μοντέλου από την δεύτερη (test set 2) και την τρίτη επανάληψη (test set 3) αντίστοιχα.



Εικόνα 2.3: Δύο χαρακτηριστικές καμπύλες απόκρισης αισθητήρων κατά την ανάλυση της υπερκείμενης φάσης δείγματος χοιρινού κιμά κατά τη διάρκεια μιας μέτρησης χρονικού διαστήματος 5 λεπτών

Η ακρίβεια της ταξινόμησης (ευαισθησία) με την DFA και SVM καθορίστηκε από τον αριθμό των σωστών προβλέψεων σε κάθε ποιοτική κατηγορία διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που βρίσκονταν σε αυτή τη κατηγορία όπως και με το σωστό αριθμό ταξινομήσεων (ακρίβεια της πρόβλεψης) και στις 3 κλάσεις προς τον συνολικό αριθμό δειγμάτων. Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων παλινδρόμησης που δημιουργήθηκαν με SVM ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες επίδοσης (B_f), (A_f), (SEC), (SEP), και του συντελεστή συσχέτισης r (βλ. κεφ.: 2.4.2).

2.2.5. Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης HS/SMPE GC/MS

2.2.5.1. Προετοιμασία δείγματος

Τα πτητικά συστατικά του κρέατος διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SMPE). Η συσκευή της SMPE αποτελείται από μία τριχοειδή ίνα τύπου πυριτίου μήκους 1cm η οποία επικαλύπτεται στην εξωτερική επιφάνεια της από ένα ατσάλινο έμβολο και από μία συσκευή συγκράτησης της ίνας, την μικροσύρριγα. Το δείγμα του κρέατος τοποθετήθηκε σε υάλινο φιαλίδιο με διάτρητο πώμα το οποίο σφραγίστηκε με διάφραγμα (ptfe-silicon septum). Στη συνέχεια η ίνα εισάγεται και εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο (headspace, HS). Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την απορρόφηση των πτητικών ήταν τύπου Divinylbenzene/ Carboxen/ Polydimethylsiloxane DVB/CAR/PDMS- 50/30μm (μήκος ίνας 1cm, μέγεθος ίνας 24ga, Sigma Aldrich, Greece). Οι συνθήκες δειγματοληψίας ήταν οι εξής: 2,5γρ. δείγματος (χοιρινός κιμά ή ιστός χοιρινού φιλέτου) μαζί με 5mL διαλύματος χλωριούχου νατρίου 25% και 50μL εσωτερικού πρότυπου (4-μεθυλοπενταν-1-ολ, τελική συγκέντρωση 100μg/L, αρχική συγκέντρωση 10mg/L) ομογενοποιήθηκαν με υάλινη ράβδο για 1 λεπτό στο φιαλίδιο και το περιεχόμενο αναδεύτηκε για 15 λεπτά στους 40°C. Στη συνέχεια, η ίνα εκτέθηκε στον υπερκείμενο χώρο για 30 λεπτά υπό τις ίδιες συνθήκες. Το μήκος της ίνας διατηρήθηκε σταθερό. Εκρόφηση των πτητικών συστατικών έλαβε χώρα στο σύστημα εισαγωγής της GC/MS για 5 λεπτά. Πριν από κάθε ανάλυση η ίνα εισερχόταν στο σύστημα εισαγωγής για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τυχόν επιμολύνσεις. Συνολικά, 47 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 46 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C αντίστοιχα αναλύθηκαν εις διπλούν από τα ίδια χρονικά σημεία όπως και στις μικροβιακές αναλύσεις. Συγχρόνως, αναλύθηκαν 108 δείγματα από το εμβολιασμένο φιλέτο χοιρινού κρέατος συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 111 δείγματα συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4 και 10°C από όλες τις περιπτώσεις εμβολιασμών αντίστοιχα.

2.2.5.2. Συνθήκες ανάλυσης με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)

Ο αέριος χρωματογράφος ήταν μάρκας Agilent 7890A συνδεδεμένος με Agilent 5973C φασματογράφο μάζας. Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο σε σταθερή ροή 0,93mL/min (μέση ταχύτητα 35,1cm/s). Το σύστημα εισαγωγής ήταν εφοδιασμένο με SPME liner (0,75mm x 6,35mm x 78,5mm) κατάλληλο για SPME αναλύσεις. Λειτουργούσε σε κατάσταση διαχωρισμού (split ratio 2:1) στους 250°C. Ο διαχωρισμός των ουσιών έγινε σε τριχοειδή στήλη HP-5MS (30m, 0,25mm i.d., 0,25μm film thickness, Agilent). Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ήταν το εξής:

α) 40°C για 5 λεπτά, με αύξηση 4°C/ λεπτό μέχρι τους 150°C, κατόπιν αύξηση μέχρι τους 250°C με ρυθμό 30°C/λεπτό.

β) θερμοκρασία διεπαφής (interface temperature): 280 °C

Ο τρόπος λειτουργίας του φασματογράφου μάζας ήταν *electron impact* με την ενέργεια ορισμένη 70eV και εύρος μαζών στα 29–350m/z (scan rate: 4,37 scans/sec, gain factor:1), οι θερμοκρασίες πηγής ιόντων και τετράπολου ήταν 230 και 150°C αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με i) σύγκριση των γραμμικών δεικτών κατακράτησης (linear retention indices, LRI) που βασίστηκαν στην ομόλογη σειρά n-αλκανίων (C7–C24, Niles, Illinois, USA) με αυτών από πρότυπες ουσίες και από σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα και ii) σύγκριση των δεδομένων φασματοσκοπίας μαζών με τα αντίστοιχα πρότυπα ουσιών που προέρχονται από τη βιβλιοθήκη NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, data version NIST 05, software version 2.0d). Το λογισμικό Amdis (version 2.62, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>) χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των συστατικών στόχων. Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε διαιρώντας τα εμβαδά των κορυφών των ενώσεων με το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Η κορυφές μετρήθηκαν επιλέγοντας μονά ιόντα.

2.2.5.3. Ανάλυση του πτητικού προφίλ με μαθηματικά μοντέλα

Η ανάλυση των δεδομένων από τα φασματογραφήματα του χοιρινού κιμά έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα XLStat software ver. 2006.06 (Addinsoft, Paris, France) και το πρόγραμμα Unscrambler (version 9.7, CAMO, Norway). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με DFA και PLS-R. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε DFA ώστε να υπάρξει διαχωρισμός των δειγμάτων κρέατος σε τρεις προκαθορισμένες κατηγορίες ποιότητας όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφ. 2.2.4.3. Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης (leave-one-out cross validation). Το μικροβιακό φορτίο των διαφόρων ομάδων των μικροοργανισμών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας PLS-R όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφ. 2.2.3.3. Η ανάλυση των δεδομένων από τα φασματογραφήματα του στείρου ιστού κρέατος έγινε χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό πρόγραμμα MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca).

2.4. Οργανοληπτική Αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων κρέατος έγινε σύμφωνα με τους Gill and Jeremiah, (1991) από μία ομάδα πέντε (5) ατόμων του εργαστηρίου. Ο οργανοληπτικός έλεγχος έγινε στα ίδια χρονικά διαστήματα με αυτά των μικροβιολογικών αναλύσεων. Συνολικά εκτιμήθηκε το χρώμα πριν και μετά το άνοιγμα της συσκευασίας, η παρουσία ορού στη συσκευασία πριν το άνοιγμα, και η οσμή του δείγματος αμέσως μετά το άνοιγμα της συσκευασίας. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: ποσότητα δείγματος 5-6 γραμμαρίων τοποθετήθηκε σε αλουμινόχαρτο και στη συνέχεια ψήθηκε για 20 λεπτά στους 180°C μέσα σε φούρνο που είχε προθερμαθεί για άλλα 20 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Κάθε ένα από τα παραπάνω οργανοληπτικά χαρακτηριστικά βαθμολογήθηκε σε μία ηδονική κλίμακα από 1 έως 3. Ο βαθμός 1 (φρέσκο), αντιστοιχούσε σε δείγμα ίσο με το δείγμα αναφοράς (αποδεκτό). Ο βαθμός 2 (σχετικά φρέσκο), αντιστοιχούσε με την παρουσία ελαφράς απόκλισης από το τυπικό άρωμα και γεύση του φρέσκου κρέατος αλλά θεωρούνταν ακόμα αποδεκτό (οριακά αποδεκτό). Ο βαθμός 3 (αλλοιωμένο) αντιστοιχούσε σε δείγματα τα οποία είχαν αναπτύξει έντονη ανεπιθύμητη οσμή ή/και ασυνήθιστη εμφάνιση (απορριπτέο). Η

βαθμολόγηση έγινε συγκριτικά με πρότυπα δείγματα που συντηρήθηκαν φρέσκα στην κατάψυξη (-18°C), καθ' όλη τη διάρκεια του εκάστοτε πειράματος και αποψύχονταν πριν από κάθε οργανοληπτική εξέταση. Έντονες οσμές σήψης, οσμές τυριού καθώς και γλυκείς ή όξινες γεύσεις θεωρούνταν ενδεικτικές της αλλοίωσης και κατά συνέπεια απορριπτέες (βαθμός 3). Αντίστοιχα, φωτεινό κόκκινο χρώμα όπως αυτό του τυπικού φρέσκου κρέατος με οξυγονωμένη μυοσφαιρίνη θεωρούνταν αποδεκτό (βαθμός 1-2), ενώ σκοτεινή (καφέ, καφέ-πράσινη) ή οποιαδήποτε ασυνήθιστη εμφάνιση ή χρώμα, χαρακτηρίζονταν απορριπτέο. Ο χρόνος για τον οποίο οι δοκιμαστές χαρακτήριζαν την ποιότητα των δειγμάτων αποδεκτή έως οριακά αποδεκτή (βαθμός 1-2) ορίστηκε ως χρόνος ζωής του δείγματος υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες συσκευασίας. Επιπλέον, για πιο αντικειμενική εκτίμηση της αλλοίωσης, ο χρόνος ζωής οριζόνταν ως η χρονική στιγμή κατά την οποία τουλάχιστον τρεις δοκιμαστές απέρριπταν ένα δείγμα.

2.5. Ανάλυση δεδομένων

2.5.1. Κινητική αύξησης των μικροοργανισμών

Τα δεδομένα αύξησης από την καταμέτρηση των διαφόρων ομάδων βακτηρίων μετασχηματίστηκαν σε δεκαδικούς λογάριθμους και προσαρμόστηκαν (με μη γραμμική παλινδρόμηση) στο πρωτογενές σιγμοειδές μοντέλο των Baranyi και Roberts (Baranyi & Roberts, 1994). Το μοντέλο βασίζεται σε τέσσερις παραμέτρους: τη διάρκεια της *φάσης προσαρμογής*, (lag phase), το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης, την κατώτερη (y_0) και την ανώτερη (y_{end}) ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης μεταβολής των μικροβιακών πληθυσμών ως προς το χρόνο, που στην πλειοψηφία των καμπυλών ανάπτυξης αντιστοιχούν στο αρχικό και τελικό επίπεδο του μικροβιακού πληθυσμού, αντίστοιχα. Η μη γραμμική παλινδρόμηση αυτού του μοντέλου έγινε με το πρόγραμμα DMFit (Institute of Food Research, Reading, UK; το οποίο είναι διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση www.combase.cc) σε περιβάλλον Excel (Microsoft Office 2003).

2.5.2. Δείκτες επίδοσης μοντέλων

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της επίδοσης (*performance*) των μαθηματικών μοντέλων ήταν ο συντελεστής προκατάληψης (*Bias factor, B_f*), ο συντελεστής ακριβείας (*Accuracy factor, A_f*) (Ross, 1996), ο δείκτης Τυπικό Σφάλμα Εκπαίδευσης (Standard Error of Calibration, SEC), Τυπικό Σφάλμα Πρόβλεψης (Standard Error of Prediction, SEP) και απεικονίζονται στις εξισώσεις 1, 2, 3, 4, και 5 αντίστοιχα (Hernández et al., 2007), καθώς επίσης και ο συντελεστής συσχέτισης *r* (correlation coefficient) μεταξύ των παρατηρήσεων και των εκτιμήσεων των πληθυσμών των μικροοργανισμών.

$$B_f = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\hat{y}_i}{y_i}\right)}{n}\right)} \quad (1)$$

$$A_f = 10^{\left(\frac{\sum \left|\log\left(\frac{\hat{y}_i}{y_i}\right)\right|}{n}\right)} \quad (2)$$

$$Bias = \frac{1}{I_p} \sum_{i=1}^{I_p} (\hat{y}_i - y_i) \quad (3)$$

$$SEC = \sqrt{\frac{1}{I_c - 1} \sum_{i=1}^{I_c} (\hat{y}_i - y_i)^2} \quad (4)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{I_p - 1} \sum_{i=1}^{I_p} (\hat{y}_i - y_i - bias)^2} \quad (5)$$

όπου *y* είναι η μεταβλητή που εξετάζεται και *n* ο αριθμός των παρατηρήσεων, *I_c* είναι αριθμός των παρατηρήσεων στην εκπαίδευση *I_p* είναι ο αριθμός των παρατηρήσεων στην πρόβλεψη. Ο δείκτης *Bias* μετράει τη συστηματική διαφορά (απόκλιση) μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων παρατηρήσεων. Ο συντελεστής

προκατάληψης είναι ένας πολλαπλασιαστικός συντελεστής, που εκφράζει το κατά πόσο ένα μοντέλο υπερ- ή υπο- εκτιμά κατά μέσο όρο μία μεταβλητή και ο συντελεστής ακριβείας είναι ένα μέτρο εκτίμησης της μέσης απόκλισης μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων (Ross, 1996). Τέλεια συμφωνία προβλέψεων και παρατηρήσεων αντιστοιχεί σε τιμή και των δύο συντελεστών ίση με 1, ενώ το αντίστροφο ισχύει μόνο για το συντελεστή ακριβείας, εξαιτίας της μαθηματικής μορφής του (βλ. εξίσωση 2). Τιμές του συντελεστή προκατάληψης πάνω από 1, είναι ενδεικτικές του ότι το μοντέλο υπερεκτιμά τις παρατηρήσεις και το αντίθετο ισχύει για τιμές κάτω από 1.

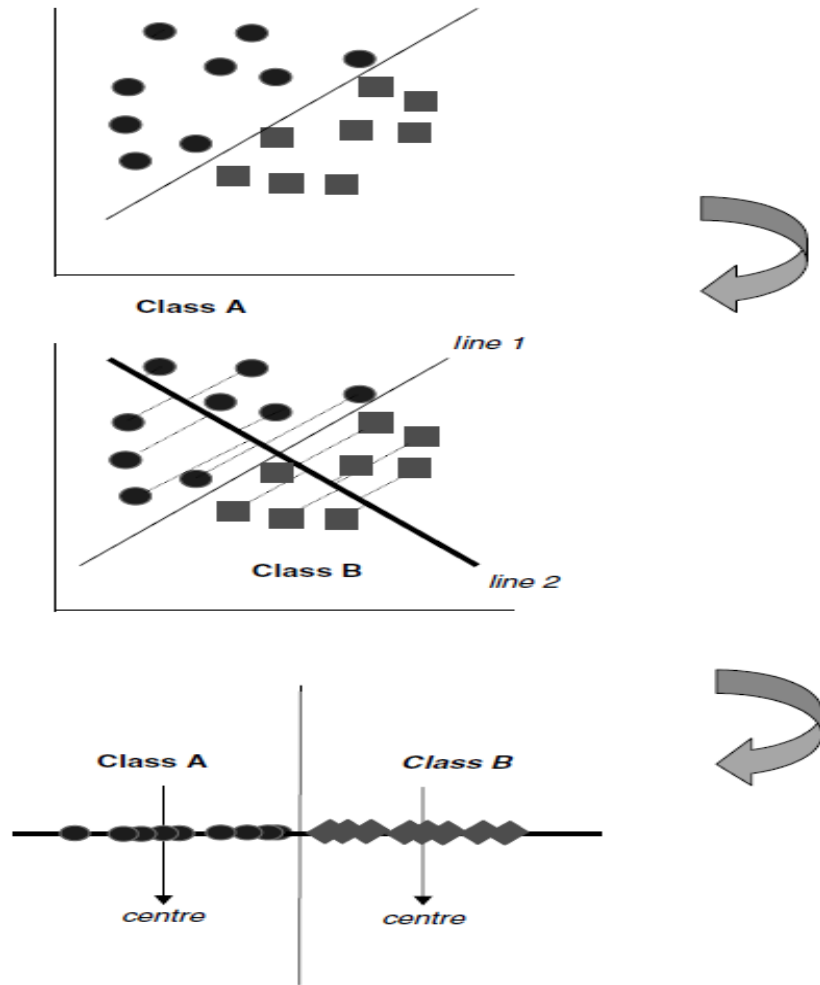
2.5.3. Στατιστική ανάλυση

2.5.3.1 Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων (Discriminant Function Analysis, DFA)

Η διαχωριστική ανάλυση παραγόντων είναι μια τεχνική ανάλυσης με επίβλεψη (supervised) η οποία χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου οι ομάδες κατηγοριοποίησης είναι γνωστές a priori, δηλαδή προϋποθέτει γνώση της δομής των δεδομένων. Ο σκοπός της διακριτικής ανάλυσης είναι να ταξινομήσει νέα άγνωστα δείγματα σε μία από τις γνωστές ομάδες (Berrueta et al., 2007). Οι κανόνες ταξινόμησης βασίζονται σε γραμμικούς συνδυασμούς των παρατηρούμενων μεταβλητών οι οποίες ονομάζονται διακριτικές συναρτήσεις (discriminant functions). Για παράδειγμα, μία μεταβλητή χρησιμοποιείται για να διαιρέσει αντικείμενα σε 2 ομάδες και δημιουργείται ένα γράφημα όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.4. Τα αντικείμενα που εκπροσωπούνται από τα κυκλικά σχήματα είναι σαφώς διακριτά από εκείνα που αντιπροσωπεύονται από τα τετράγωνα. Γίνονται 2 μετρήσεις και οι τιμές τοποθετούνται στο γράφημα αλλά καμία από τις δύο μετρήσεις και μόνο δε μπορεί να διακρίνει μεταξύ αυτών των ομάδων, και ως εκ τούτου και τα δύο σχήματα είναι απαραίτητα για την ταξινόμηση. Είναι δυνατόν, ωστόσο, να χαραχθεί μια διαχωριστική γραμμή μεταξύ των δύο ομάδων. Εάν η μέτρηση είναι πάνω από τη γραμμή, ένα αντικείμενο ανήκει στην κατηγορία A, αλλιώς ανήκει στην κατηγορία B. Διαγραμματικά αυτό μπορεί να παρασταθεί με την προβολή των αντικειμένων σε μια γραμμή σε ορθή γωνία ως προς την γραμμή διάκρισης, όπως

φαίνεται στην Εικόνα 2.4. Η προβολή μπορεί τώρα να μετατραπεί σε μία θέση κατά μήκος της γραμμής 2 (line 2) του σχήματος. Η απόσταση μπορεί να μετατραπεί σε έναν αριθμό, ανάλογο με ένα «βαθμό». Αντικείμενα με χαμηλότερες τιμές ανήκουν στην κατηγορία A, ενώ εκείνα με υψηλότερες τιμές ανήκουν στην κατηγορία B. Είναι δυνατόν να προσδιορισθεί η κλάση ανάλογα με το αν η τιμή είναι πάνω ή κάτω από ένα διαιρέτη. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί το κέντρο της κάθε κατηγορίας κατά μήκος της προεξοχής και αν η απόσταση από το κέντρο της κατηγορίας A είναι μεγαλύτερη από ότι στην κατηγορία B, το αντικείμενο τοποθετείται στην κατηγορία A, και αντιστρόφως, αλλά αυτό εξαρτάται εάν οι κατηγορίες είναι εξίσου διάσπαρτες (diffuse) (Brereton, 2003).

Η διακριτική ανάλυση παραγόντων απαιτεί τη γνώση ενός καλά ταξινομημένου συνόλου δεδομένων το οποίο διαιρείται σε ομάδες. Η διαχωριστική ανάλυση παραγόντων αναζητά τους παράγοντες, όπου οι προβολές των δεδομένων κατατάσσονται όσο το δυνατόν καλύτερα και σύμφωνα με τις εκ των προτέρων γνωστές ομάδες. Αυτοί οι παράγοντες χωρίζουν τον πολυμεταβλητό χώρο χρησιμοποιώντας υπερ-επίπεδα. Η επιλογή των παραγόντων ή των κάθετων υπερ-επιπέδων γίνεται με σκοπό να ελαχιστοποιήσει την πιθανότητα της εσφαλμένης ταξινόμησης (Argyri, 2010a).



Εικόνα 2.4: Διάκριση μεταξύ δύο κλάσεων όπως τροποποιήθηκε από Brereton, 2003

2.5.3.2. Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)

Η ανάλυση των Κυρίων Συνιστωσών είναι μια καθιερωμένη διαδικασία στατιστικής πολυμεταβλητής ανάλυσης για το χειρισμό πολλών μεταβλητών δεδομένων για τη μείωση των διαστάσεων, διατηρώντας παράλληλα το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης (μεταβλητότητας) του αρχικού συνόλου δεδομένων. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η ανάπτυξη νέων μεταβλητών, που ονομάζονται κύριες συνιστώσες (PCs), οι οποίες δεν σχετίζονται μεταξύ τους. Ο αριθμός των παραγόμενων συνιστωσών είναι μικρότερος ή ίσος με τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών, όμως, από κάποιο σημείο και μετά πολλές από αυτές δεν είναι χρήσιμες γιατί δεν επεξηγούν κάποιο ποσοστό από την αρχική διακύμανση. Η πρώτη κύρια συνιστώσα καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό

της διακύμανσης των δεδομένων (δηλ. της μεταβλητότητας των δεδομένων), η δεύτερη συνιστώσα η οποία είναι κάθετη με την πρώτη καλύπτει το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό της διακύμανσης που έχει απομείνει από την ερμηνεία της πρώτης συνιστώσας, και ούτω καθεξής μέχρι να μην απομείνει ποσοστό διακύμανσης που να μην ερμηνεύεται. Οι τιμές των κύριων συνιστωσών χρησιμοποιούνται ως δεδομένα εισόδου σε άλλες πολυμεταβλητές τεχνικές αντί των μετρούμενων αρχικών μεταβλητών (Arvanitoyannis & van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2003, Berrueta et al., 2007).

2.5.3.3. Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)

Η μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη στατιστική μέθοδος με μεγάλο φάσμα εφαρμογών σε πολλές επιστήμες. Η PLS είναι μια πολυπαραγοντική τεχνική μάθησης με εποπτεία που έχει ως στόχο να καθορίσει τη σχέση ανάμεσα σε ένα σύνολο δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυματαριθμοί από το FTIR, αποκρίσεις των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης κ.λπ.) και σε ένα σύνολο αποκρίσεων Y (εξαρτημένες μεταβλητές, στη συγκεκριμένη μελέτη, πληθυσμοί βακτηρίων ή κατηγορίες της ποιότητας κρέατος). Η PLS προβάλλει τα αρχικά δεδομένα εισόδου- εξόδου σε έναν λανθάνον (latent) χώρο, εξάγοντας έναν αριθμό κυρίων συνιστωσών, γνωστών σε αυτή τη περίπτωση ως λανθάνουσες συνιστώσες (latent variables) με ορθογώνια διάταξη, καθώς και εμπερικλείει την μεγαλύτερη διακύμανση των αρχικών δεδομένων. Η πρώτη λανθάνουσα συνιστώσα καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των δεδομένων, η δεύτερη καλύπτει όσο περισσότερο από το υπόλοιπο της διακύμανσης, και ούτω καθεξής (Berrueta, et al., 2007, Nielsen et al., 2002, Xia et al., 2009).

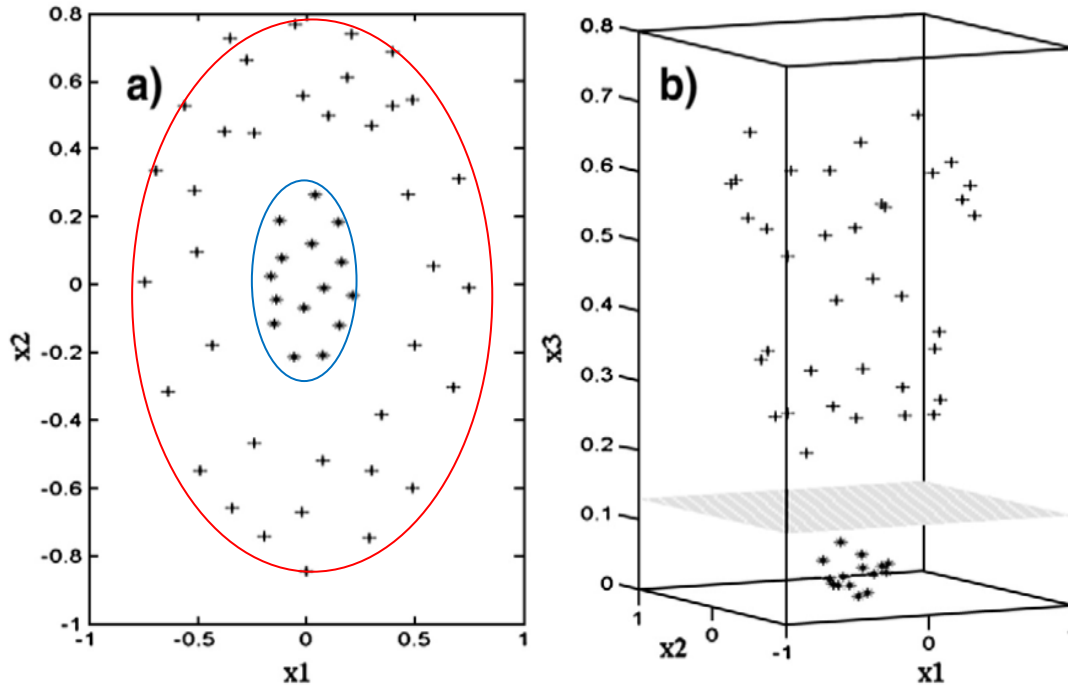
2.5.3.4. Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης (Support Vector Machines, SVM)

Τα τελευταία χρόνια, μία νέα τεχνική που ονομάζεται Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης, η οποία είναι βασισμένη σε αλγόριθμους εκπαίδευσης (kernel-based procedure) έχει εμφανιστεί στον τομέα της μηχανικής εκμάθησης ως μία πολλά

υποσχόμενη τεχνική κατάλληλη για ταξινόμηση προτύπων και προβλημάτων παλινδρόμησης (Pardo & Sberveglieri, 2005). Η SVM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αντιμετωπίσει προβλήματα ταξινόμησης και παλινδρόμησης (Berrueta et al., 2007). Η εφαρμογή της ως τεχνική μάθησης με επίβλεψη έχει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως η καλή ικανότητα γενίκευσης και μικρότερη τάση για αλληλοκάλυψη (over-fitting). Με SVM, μη γραμμικά δεδομένα μπορούν να διαχωριστούν γραμμικά όταν εισάγονται σε νέο χώρο πολλαπλών διαστάσεων των χαρακτηριστικών (feature space). Συγχρόνως, με SVM είναι δυνατόν να ελαχιστοποιηθούν οι λανθασμένες εκτιμήσεις και οι διαστάσεις των μοντέλων (minimize estimation errors and model dimensions) (Singh et al., 2011), και έχουν ήδη αποδειχθεί επιτυχής σε μια σειρά από πρακτικές εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων (Brudzewski, et al., 2011 Pardo & Sberveglieri, 2005, Wang, et al., 2012). Εν συντομία, όσον αφορά την προσέγγιση των SVM, τα αρχικά σημεία δεδομένων από το χώρο εισόδου αντιστοιχίζονται σε ένα πολυδιάστατο χώρο χαρακτηριστικών (feature space). Αυτή η λειτουργία ονομάζεται χαρτογράφηση (mapping) και είναι βασικό στοιχείο κατά την ανάπτυξη των SVM. Η ανώτερη διάσταση (dimensional superiority) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο διότι τα δεδομένα περιέχουν περισσότερη πληροφορία καθώς η διάσταση αυξάνεται. Η προβολή των δεδομένων σε χώρο ανώτερων διαστάσεων διεξάγεται με τη χρήση κατάλληλης συνάρτησης πυρήνα (kernel function) με σκοπό να δημιουργηθεί ένα υπερ-επίπεδο μέγιστου περιθωρίου (maximum margin hyperplane) με τη βέλτιστη διαχωριστική ικανότητα των αρχικά γραμμικώς αδιαχώριστων δεδομένων σε γραμμικά διαχωρίσιμα δεδομένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.5 (Li et al., 2009). Ακολούθως, κατασκευάζονται δύο ακόμα υπερ-επίπεδα σε κάθε μεριά του αρχικού υπερ-επιπέδου το οποίο διαχωρίζει τα αρχικά δεδομένα. Το υπερ-επίπεδο μεγιστοποιεί την απόσταση μεταξύ δύο παράλληλων υπερ-επιπέδων. Όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση μεταξύ αυτών των δύο, τόσο μικρότερο το ποσοστό λάθους στα δεδομένα ελέγχου. Η πιο κατάλληλη συνάρτηση πυρήνα στη συγκεκριμένη εργασία (kernel function) επιλέχθηκε μέσω της δοκιμής και του λάθους (trial and error). Υπάρχουν 4 συναρτήσεις πυρήνα, η γραμμική, η σιγμοειδής, η πολυωνυμική και η ακτινωτή συνάρτηση βάσης (radial basis function, RBF). Η τελευταία είναι αυτή που χρησιμοποιείται πιο συχνά και παρακάτω δίνεται ο τύπος της:

$$K(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \exp\left(-\gamma \|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j\|^2\right) \quad (1)$$

όπου \mathbf{x}_i , \mathbf{x}_j είναι το i th και το j th δείγμα, αντίστοιχα, ενώ η παράμετρος γ ελέγχει την ομαλότητα του ορίου απόφασης στον πολυδιάστατο χώρο (feature space).



Εικόνα 2.5: τα δύο διαγράμματα a) και b) δείχνουν ότι οι 2 κατηγορίες γραμμικώς αδιαχώριστων δειγμάτων σε δισδιάστατο χώρο μπορούν να διαχωριστούν γραμμικά χωρίς σφάλματα όταν η τρίτη διάσταση προστεθεί σε κάθε δείγμα. (Li et al., 2009)

Για συγκεκριμένο πρόβλημα ταξινόμησης, ο στόχος των SVM είναι να ανακαλύψουν το βέλτιστο υπερ-επίπεδο στο οποίο η απόσταση με όλα τα σημεία θα είναι η ελάχιστη (Belousov et al., 2002, Li et al., 2009). Η ίδια συνάρτηση πυρήνα (RBF) επιλέχθηκε και για τα προβλήματα παλινδρόμησης. Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων για κατηγοριοποίηση ή παλινδρόμηση εξαρτάται και από άλλους παράγοντες εκτός της επιλογής της κατάλληλης συνάρτησης πυρήνα. Εξίσου σημαντική είναι η επιλογή της κατάλληλης παραμέτρου χωρητικότητας, C (C , capacity parameter) και της παραμέτρου μηδενικής απώλειας, ϵ (insensitive loss function). Οι παραπάνω παράγοντες

επιλέχθηκαν με προκαταρκτικές δοκιμές. Η παράμετρος C ελέγχει την εξισορρόπηση μεταξύ της μεγιστοποίησης του περιθωρίου και την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων εκπαίδευσης (trade-off between the training error and the margin). Αν η παράμετρος C είναι πολύ μεγάλη, η συνάρτηση θα αλληλεπικαλύψει τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για εκπαίδευση. Αν η παράμετρος C είναι πολύ μικρή, τότε η εκπαίδευση θα είναι ανεπαρκής. Η παράμετρος ε είναι μια παράμετρος πρόβλεψης (Wang et al., 2012). Για τη δεδομένη συνάρτηση RBF, η πιο σημαντική παράμετρος είναι το πλάτος γ το οποίο ελέγχει το εύρος λειτουργίας της συνάρτησης και συνεπώς τη δυνατότητα γενίκευσης (generalization ability) των SVM. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών έγινε με διασταυρούμενη επικύρωση (Li et al., 2009, Singh et al., 2011).

2.6. Μοριακές αναλύσεις

2.6.1 Απομόνωση των στελεχών από το επιλεκτικό υπόστρωμα για *Brochothrix* spp.

Έγιναν 306 τυχαίες απομονώσεις από το επιλεκτικό υπόστρωμα (Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar, STAA) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του *Brochothrix thermosphacta*, από τρία διαφορετικά χρονικά σημεία της αλλοίωσης (αρχή, μέση και τέλος) των δειγμάτων χοιρινού κιμά. Εν συντομία, οι αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία από την υψηλότερη αραίωση (Harrigan, 1998) και καθαρίστηκαν με διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε Brain Heart Infusion (BHI) άγαρ. Περίπου 30 αποικίες επιλέχθηκαν από το κάθε χρονικό σημείο της αλλοίωσης από θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C και από τις 2 συσκευασίες του χοιρινού κιμά (αέρας και MAP). Οι αποικίες, μέχρι να χρησιμοποιηθούν αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη, στους -80°C σε BHI ζωμό μαζί με 20% κ.ο. γλυκερίνη. Πριν την περαιτέρω ανάλυση, κάθε απομονωμένο στέλεχος αναπτύχθηκε εις διπλούν σε BHI ζωμό στους 25°C για 24 ώρες. Η καθαρότητα της καλλιέργειας ελέγχθηκε με επισκόπηση σε BHI άγαρ.

2.6.2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Η μέθοδος της PFGE πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Doulgeraki et al., (2010b). Εν συντομία, έγινε συλλογή των κυττάρων μετά από φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 14.000rpm). Η βιομάζα εκπλύθηκε εις διπλούν με διάλυμα 10mM Tris-HCl (pH 7,6) που περιείχε 1M NaCl. Κατόπιν επαναδιαλύθηκε σε 100μL του ίδιου διαλύματος, θερμάνθηκε στους 37°C για 10 λεπτά και αναμείχθηκε με ίσο όγκο 2% (w/v) αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (161-3111, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) σε διάλυμα 0.125M EDTA pH 7,6. Στη συνέχεια, αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε καλούπια CHEF (170-3713, Bio-Rad). Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε λύση *in situ* σε διάλυμα EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 1% (w/v) Sarkosyl, pH 7,6) με 10mg/mL λυσοζύμη (A4972, Applichem GmbH, Darmstadt, Germany) για 16 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε η πρωτεϊνόλυση μετά από προσθήκη διαλύματος 0.5M EDTA με 1% sarkosyl (pH 8) με proteinase K (P2308, Sigma) για 24 ώρες στους 55°C. Τα τεμάχια της αγαρόζης, εκπλύχθηκαν εις διπλούν με διάλυμα 10mM Tris-HCl/ 1mM EDTA (pH 8) με 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, P7626 Sigma) για 1 ώρα στους 37°C και αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη (4°C) σε διάλυμα 10mM Tris-HCl/ 100mM EDTA (pH 8) μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα τεμάχια της αγαρόζης κόπηκαν με αποστειρωμένες καλυπτρίδες σε κομμάτια πάχους 1-2mm και κατόπιν τα τεμάχια αυτά εκπλύθηκαν 3 φορές με 10mM Tris-HCl που περιείχε 0,1mM EDTA (pH 8,0) με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* (10U) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) χρησιμοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή για την πέψη των τεμαχίων. Στη συνέχεια, έγινε διαχωρισμός σε 1% πηκτή αγαρόζης (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) σε 0,5mM Tris-Borate ρυθμιστικό διάλυμα στο μηχάνημα CHEF-DRII (Bio-Rad) το οποίο λειτουργούσε με τις ακόλουθες παραμέτρους για 18 ώρες στους 14°C: 6V/cm, αρχικό χρόνο μεταγωγής 4sec, τελικός χρόνος μεταγωγής 40sec. Στη συνέχεια, η πηκτή χρωματίστηκε με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5mg/ml) σε νερό για 1 ώρα, αποχρωματίστηκε για 2 ώρες και λήφθηκε φωτογραφία με το μηχάνημα Geldoc (Bio-Rad). Περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Pearson και την ανάλυση διασποράς UPGMA με τη

βοήθεια του προγράμματος Bionumerics έκδοση 6,1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Βέλγιο).

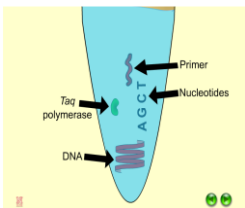
2.6.3. Απομόνωση DNA

Το DNA εξάχθηκε σύμφωνα με τους Cocolin et al. (2005). Τα κύτταρα από 1mL μιας καλλιέργειας 24 ωρών σε BHI ζυμό (Merck) συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση σε 14.000rpm για 10 λεπτά. Εν συντομία, στη βιομάζα που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρηση (σε Eppendorfs) έγινε λύση του κυτταρικού τοιχώματος με γυάλινες σφαίρες μικρής διαμέτρου (glassbead) και σπάσιμο της κυτταρικής μεμβράνης με προσθήκη λυσοζύμης (25mg/ml) στους 37°C για 30 λεπτά, προσθήκη 300μl Breaking Buffer, 300μl διαλύματος φαινόλης/ χλωροφόρμιου/ ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 και 300μl Tris- EDTA σε αναλογία 10:1 και το προκύπτον διάλυμα ανακινήθηκε σε Vortex για 10 λεπτά. Για την εξαγωγή και το διαχωρισμό του DNA έγινε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 14.000rpm για 10 λεπτά και το διάλυμα χωρίστηκε σε 3 φάσεις. Η άνω φάση μεταφέρθηκε σε νέα Eppendorfs. Για να συμβεί κατακρήμνιση του DNA 600μl καθαρής αιθανόλης προστέθηκαν στο διάλυμα και έγινε νέα φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 10 λεπτά. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και έγινε εκ νέου προσθήκη 250μl αιθανόλης 70% καθαρότητας και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 2 λεπτά. Τέλος, έγινε ξήρανση των Eppendorfs για 30 λεπτά, κατόπιν προσθήκη 50μl δις απιονισμένου νερού και τέλος επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Το προκύπτον DNA ποσοτικοποιήθηκε με το πρόγραμμα Bionumerics έκδοση 6,1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Βέλγιο).

2.6.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (Rep-PCR)

100ng του εξαγόμενου DNA από κάθε απομόνωση υποβλήθηκε σε επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Rep-PCR). Χρησιμοποιήθηκε ο εκκινήτης (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') και η όλη διαδικασία έγινε σύμφωνα με τους Iacumin et al., (2006). Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν σε τελικό όγκο 25μL που περιείχε: 10mM ρυθμιστικό διάλυμα PCR Gold Buffer 10X,

25mM MgCl₂, 10mM μείγμα dNTPs., 10μM εκκινητή (GTG)₅ και 5U Taq πολυμεράσης



(Applied Biosystem, Carlsbad, ΗΠΑ). Η PCR αντίδραση ξεκινούσε με την αρχική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας του DNA στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούσαν 30 θερμοκοί κύκλοι αποτελούμενοι από τρία στάδια (αποδιάταξη στους 90°C, 30 λεπτά,

υβριδοποίηση (primer annealing) του εκκινητή στις αλληλουχίες του DNA στόχου στους 40°C για 1 λεπτό, επιμήκυνση των εκκινητών στους 65°C για 8 λεπτά) και ακολουθεί το τελικό στάδιο επέκτασης στους 65°C για 16 λεπτά. Τα προϊόντα της Rep-PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% σε διάλυμα TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X για 2 ώρες με 120V. Στη συνέχεια έγινε χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μL/mL για 30 λεπτά και λήφθηκε φωτογραφία με το μηχάνημα Geldoc (Bio-Rad). Περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Pearson και την ανάλυση διασποράς UPGMA με τη βοήθεια του προγράμματος Bionumerics έκδοση 6,1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Βέλγιο).

2.6.5. Sau-PCR

100ng του εξαγόμενου DNA από κάθε απομόνωση υποβλήθηκε σε πέψη χρησιμοποιώντας την ενδονουκλεάση περιορισμού Sau3A (10 U/μL) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) σε τελικό όγκο 20μL. Μετά από ολονύχτια επώαση στους 37°C, 1μL μεταφέρθηκε σε 25μL τελικού όγκου φιαλίδια τύπου Eppendorf που περιείχε: 10mM ρυθμιστικό διάλυμα PCR Gold Buffer 10X, 25mM MgCl₂, 10mM μείγμα dNTPs., 2μM από τον κάθε εκκινητή SAG1 (5'-CCGCCGCGATCAG-3'), SAG2 (5'-CCGCCGCGATCTC-3') και 5U Taq πολυμεράσης (Applied Biosystem, Carlsbad, ΗΠΑ). Η PCR αντίδραση έγινε σύμφωνα με τους Corich et al., 2005. Το πρώτο στάδιο ξεκινούσε από τους 25°C για 5 λεπτά με βαθμιδωτή αύξηση στους 60°C με συνθήκες αύξησης 0.1°C το δευτερόλεπτο, και παρέμενε στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια ακολουθούσε η αποδιάταξη της αλυσίδας του DNA στους 95°C για 1 λεπτό, κατόπιν μείωση την θερμοκρασίας στους 50°C για 15 δευτερόλεπτα, βαθμιδωτή μείωση μέχρι τους 25°C με συνθήκες μείωσης 0.1°C το δευτερόλεπτο, αύξηση στους 50°C με συνθήκες αύξησης 0.1°C ανά

δευτερόλεπτο και παραμονή στους 50°C για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθούσαν 35 θερμοκοί κύκλοι αποτελούμενοι από τρία στάδια (αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 46°C για 1 λεπτό, επιμήκυνση των εκκινητών στους 65°C για 2 λεπτά) και το τελικό στάδιο επέκτασης στους 65°C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα της Sau-PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% σε διάλυμα TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X για 2 ώρες με 120V. Στη συνέχεια έγινε χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μL/mL για 30 λεπτά και λήφθηκε φωτογραφία με το μηχάνημα Geldoc (Bio-Rad). Περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Pearson και την ανάλυση διασποράς UPGMA με τη βοήθεια του προγράμματος Bionumerics έκδοση 6,1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Βέλγιο).

Κεφάλαιο 3

Εκτίμηση της αλλοίωσης χοιρινού κιμά με μικροβιολογικές και φυσικοχημικές μεθόδους

3.1. Εισαγωγή

Το κρέας παίζει σημαντικό ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου εξαιτίας της υψηλής βιολογικής αξίας που έχει, των επιθυμητών χαρακτηριστικών υφής και γεύσης καθώς και του κύρους που προσδίδει ιδιαίτερα στις κοινωνίες που ευημερούν (Doulgeraki 2010a). Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των ΗΠΑ (Food & Agriculture Organization, FAO, 2007), το χοιρινό κρέας κατέχει το 50% της παγκόσμιας παραγωγής κρέατος. Το 75% των καταναλωτών επιλέγουν το χοιρινό κρέας τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα για τη διατροφή τους. Τα τελευταία χρόνια, με τη δημιουργία υπεραγορών τροφίμων, όπου ο καταναλωτής μπορεί να προμηθευτεί τρόφιμα αλλά και διάφορα είδη οικιακής χρήσης, έγινε θεσμός η επίσκεψη στις υπεραγορές, ενώ τα παραδοσιακά κρεοπωλεία ή μικρά καταστήματα τροφίμων σταμάτησαν να είναι η πρώτη επιλογή. Επίσης, εξαιτίας του σύγχρονου τρόπου ζωής, η επίσκεψη για αγορά τροφίμων περιορίστηκε χρονικά και καθιερώθηκε το «once a week shopping» (Koutsoumanis et al., 2008). Συγχρόνως, οι καταναλωτές έγιναν περισσότερο απαιτητικοί όσον αφορά στη διαθεσιμότητα και στην ευκολία επιλογής τροφίμων, στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων, στις λειτουργικές και διατροφικές ιδιότητές τους, στη σχέση μεταξύ διατροφής και υγείας, καθώς και στην εγγυημένη ασφάλεια συνδυαστικά με τη μικρότερη δυνατή επεξεργασία και τεχνολογική παρέμβαση. Έτσι, η βιομηχανία τροφίμων, για να αντιμετωπίσει τις απαιτήσεις της αγοράς χρειάστηκε να δημιουργήσει προϊόντα ελκυστικά στον καταναλωτή, που να συνδυάζουν την ασφάλεια και την υψηλή ποιότητα (Nychas et al., 2008, Verbeke et al., 2009). Στην περίπτωση του κρέατος, λ.χ., δημιουργήθηκαν νέοι τρόποι συσκευασίας ώστε το κρέας να φαίνεται με λαμπερό κόκκινο χρώμα και παράλληλα να προστατεύεται από πιθανές επιμολύνσεις. Έτσι, το κρέας τοποθετείται είτε σε δίσκους αφρώδους υλικού (με ή χωρίς την προσθήκη απορροφητικού χαρτιού), τυλιγμένο με μεμβράνη διαπερατή στο οξυγόνο, είτε με μεμβράνη ιδανική για τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Doulgeraki 2010a, Paramithiotis et al., 2009).

Το κρέας, εξαιτίας της υψηλής αναλογίας σε νερό και σε θρεπτικά συστατικά, είναι ιδιαίτερα ευπαθές και ευαλλοίωτο. Η επιφάνεια του κρέατος επιμολύνεται κατά τη διάρκεια των χειρισμών κατά και μετά τη σφαγή του ζώου με διάφορους

μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση στο κρέας λόγω του ότι καταναλώνουν τα θρεπτικά συστατικά του κρέατος παράγοντας δυσάρεστες οσμές, γεύσεις και προκαλώντας ανεπιθύμητη εμφάνιση. Ο κιμάς, ο οποίος παράγεται από την άλεση διαφόρων τεμαχίων κρέατος, προτιμάται από τους καταναλωτές λόγω της ευκολίας που προσφέρει στο μαγείρεμα, αλλά έχει το μειονέκτημα της μικρής διάρκειας ζωής (Limbo et al., 2010). Αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής του προϊόντος με το οξυγόνο, καθώς και στην ανάμειξη των μικροοργανισμών, που αρχικά βρίσκονταν στην επιφάνεια των τεμαχίων του κρέατος, σε όλη τη μάζα του.

Έως σήμερα, είναι διαθέσιμοι πάνω από 50 διαφορετικοί τρόποι ελέγχου της μικροβιακής επιμόλυνσης του κρέατος (Byun et al., 2003, Ellis & Goodacre, 2001, Nychas et al., 2008). Όμως, οι μέθοδοι αυτές έχουν ορισμένα μειονεκτήματα, καθώς είναι χρονοβόρες, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό, είναι καταστρεπτικές για το δείγμα και οι πληροφορίες που παρέχουν είναι αναδρομικές, οπότε δεν δύναται να χρησιμοποιηθούν για έλεγχο της γραμμής παραγωγής σε πραγματικό χρόνο (online monitoring) (Dainty, 1996, Ellis et al., 2002, 2004, Liu, et al., 2004, Nychas et al., 1998, 2008). Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν γρήγορα και αξιόπιστα συστήματα για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της ασφάλειας του κρέατος, καθώς ποσοστό 25% περίπου της παγκόσμιας κρεατοπαραγωγής καταστρέφεται εξαιτίας της μικροβιακής δραστηριότητας (Huis in't Veld, 1996). Για το σκοπό αυτό, άρχισαν να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ασφάλειας και της ποιότητας του κρέατος διάφορες μη επεμβατικές (μη καταστρεπτικές) μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται σε μηχανικές, οπτικές ή φασματοσκοπικές ιδιότητες (Ammor et al., 2009, Argyri et al., 2010b, Balasubramanian et al., 2009, Damez & Clerjon, 2008, Ellis et al., 2005, Prieto et al., 2009, Rajamaki et al., 2006). Η αρχή που διέπει αυτή την προσέγγιση βασίζεται στην υπόθεση ότι κατά τη μικροβιακή δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο κρέας παράγονται μεταβολικά προϊόντα τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης. Η ποσοτικοποίηση αυτών των μεταβολικών προϊόντων αποτελεί χαρακτηριστικό αποτύπωμα των βιοχημικών ουσιών, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με το είδος και το βαθμό της αλλοίωσης (Ellis & Goodacre, 2001, Nychas et al., 2008).

Σε αυτό το κεφάλαιο έγινε εκτίμηση της ποιότητας χοιρινού κιμά χρησιμοποιώντας ταχείες αναλυτικές μεθόδους, όπως φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), ηλεκτρονική μύτη, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (HS/SPME, GC/MS)

Μέθοδοι όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για έλεγχο νοθείας ή ταυτοποίηση προέλευσης προϊόντων. Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier είναι γρήγορη και εύχρηστη μέθοδος, δεν απαιτεί ιδιαίτερη προετοιμασία δείγματος, ούτε χημικά αντιδραστήρια. Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (FTIR/ATR) επιτρέπει τη συλλογή φασμάτων σε μόλις λίγα λεπτά, καθιστώντας δυνατή την ταυτόχρονη αξιολόγηση των ιδιοτήτων του κρέατος (Ammor et al., 2009, Ellis et al., 2002, 2004). Η ενσωμάτωση της πληροφορίας που δίνεται από ένα φάσμα FTIR/ATR σε μία κατάλληλη πλατφόρμα επεξεργασίας των δεδομένων θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός έμπειρου συστήματος το οποίο θα ήταν σε θέση να διακρίνει την ποιοτική κατηγορία ενός κρέατος, ή να εκτιμήσει το ποσοστό των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται σε αυτό (Berrueta et al., 2007).

Η ηλεκτρονική μύτη αναπτύχθηκε με σκοπό την προσομοίωση της ανθρώπινης όσφρησης, βασισμένη στην ανάλυση των πηκτικών δακτυλικών αποτυπωμάτων (fingerprints) ενός δείγματος μέσω μιας σειράς αισθητήρων (sensor arrays) και συστημάτων αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition). Η οσμή των τροφίμων περιλαμβάνει πολλές χημικές ουσίες που τους προσδίδουν μοναδική ποιότητα και χαρακτήρα. Η ικανότητα να μετρηθούν και να αναγνωριστούν με αξιοπιστία η ιδανική οσμή και γεύση, καθώς και τα σταθερά χαρακτηριστικά της τροφής είναι επομένως σημαντική για την ανάπτυξη πολλών προϊόντων. Παραδοσιακά, αυτός ο δύσκολος στόχος ήταν το αποκλειστικό προνόμιο ομάδων οργανοληπτικού ελέγχου. Οι ομάδες αυτές αποτελούνταν από άτομα των οποίων η ατομική αξιολόγηση πάντα θα περιλάμβανε την προσωπική τους εκτίμηση. Μερικές φορές χρησιμοποιούνται αναλυτικές τεχνικές, αλλά είναι συχνά δύσκολο να συσχετιστούν τα δεδομένα με τις οργανοληπτικές πληροφορίες. Αντίθετα, η μέτρηση με την ηλεκτρονική μύτη είναι αντικειμενική, επαναλήψιμη, με υψηλή ακρίβεια και σχετικά χαμηλό κόστος. Η ερμηνεία

των αποτελεσμάτων είναι απλή, γρήγορη και άμεση. Όπως η ανθρώπινη αίσθηση της όσφρησης, η οποία δεν αναγνωρίζει συγκεκριμένες ενώσεις αλλά μυρωδιές, παρόμοια και η ηλεκτρονική μύτη λειτουργεί αναγνωρίζοντας πρότυπες οσμές (Blixt & Borch, 1999). Στη βιομηχανία τροφίμων, η χρήση της ηλεκτρονικής μύτης για την εκτίμηση χαρακτηριστικών όπως ποιότητα, χρόνος συντήρησης, και χρόνος επεξεργασίας σε κρέας ή ψάρι, είναι πολύ συχνή (Boothe & Arnold, 2002). Το 1993 οι Winquist et al., ήταν από τους πρώτους που χρησιμοποίησαν την ηλεκτρονική μύτη για την εκτίμηση της ποιότητας βόειου και χοιρινού κρέατος με τη βοήθεια νευρωνικών δικτύων. Η χρήση της ηλεκτρονικής μύτης για την ανίχνευση της ποιότητας των τροφίμων ως μη καταστρεπτική τεχνική είναι ευρέως διαδεδομένη, καθώς παρέχει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ηλεκτρονικές μύτες δεν δίνουν καμία πληροφορία σχετικά με την ταυτότητα των ενώσεων από τις οποίες προέρχεται η οσμή του τροφίμου. Ωστόσο, με τη βοήθεια κατάλληλων μαθηματικών τεχνικών, όπως λ.χ. τα νευρωνικά δίκτυα ή στατιστικές μέθοδοι, η ηλεκτρονική μύτη είναι ικανή να αναγνωρίζει το πρότυπο άρωμα από ένα συγκεκριμένο δείγμα και να το διακρίνει από άλλα δείγματα. Έτσι, φαίνεται πως η μελέτη των πτητικών ουσιών ως δυνητικοί δείκτες αξιολόγησης της ποιότητας και ασφάλειας είναι εξαιρετικής σημασίας (Bicego et al., 2002, Panigrahi et al., 2006).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση μικροβιακών μεταβολιτών από το κρέας. Η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και διάφορα αμινοξέα καταβολίζονται σχεδόν από όλα τα βακτήρια της χλωρίδας του κρέατος. Οι ουσίες αυτές παρέχουν την ενέργεια στα βακτήρια ώστε να αναπτυχθούν, ενώ η συγκέντρωσή τους είναι υπεύθυνη για τον τύπο (σακχαρολυτικός, πρωτεολυτικός) και το βαθμό της αλλοίωσης που θα ακολουθήσει. Καθώς προχωράει η αλλοίωση του κρέατος, τα πιο συχνά μεταβολικά προϊόντα που παράγονται είναι: i) ουσίες που συμβάλλουν στο γλυκολυτικό μονοπάτι (γλυκόζη, γλυκογόνο, γαλακτικό οξύ, 6-φωσφορική γλυκόζη), ii) μεταβολικά προϊόντα (γαλακτικό, οξικό, μυρμηκικό, προπιονικό, γλυκονικό, κιτρικό οξύ, κ.λπ.) και iii) αζωτούχες ουσίες (Argyri et al., 2011, Nychas et al., 2008). Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας για παρακολούθηση των αλλαγών στο προφίλ των οργανικών οξέων σε δείγματα κρέατος μπορεί να αποτελέσει μία απλή και πολλά υποσχόμενη μέθοδο της μελέτης της αλλοίωσης του κρέατος (Argyri

et al., 2011, Lambropoulou et al., 1996). Η αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας είναι μία τεχνική με ποικιλία εφαρμογών που παρέχει πληροφορίες για τη σύσταση του προς εξέταση δείγματος, τη δομή των μορίων (ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων), την ποιοτική και ποσοτική σύσταση μειγμάτων και, τέλος, την ισοτοπική αναλογία στα δείγματα (Γαρδέλη, 2009). Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης είναι μία εύκολη, γρήγορη και χαμηλού κόστους τεχνική για την απομόνωση των πτητικών συστατικών τροφίμων και σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση πτητικών συστατικών (Soncin et al., 2007). Ως επί το πλείστον, οι πρόσφατες έρευνες έχουν μελετήσει τα πτητικά συστατικά προϊόντων κρέατος όπως ζυμούμενα λουκάνικα (Flores et al., 2004), χοιρομέρι (Gianelli et al., 2002), βραστή γαλοπούλα και ζαμπόν (Brunton et al., 2000, Leroy et al., 2009) ή μαγειρεμένων κρεάτων (Estevez et al., 2003, Tang et al., 1983), ενώ λιγότερες πληροφορίες υπάρχουν για τα πτητικά συστατικά των νωπών κρεάτων, όπως βόειο κρέας (Insausti et al., 2002), χοιρινό, πάπια, χήνα (Soncin et al., 2007).

3.2. Υλικά και μέθοδοι

3.2.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

Κατά την πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκαν τα εξής στάδια:

Στάδιο 1: Μελετήθηκαν οι μικροβιολογικές, οργανοληπτικές και φυσικοχημικές μεταβολές χοιρινού κιμά κατά την αερόβια συντήρησή του σε διαφορετικές θερμοκρασίες από 0 έως 20°C.

Στάδιο 2: Μελετήθηκαν οι μικροβιολογικές, οργανοληπτικές και φυσικοχημικές μεταβολές χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε διαφορετικές θερμοκρασίες από 0 έως 20°C.

Στάδιο 3: Τα δεδομένα από το στάδιο 1 και 2 χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων, ώστε να γίνει εκτίμηση της ποιοτικής κατηγορίας του κρέατος καθώς και του πληθυσμού των διάφορων μικροοργανισμών της χλωρίδας του κρέατος κατά τη συντήρηση.

Μικροβιολογικές αναλύσεις και καταμέτρηση

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.1.

Φυσικοχημικές αναλύσεις

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.2.

Οργανοληπτική αξιολόγηση

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.3.

Ανάλυση δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.4.

Στατιστική ανάλυση

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.5.

3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.3.1. Εκτίμηση της αλλοίωσης χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C

3.3.1.1. Εξέλιξη της μικροβιακής χλωρίδας

Η μικροβιολογική ανάλυση έδειξε ότι η αρχική χλωρίδα του χοιρινού κιμά αποτελούταν από *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια, *Enterobacteriaceae* και ζύμες. Η δυναμική των πληθυσμών αυτών καθώς και η συμβολή τους στην τελική μικροβιακή χλωρίδα επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία συντήρησης καθώς και από το είδος συσκευασίας (αερόβια, τροποποιημένη ατμόσφαιρα). Τα δεδομένα αύξησης της ενδογενούς μικροχλωρίδας του χοιρινού κιμά κατά τη διάρκεια συντήρησής του σε δύο συσκευασίες και πέντε θερμοκρασίες συντήρησης παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.3.1 και 3.3.2 μαζί με τις προσαρμοσμένες καμπύλες που λήφθηκαν μετά την προσαρμογή των δεδομένων στο λογιστικό μοντέλο ανάπτυξης του

Baranyi & Roberts (Εικόνες 3.3.3, 3.3.4). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.1, στην αερόβια αλλοίωση του χοιρινού κιμά οι ψευδομονάδες αποτέλεσαν την κυρίαρχη χλωρίδα σε όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν και ακολούθησαν κατά φθίνουσα σειρά μεγέθους οι μικροοργανισμοί *B. thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια, *Enterobacteriaceae* και ζύμες. Αντίθετα, η συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας καθυστέρησε την αύξηση των ψευδομονάδων, των *Enterobacteriaceae* και των ζυμών, ενώ ο τελικός πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας διατηρήθηκε χαμηλότερος κατά 1,0-1,5 log CFU/g σε σύγκριση με αυτόν που παρατηρήθηκε κατά την αερόβια αλλοίωση του χοιρινού κιμά (Εικόνα 3.3.2).

Αντιθέτως, η συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ευνόησε την αύξηση των γαλακτικών βακτηρίων και του *B. thermosphacta*, καθώς βρέθηκαν να είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί (Εικόνα 3.3.1.2). Οι Πίνακες 3.3.1 και 3.3.2 συνοψίζουν την κινητική αύξησης των μικροοργανισμών, τη φάση προσαρμογής, τον τελικό πληθυσμό όπως και το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης μετά την προσαρμογή των μικροβιολογικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi & Roberts. Από τους πίνακες φαίνεται ότι η διάρκεια της φάσης προσαρμογής στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης ήταν μεγάλη, ενώ καθώς η θερμοκρασία αυξανόταν, η διάρκεια της φάσης προσαρμογής μειωνόταν σταδιακά, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε καθόλου. Παράλληλα, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης, αυξήθηκε αντίστοιχα με την αύξηση της θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με άλλες έρευνες που έχουν ανακοινωθεί σχετικά με την αλλοίωση χοιρινού και βόειου κρέατος (Ercolini et al., 2006, 2009, Sakala et al., 2002, Skandamis & Nychas 2001, 2002).

3.3.1.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση του χοιρινού κιμά

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το τέλος της διάρκειας ζωής του κρέατος οφείλεται στην παραγωγή οσμών και γεύσεων αλλοίωσης ως συνέπεια της μεταβολικής δραστηριότητας των βακτηρίων, έγινε οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων κρέατος ώστε να υπολογιστεί ποιοτικά ο χρόνος ζωής του κρέατος στις διάφορες περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Ο χρόνος που προσδιορίστηκε από την ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης για να χαρακτηρίσει ένα δείγμα κρέατος ως αλλοιωμένο διέφερε για κάθε

θερμοκρασία και συσκευασία. Ειδικότερα, η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε ένα δείγμα ως αλλοιωμένο έπειτα από 171, 73, 45, 36 και 24 ώρες σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15, και 20°C αντίστοιχα για την αερόβια αλλοίωση (Πίνακας 3.3.3), ενώ οι αντίστοιχες χρονικές περίοδοι για την συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ήταν 317,5, 199, 79, 60 και 32 ώρες σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15, και 20°C αντίστοιχα (Πίνακας 3.3.4). Η οργανοληπτική απόρριψη του δείγματος δεν συσχετιζόταν πάντα με το ίδιο μικροβιακό φορτίο αλλά ήταν σε εξάρτηση από τη θερμοκρασία. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η οργανοληπτική απόρριψη του δείγματος έγινε σε μικρότερο μικροβιακό φορτίο, το οποίο αυξανόταν σταδιακά με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης (π.χ. 6,77 log CFU/g στους 0°C σε αερόβιες συνθήκες, 7,21 log CFU/g στους 5°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας αντίστοιχα). Στις περισσότερες περιπτώσεις, κατά το χαρακτηρισμό του κρέατος ως αλλοιωμένο, ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ήταν περίπου 8,0 log CFU/g. Οι πληροφορίες που λήφθηκαν από το πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας που εφαρμόστηκε στη παρούσα εργασία επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα άλλων σχετικών εργασιών που αναφέραν ότι πληθυσμοί κοντά στους 7,0-8,0 log CFU/g μπορούν να προκαλέσουν έντονες οσμές και γλοιώδη εμφάνιση (Koutsoumanis et al., 2006, 2008), ενώ άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι πρωτεολυτικές αλλαγές γίνονται εμφανείς αφού ο πληθυσμός των βακτηρίων έχει φτάσει τους 9,0 log CFU/cm² (Brooks et al., 2008).

Πίνακας 3.3.1: Κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού κιμά κατά την αερόβια συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Baranyi & Roberts.

Μικροοργανισμοί	Θ (°C)	Lag phase ^δ (h)	y_0^a (log ₁₀ cfu/g)	y_{end}^b (log ₁₀ cfu/g)	μ_{max} (h ⁻¹) ^γ	R ²
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0	46,1	5,81	9,68	0,039	0,953
<i>Pseudomonas</i> spp.		17,3	5,52	9,88	0,036	0,964
<i>B. thermosphacta</i>		48,6	4,2	8,16	0,043	0,945
Γαλακτικά βακτήρια		192,4	4,53	6,33	0,071	0,765
<i>Enterobacteriaceae</i>		268,9	3,43	-	0,074	0,825
Ζύμες		32,16	3,07	4,486	0,009	0,858
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	5	13,7	5,37	9,66	0,09	0,973
<i>Pseudomonas</i> spp.		2,8	5,17	9,63	0,089	0,971
<i>B. thermosphacta</i>		14,1	3,58	7,9	0,136	0,986
Γαλακτικά βακτήρια		-ε	3,56	7,39	0,061	0,98
<i>Enterobacteriaceae</i>		34,4	3,05	7,55	0,063	0,967
Ζύμες		-	3,7	4,72	0,013	0,771
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	10	-	5,29	9,36	0,143	0,933
<i>Pseudomonas</i> spp.		-	5,3	9,59	0,132	0,969
<i>B. thermosphacta</i>		-	3,7	7,77	0,163	0,968
Γαλακτικά βακτήρια		-	3,69	7,2	0,145	0,875
<i>Enterobacteriaceae</i>		19,8	3,02	7,75	0,156	0,955
Ζύμες		-	3,07	4,72	0,076	0,75
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	15	-	5,27	9,52	0,2	0,929
<i>Pseudomonas</i> spp.		0,88	5,12	9,52	0,211	0,947
<i>B. thermosphacta</i>		-	3,63	7,75	0,252	0,952
Γαλακτικά βακτήρια		-	3,56	7,54	0,229	0,939
<i>Enterobacteriaceae</i>		-	3,3	8,21	0,249	0,977
Ζύμες		13,37	3,36	5,40	0,144	-
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	20	3,81	5,88	9,42	0,325	0,938
<i>Pseudomonas</i> spp.		3,35	5,12	9,31	0,364	0,957
<i>B. thermosphacta</i>		3,26	4,25	7,5	0,378	0,915
Γαλακτικά βακτήρια		12,01	4,58	7,71	1,449	0,936
<i>Enterobacteriaceae</i>		6,81	2,93	8,36	0,551	0,943
Ζύμες		-	3,31	8,37	0,099	0,713

α: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός
β: Τελικός μικροβιακός πληθυσμός
γ: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης
δ: Διάρκεια φάσης προσαρμογής
ε: δεν υπολογίστηκε

Πίνακας 3.3.2: Κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Baranyi & Roberts.

Μικροοργανισμοί	Θ (°C)	Lag phase ^δ (h)	y_0^a (log ₁₀ cfu/g)	y_{end}^b (log ₁₀ cfu/g)	μ_{max} (h ⁻¹) ^γ	R ²
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0	69,22	5,7	7,19	0,008	0,844
<i>Pseudomonas</i> spp.		80,06	5,89	-	-0,001	-
<i>B. thermosphacta</i>		165,12	4,84	6,02	0,364	0,886
Γαλακτικά βακτήρια		98,04	3,62	6,48	0,021	0,957
<i>Enterobacteriaceae</i>		-ε	3,08	-	-0,001	-
Ζύμες		-	3,16	2,93	-0,001	-
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	5	-	5,65	7,78	0,027	0,902
<i>Pseudomonas</i> spp.		-	5,35	6,1	0,025	0,209
<i>B. thermosphacta</i>		-	4,28	6,93	0,039	0,966
Γαλακτικά βακτήρια		53,76	3,76	6,97	0,075	0,939
<i>Enterobacteriaceae</i>		-	2,93	4,63	0,016	0,712
Ζύμες		-	2,94	3,48	0,003	-
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	10	7,89	5,46	7,94	0,082	0,929
<i>Pseudomonas</i> spp.		-	5,23	6,23	0,061	-
<i>B. thermosphacta</i>		-	4,28	6,9	0,094	0,885
Γαλακτικά βακτήρια		7,42	3,52	7,02	0,103	0,963
<i>Enterobacteriaceae</i>		-	2,76	5,89	0,068	0,958
Ζύμες		-	2,88	5,9	0,013	-
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	15	1,78	5,5	8,26	0,126	0,928
<i>Pseudomonas</i> spp.		16,32	5,64	9,14	0,061	0,88
<i>B. thermosphacta</i>		-	4,2	7,29	0,15	0,943
Γαλακτικά βακτήρια		-	3,51	7,38	0,185	0,974
<i>Enterobacteriaceae</i>		2,48	2,72	7,21	0,17	0,967
Ζύμες		36,47	2,87	10,54	0,062	0,697
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	20	-	5,35	8,28	0,221	0,877
<i>Pseudomonas</i> spp.		-	5,41	8,55	0,103	0,876
<i>B. thermosphacta</i>		-	3,99	7,01	0,208	0,941
Γαλακτικά βακτήρια		-	3,5	7,44	0,303	0,978
<i>Enterobacteriaceae</i>		-	2,6	8,17	0,287	0,979
Ζύμες		24,3	3,04	41,61	0,06	0,766

α: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός
 β: Τελικός μικροβιακός πληθυσμός
 γ: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης
 δ: Διάρκεια φάσης προσαρμογής
 ε: δεν υπολογίστηκε

Πίνακας 3.3.3: Οργανοληπτική αξιολόγηση του χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες σε σύγκριση με την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και το pH

Αέρας	Αρχικό σημείο	0°C		5°C		10°C		15°C		20°C	
		Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο
OMX	5,79	6,9	7,98	6,41	8,23	6,86	8,52	6,09	8,18	6,73	8,81
pH	5,85	5,92	6,11	5,88	6	6,09	5,6	6,04	6,09	5,91	5,51
Χρόνος (h)	0	108 ^α	171 ^β	48	73	21.5	45	16	36	12	24

^α ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως σχετικά φρέσκο

^β ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως απορριπτέο

Πίνακας 3.3.4: Οργανοληπτική αξιολόγηση του χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε σύγκριση με την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και το pH

MAP	Αρχικό σημείο	0°C		5°C		10°C		15°C		20°C	
		Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο
OMX	5,31	6,25	6,77	6,96	7,27	7,28	8,01	7,31	8,21	7,01	8,16
pH	5,81	5,78	5,84	5,64	5,81	5,73	5,94	5,93	5,87	6,16	5,75
Χρόνος (h)	0	118.5 ^α	317 ^β	97	199	65	79	36	60	16	32

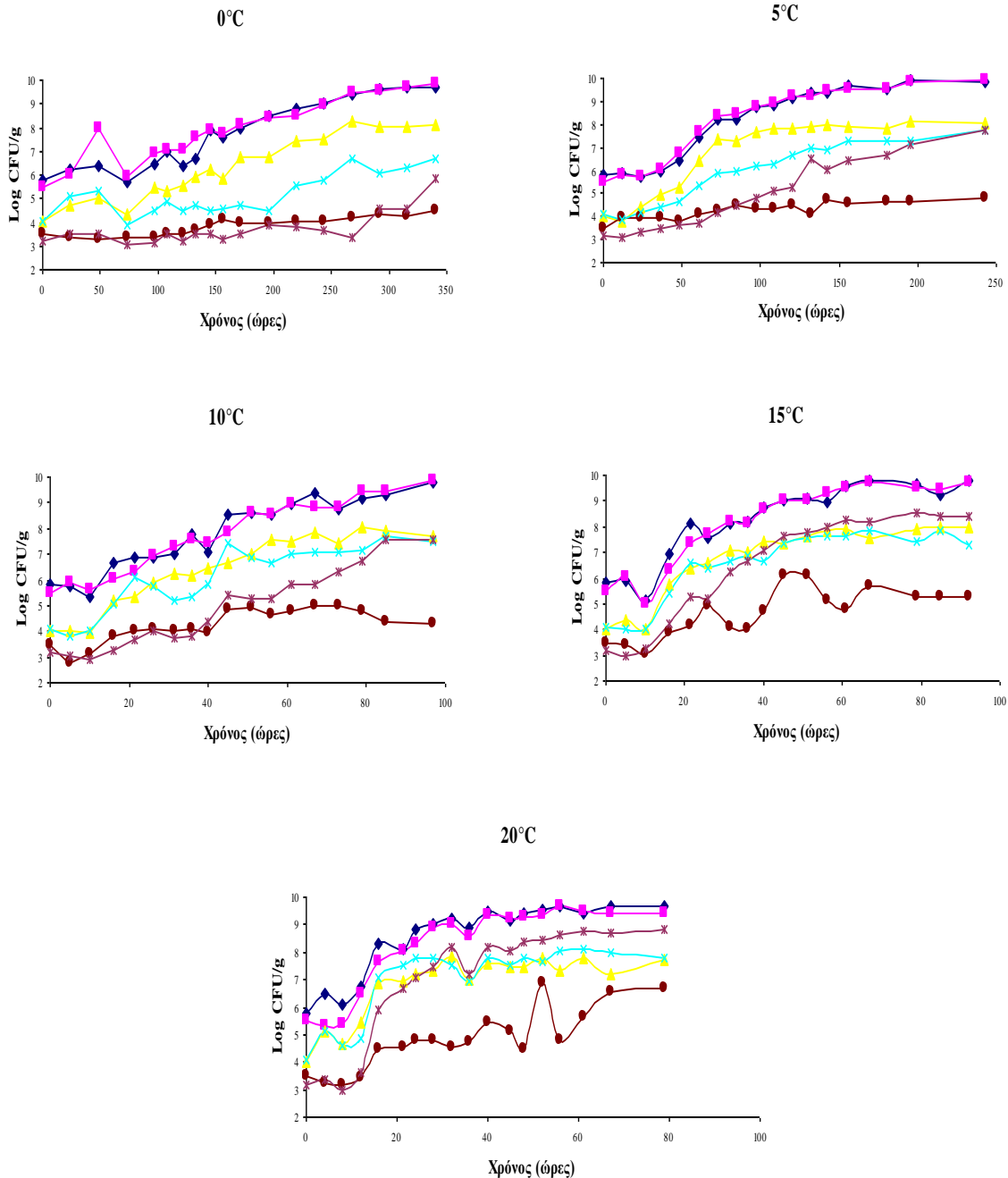
^α ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως σχετικά φρέσκο

^β ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως απορριπτέο

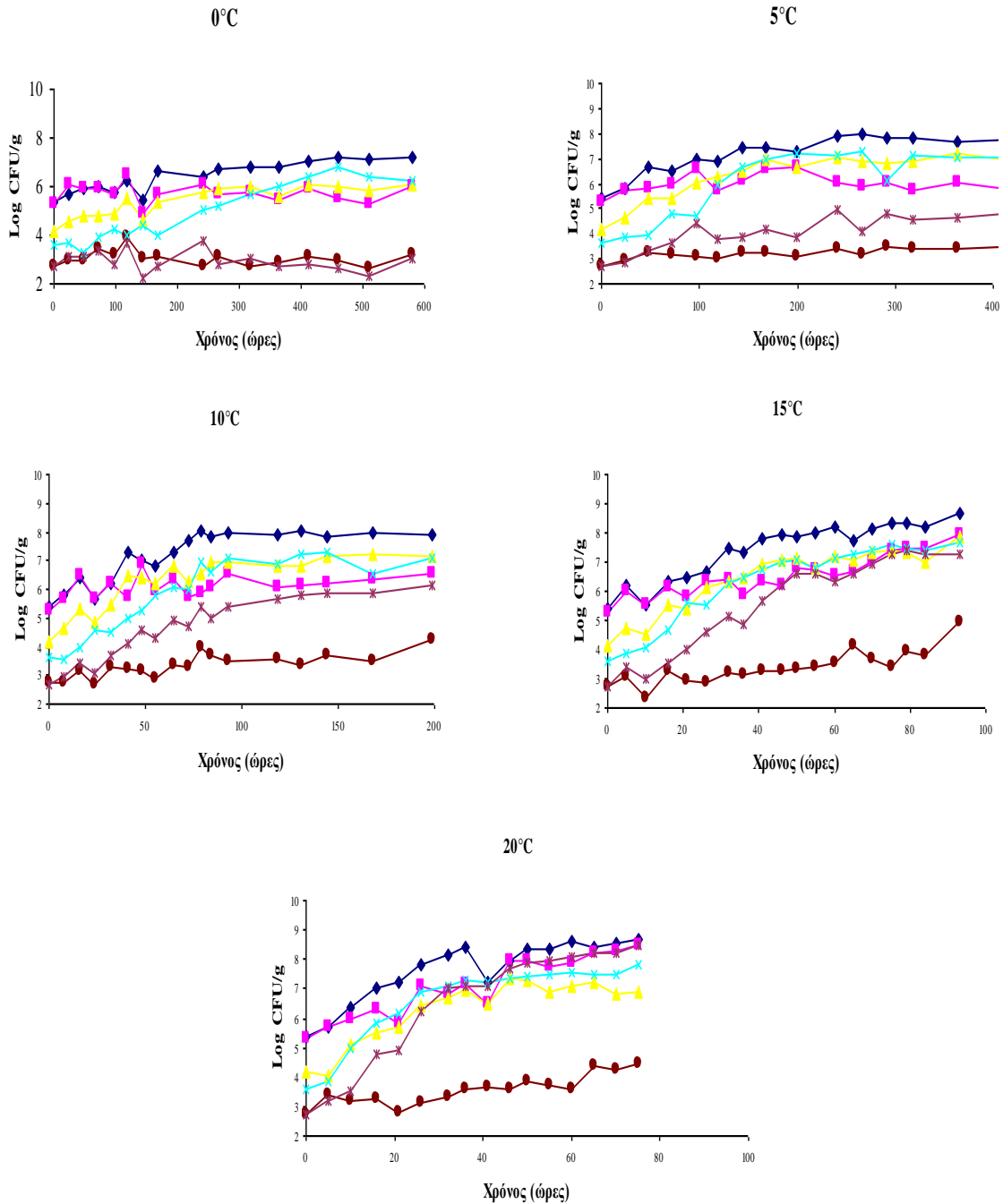
3.3.1.3. Ανάλυση του pH

Η αρχική τιμή pH του κρέατος ήταν 5,8, η οποία βρίσκεται μέσα στο εύρος των φυσιολογικών τιμών για το φρέσκο κρέας. Κατά τη συντήρηση των δειγμάτων κρέατος δεν βρέθηκε κάποια σχέση μεταξύ της τιμής του pH και της αλλοίωσης του κρέατος, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων ερευνητών, οι οποίοι αναφέρουν πως η χρήση του pH ως δείκτη αλλοίωσης ή προσδιορισμού της εκτιμώμενης διάρκειας ζωής είναι ανεπαρκής (Ellis et al., 2002, 2004). Σε γενικές γραμμές, η τιμή του pH άρχισε να αυξάνεται κατά την αερόβια αλλοίωση όταν οι βακτηριακοί πληθυσμοί πλησίαζαν τους 8,0 log CFU/g, αποτέλεσμα το οποίο είναι συγκρίσιμο με αυτά των Ellis et al. (2004), οι οποίοι ανέφεραν ότι στην περίπτωση αλλοίωσης πουλερικών, το pH κυμαινόταν μεταξύ του εύρους φυσιολογικών τιμών και αυξήθηκε μόνο όταν οι βακτηριακοί πληθυσμοί έφτασαν τους 8,0 log CFU/g. Αντίστοιχα, κατά τη συντήρηση σε

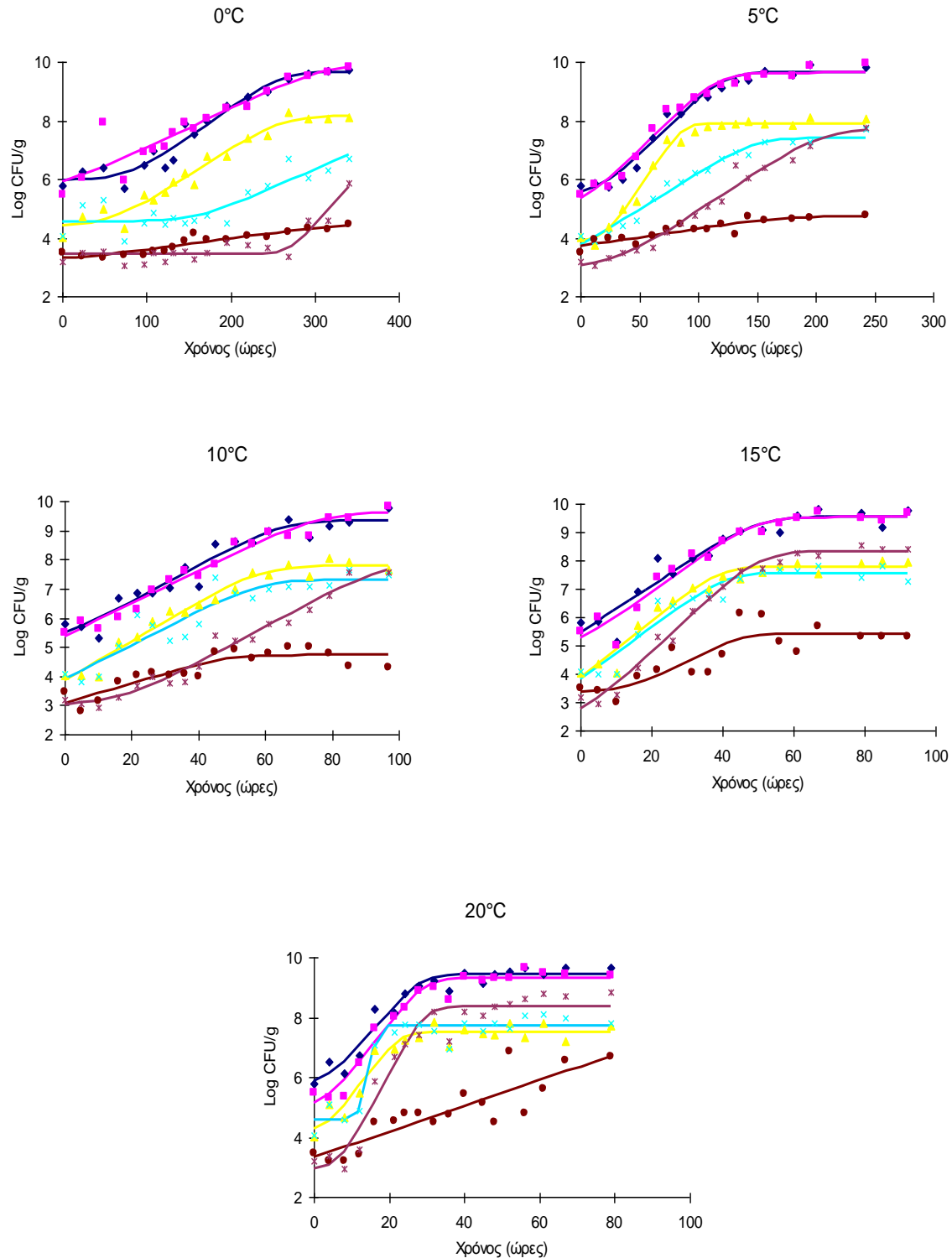
συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, το pH μειώθηκε προς το τέλος της διάρκειας ζωής του κρέατος.



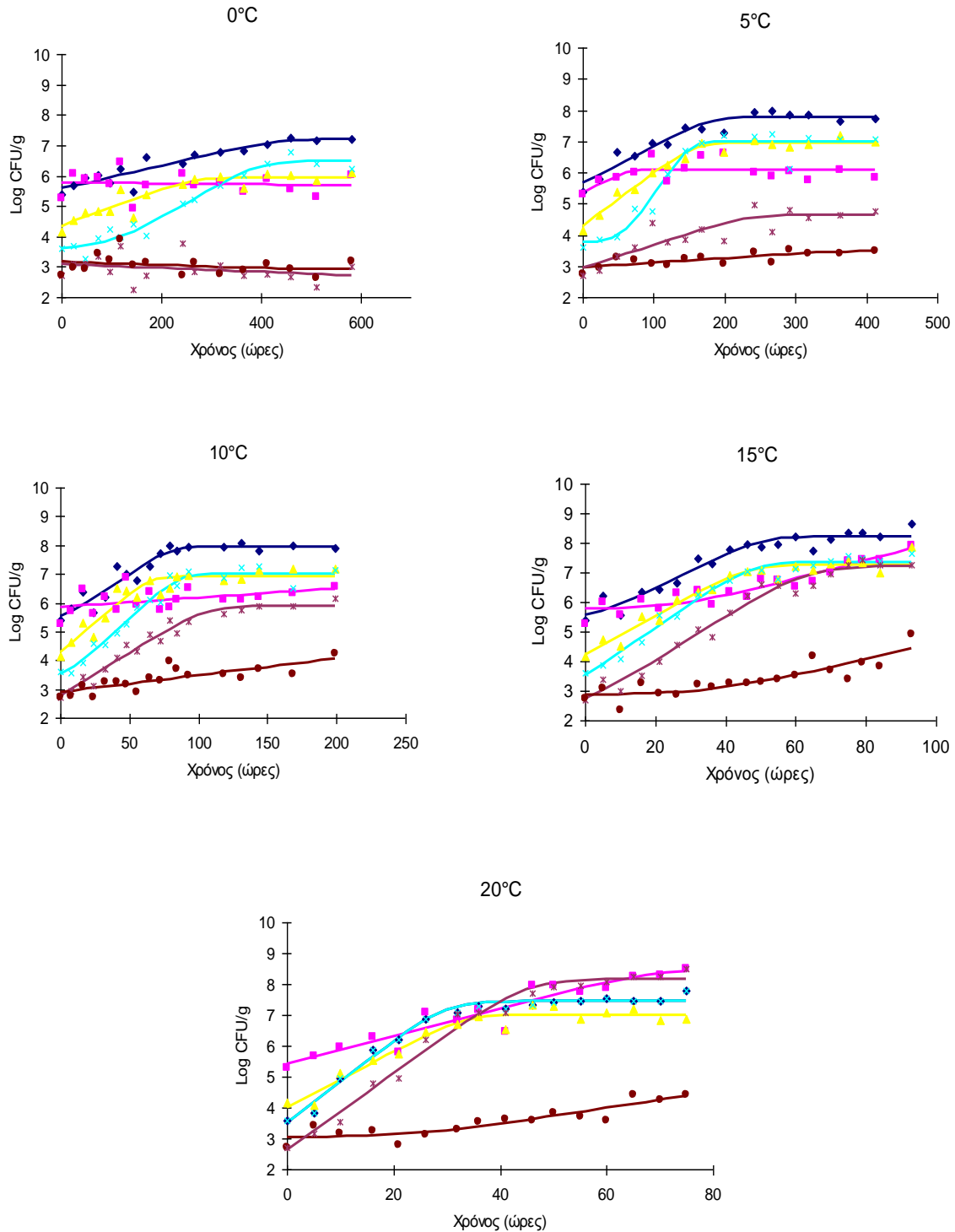
Εικόνα 3.3.1: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε αερόβιες συνθήκες. ◆: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ■: *Pseudomonas* spp, ▲: *Brochothrix thermosphacta*, ×: Γαλακτικά βακτήρια, ★: *Enterobacteriaceae*, ●: Ζύμες



Εικόνα 3.3.2: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. ◆: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ■: *Pseudomonas* spp, ▲: *Brochothrix thermosphacta*, ×: Γαλακτικά βακτήρια, ★: *Enterobacteriaceae*, ●: Ζύμες



Εικόνα 3.3.3: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε αερόβιες συνθήκες. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης έπειτα από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ◆: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ■: *Pseudomonas* spp., ▲: *Brochothrix thermosphacta*, ×: Γαλακτικά βακτήρια, ★: *Enterobacteriaceae*, ●: Ζύμες

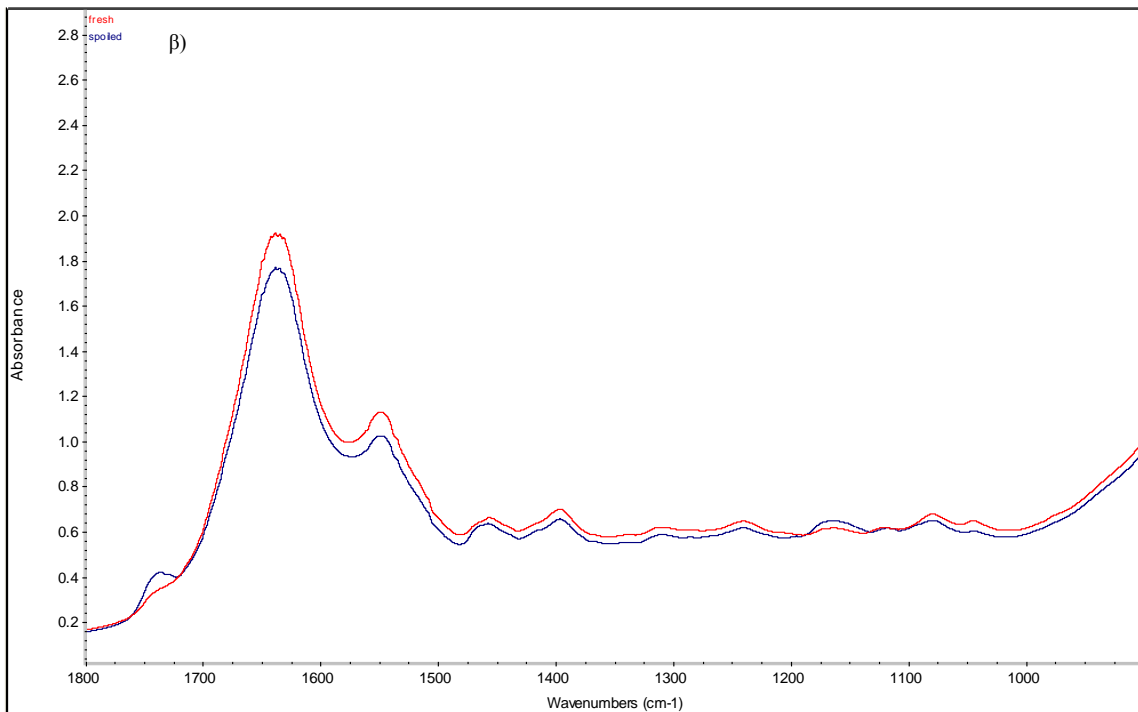
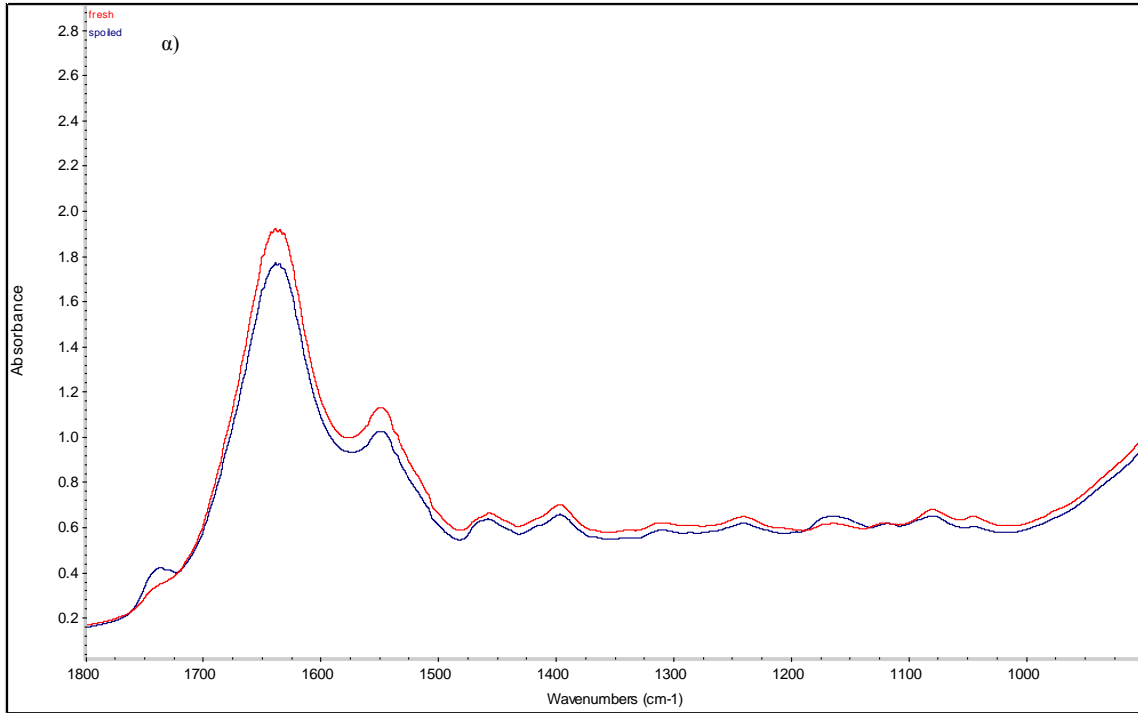


Εικόνα 3.3.4: Ανάπτυξη της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης έπειτα από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ◆: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ■: *Pseudomonas* spp, ▲: *Brochothrix thermosphacta*, x: Γαλακτικά βακτήρια, ★: *Enterobacteriaceae*, ●: Ζύμες

3.3.2. Ανάλυση με FTIR/ATR

Τα δείγματα χοιρινού κιμά που αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier από το κάθε πείραμα συμπεριλάμβαναν 134 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 132 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η Εικόνα 3.3.5 αντιπροσωπεύει ένα τυπικό φασματογράφημα στην περιοχή $1800-900\text{cm}^{-1}$ από δείγμα το οποίο ήταν συντηρημένο για 12 και 171 ώρες σε θερμοκρασία 0°C σε αερόβιες συνθήκες και η Εικόνα 3.3.6 ένα φρέσκο και ένα αλλοιωμένο δείγμα χοιρινού κιμά συντηρημένο για 16 και 131 ώρες σε θερμοκρασία 10°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα φασματικά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δακτυλικά αποτυπώματα (fingerprints) για τον προσδιορισμό των βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την αλλοίωση του χοιρινού κιμά. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 3.3.5 και 3.3.6, εμφανίζεται μία κορυφή στον κυματαριθμό 1640cm^{-1} , η οποία οφείλεται στο νερό (O-H) και στη συνεισφορά του Αμιδίου I (πρωτεΐνη). Μία ακόμα κορυφή παρατηρείται στην περιοχή 1550cm^{-1} εξαιτίας της απορρόφησης του Αμιδίου II (C-N δονήσεις τάσης), ενώ μία τρίτη κορυφή εμφανίζεται στον κυματαριθμό 1745cm^{-1} που οφείλεται στο λίπος (C=O δονήσεις τάσης του καρβονυλίου των τριγλυκεριδίων). Άλλες κορυφές μικρότερης έντασης παρατηρούνται στο φασματογράφημα οι οποίες εμφανίζονται στους παρακάτω κυματαριθμούς: 1458cm^{-1} (λίπος, CH_2 , σκελετική δόνηση), 1398cm^{-1} (αμίδια, C-N δονήσεις τάσης), 1311cm^{-1} και 1246cm^{-1} (αμίνες, C-N δονήσεις τάσης), 1166cm^{-1} και 1090cm^{-1} (αμίνες, ελεύθερα αμινοξέα, C-N δονήσεις τάσης) (Ammor et al., 2009, Ellis et al., 2002, Osorio et al., 2009).

Πρέπει να τονιστεί, ότι στο φασματογράφημα των Εικόνων 3.3.5 και 3.3.6 δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στις κορυφές οι οποίες να αντικατοπτρίζουν τη διαφορά στην ποιότητα ενός φρέσκου με ένα αλλοιωμένο δείγμα κρέατος. Για αυτό το λόγο, οι αναλύσεις των φασματογραφημάτων έγιναν με τη βοήθεια πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης (multivariate analysis), ώστε να προσδιοριστεί η συσχέτιση μεταξύ της ποιοτικής και ποσοτικής αλλοίωσης του κρέατος με τα φασματικά δεδομένα που προκύψαν από το FTIR.

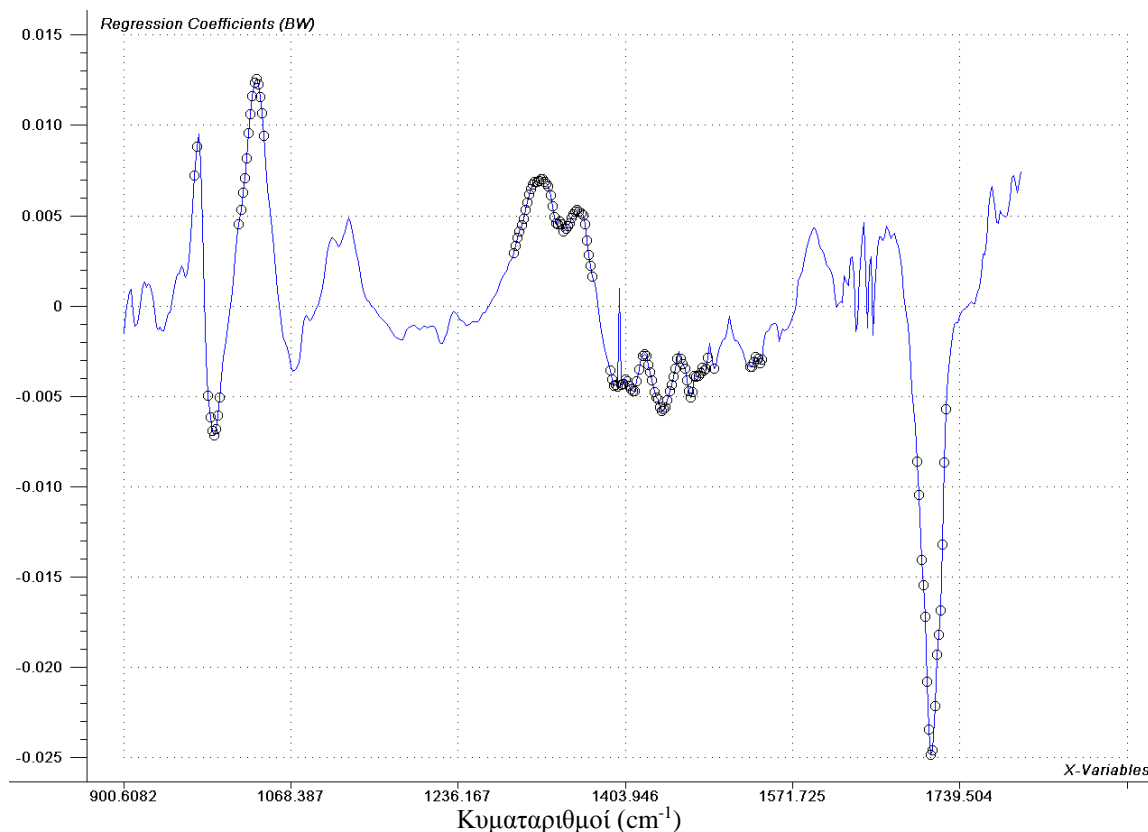


Εικόνα 3.3.5: Τυπικό φασματογράφημα στους κυματαριθμούς 1800-900cm⁻¹ από ένα φρέσκο και ένα αλλοιωμένο δείγμα χοιρινού κιμά συντηρημένο για α) 12 και 171 ώρες σε θερμοκρασία 0°C σε αερόβιες συνθήκες και β) 16 και 131 ώρες σε θερμοκρασία 10°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

3.3.2.1. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες

Για την εκτίμηση της ποιότητας του κρέατος συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες σε 4 θερμοκρασίες (0, 5, 10 και 15°C), δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Διακριτικής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) (βλέπε κεφ. 2), ενώ για την εκτίμηση του πληθυσμού των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Γραμμικής Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-R) (βλέπε κεφ. 2). Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου αριθμού λανθανουσών μεταβλητών (Latent Variables), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation) κατά την ανάπτυξη του μοντέλου. Κατά την ανάπτυξη του μοντέλου, ένα δείγμα αφαιρέθηκε από την ανάλυση ως έκτοπο (outlier) λόγω των ακραίων τιμών που παρουσίαζε, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη του μοντέλου να γίνει με 66 δείγματα χοιρινού κιμά.

Στη φασματοσκοπία είναι σύνηθες να επιλέγονται συγκεκριμένοι κυματαριθμοί ώστε το μοντέλο να είναι το βέλτιστο δυνατό, δηλαδή να περιέχει το μικρότερο αριθμό μεταβλητών χωρίς αυτό να αποβαίνει σε βάρος της επίδοσης του μοντέλου. Έτσι, στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκαν οι πιο σημαντικοί κυματαριθμοί με τη βοήθεια των συντελεστών παλινδρόμησης (b-coefficients). Υψηλές τιμές (θετικές ή αρνητικές) των συντελεστών υποδηλώνουν σημαντική επίδραση της συγκεκριμένης μεταβλητής. Η Εικόνα 3.3.7 παρουσιάζει τους συντελεστές παλινδρόμησης (μαύρα σύμβολα) σε όλο το εύρος του φάσματος 1800-900cm⁻¹. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση των δεδομένων επικεντρώθηκε μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος, οι οποίες ήταν οι παρακάτω: 971-973cm⁻¹ (φωσφορικός δεσμός, P-O), 985-997cm⁻¹ (πρωτεΐνη), 1016-1041cm⁻¹ (γλυκοζιτικός δεσμός, C-O-C), 1292-1371cm⁻¹ (αμίνες και Αμίδιο III), 1388-1486cm⁻¹ (C-H δονήσεις κάμψης, λίπος), 1529-1540cm⁻¹ (Αμίδιο II, πρωτεΐνη), και 1697-1726cm⁻¹, (λίπος, Αμίδιο I και H-O-H δονήσεις κάμψης λόγω υγρασίας) (Ellis et al., 2004, Pedersen et al., 2003).



Εικόνα 3.3.6: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης στο εύρος 1800-900 cm^{-1} του φάσματος. Οι επιλεγμένες περιοχές συμβολίζονται με μαύρο (\circ)

3.3.2.1.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση των δεδομένων προκειμένου να ταξινομηθούν τα δείγματα κρέατος κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε κλάσεις ποιότητας σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακα διπλής εισόδου (Πίνακας 3.3.5), όπου φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις τρεις προκαθορισμένες κατηγορίες ποιότητας (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο). Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου έδωσαν ακρίβεια της πρόβλεψης στα δεδομένα εκπαίδευσης 93,3% και κατά την επικύρωση του μοντέλου 87,7%. Συγκεκριμένα, κατά την εκπαίδευση του μοντέλου, η ανάλυση PLS-DA έδωσε σχεδόν 100% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί αλλοιωμένα, ενώ για τα φρέσκα ή σχετικά φρέσκα δείγματα οι προβλέψεις ήταν 93,3% και 86,7% αντίστοιχα.

Τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε 1 εσφαλμένη ταξινόμηση επί συνόλου 15 φρέσκων δειγμάτων κιμά, ενώ για τα σχετικά φρέσκα δείγματα έγιναν 2 λανθασμένες ταξινομήσεις επί 15 συνολικά δειγμάτων στην εν λόγω κλάση ποιότητας. Ωστόσο, κατά την επικύρωση του μοντέλου τα αντίστοιχα ποσοστά της κατάταξης σε κλάσεις ποιότητας, ήταν χαμηλότερα, κάτι που δεν είναι ασυνήθιστο, καθώς τα δεδομένα των κλάσεων ποιότητας που έχουν προέλθει από την οργανοληπτική αξιολόγηση του κρέατος από την ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου δεν δόθηκαν στο μοντέλο κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης, αλλά χρησιμοποιήθηκαν μόνο ως άγνωστες περιπτώσεις της ποιοτικής κατηγορίας που ανήκε το κρέας, για πρόβλεψη. Ειδικότερα, το ποσοστό ταξινόμησης (ευαισθησία) για τις τρεις ποιοτικές κατηγορίες (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο) ήταν 86,7, 87,5, και 88,9%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.3.5). Το ποσοστό των λανθασμένων παρατηρήσεων στην «ασφαλή» πλευρά (fail safe), δηλαδή δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία φρέσκα και ταξινομούνται ως σχετικά φρέσκα καθώς επίσης και δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία σχετικά φρέσκα και ταξινομούνται ως αλλοιωμένα, ήταν 2,98%, ποσοστό το οποίο αντιστοιχούσε σε 2 περιπτώσεις επί συνόλου 67 δειγμάτων. Επιπρόσθετα, οι λανθασμένες ταξινομήσεις στην «επικίνδυνη» πλευρά (fail dangerous), δηλαδή δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία σχετικά φρέσκα και ταξινομούνται ως φρέσκα καθώς επίσης και δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία αλλοιωμένα και ταξινομούνται στις άλλες δύο κατηγορίες, ήταν 8,95%, ποσοστό το οποίο αντιστοιχούσε σε 6 περιπτώσεις επί συνόλου 67 δειγμάτων. Πρέπει πάντως να τονιστεί πως κανένα φρέσκο δείγμα δεν ταξινομήθηκε ως αλλοιωμένο ή το αντίθετο, υποδεικνύοντας πως τα φάσματα που λαμβάνονται με το FTIR μπορούν να δώσουν βιοχημικά αποτυπώματα ικανά να ξεχωρίσουν με μεγάλη ακρίβεια τις δύο αυτές κατηγορίες ποιότητας.

3.3.2.1.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στο χοιρινό κιμά. Εφαρμόστηκαν μαθηματικά μοντέλα PLS-R χρησιμοποιώντας ως μεταβλητές εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) τις επιλεγμένες λανθάνουσες μεταβλητές

(βλέπε κεφ. 3.3.2.1.1.) και ως μεταβλητές εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) τους πληθυσμούς της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* και των γαλακτικών βακτηρίων. Πρέπει να τονιστεί πως δεν εφαρμόστηκε μοντέλο παλινδρόμησης για τις περιπτώσεις των *Enterobacteriaceae* και των ζυμών διότι οι παραπάνω μικροβιακές ομάδες παρουσίασαν εκτεταμένη φάση προσαρμογής (Πίνακας 3.3.1), ενώ η ανάπτυξή τους ξεκίνησε αφού τα δείγματα είχαν ήδη χαρακτηριστεί ως αλλοιωμένα από την οργανοληπτική ομάδα αξιολόγησης. Το μοντέλο αναπτύχθηκε με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε η πρώτη επανάληψη του πειράματος να χρησιμοποιηθεί για την εκπαίδευση του μοντέλου, ενώ η δεύτερη επανάληψη να χρησιμοποιηθεί για την επικύρωσή του. Η PLS προβάλλει τα δεδομένα σε ένα λανθάνον χώρο (latent space) εξαγοντας έναν αριθμό κυρίων συνιστωσών, γνωστών και ως λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables, LV) σε ορθογώνια δομή. Η πρώτη μεταβλητή φέρει το μεγαλύτερο ποσοστό των πληροφοριών ακολουθούμενη από τη δεύτερη κ.ο.κ. Ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη του μοντέλου είναι ο καθορισμός του βέλτιστου αριθμού των λανθανουσών μεταβλητών. Χρησιμοποιήθηκε διασταυρούμενη επικύρωση με τη μέθοδο leave-one-out-cross validation για να υπολογιστεί ο σωστός αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών. Εάν χρησιμοποιηθεί μικρός αριθμός, τότε είναι πιθανό να προκύψει ένα μοντέλο που περιγράφει ανεπαρκώς τα δεδομένα, ενώ εάν χρησιμοποιηθούν πάρα πολλές μεταβλητές μπορεί να προκύψει αλληλοεπικάλυψη των δεδομένων (Nilsen et al., 2002, Liu et al. 2004). Η Εικόνα 3.3.7 απεικονίζει τον αριθμό των μεταβλητών που εξηγούν την παραλλακτικότητα των δεδομένων. Φαίνεται ότι η παραλλακτικότητα των δεδομένων κατά την ανάπτυξη του μοντέλου αυξάνει απότομα ανάμεσα στις πρώτες έξι λανθάνουσες μεταβλητές και στη συνέχεια αρχίζει να μειώνεται σταδιακά. Έτσι, επιλέχθηκαν 6 μεταβλητές, οι οποίες έδωσαν το υψηλότερο ποσοστό διακύμανσης κατά την ανάπτυξη του μοντέλου για κάθε μικροβιακό πληθυσμό. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως υπήρξε καλός συσχετισμός μεταξύ των δεδομένων του FTIR και των μικροβιολογικών δεδομένων. Οι δείκτες επίδοσης κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.6. Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor, B_f) για όλες τις μικροβιακές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στην τιμή 1, αποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική υπο- ή υπερ- εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας

(accuracy factor, A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν 7,5% και 7,9% για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και τις *Pseudomonas* spp. αντίστοιχα, ενώ για τα γαλακτικά βακτήρια και τον *B. thermosphacta* οι αντίστοιχες τιμές ήταν 10,7% και 11,3%. Όσον αφορά στο συντελεστή συσχέτισης (r) μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων η τιμή του υπολογίστηκε άνω του 0,826. Σύμφωνα με τους Ait-Kaddour et al. (2011), τιμές r μεταξύ 0,83-0,86 είναι αποδεκτές για τις περισσότερες εφαρμογές. Η καλύτερη συσχέτιση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων βρέθηκε για τα γαλακτικά βακτήρια και για τις *Pseudomonas* spp. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στην Εικόνα 3.3.8, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων σε log CFU/g.

Πίνακας 3.3.5: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-DA

Από/Σε	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα	Σύνολο	Ευαισθησία (%)
Δεδομένα εκπαίδευσης (n = 66)					
Φρέσκα	14	1	0	15	93,3
Σχετικά φρέσκα	2	13	0	15	86,7
Αλλοιωμένα	0	0	36	36	100,0
Ακρίβεια της πρόβλεψης					93,3
Δεδομένα επικύρωσης (n=67)					
Φρέσκα	13	2	0	15	86,7
Σχετικά φρέσκα	2	14	0	16	87,5
Αλλοιωμένα	0	4	32	36	88,9
Ακρίβεια της πρόβλεψης					87,7

Πίνακας 3.3.6: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά με τα φασματικά δεδομένα σε δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες

Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	$r_{\text{εκπαίδευσης}}$	$r_{\text{επικύρωσης}}$
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0,984	1,075	0,781	0,674	0,895	0,88
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,998	1,079	0,764	0,714	0,854	0,865
<i>B. thermosphacta</i>	1,018	1,113	0,834	0,804	0,808	0,826
Γαλακτικά βακτήρια	0,99	1,107	0,594	0,67	0,878	0,87

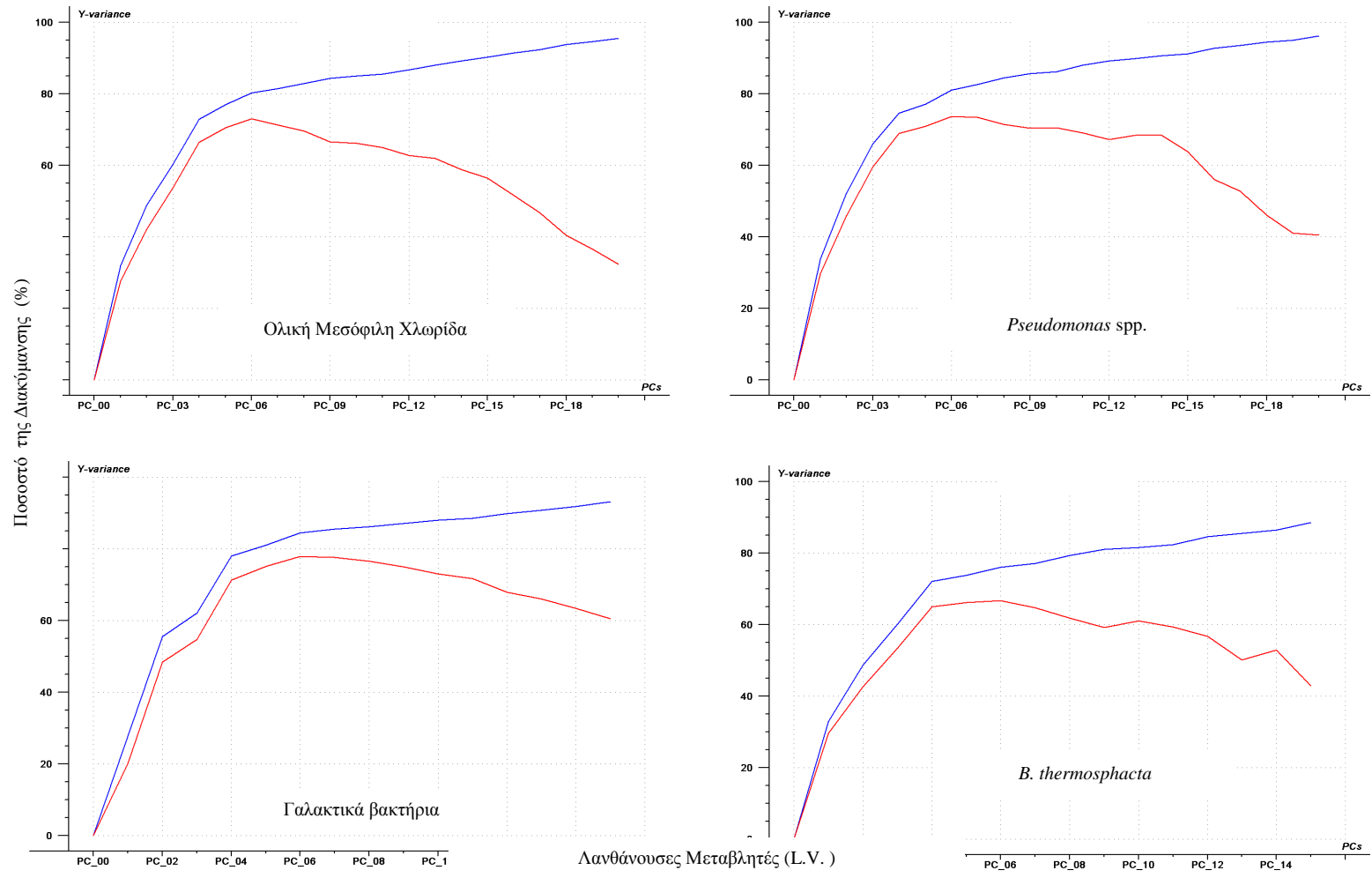
B_f : Bias factor, συντελεστής προκατάληψης

A_f : Accuracy factor, συντελεστής ακρίβειας

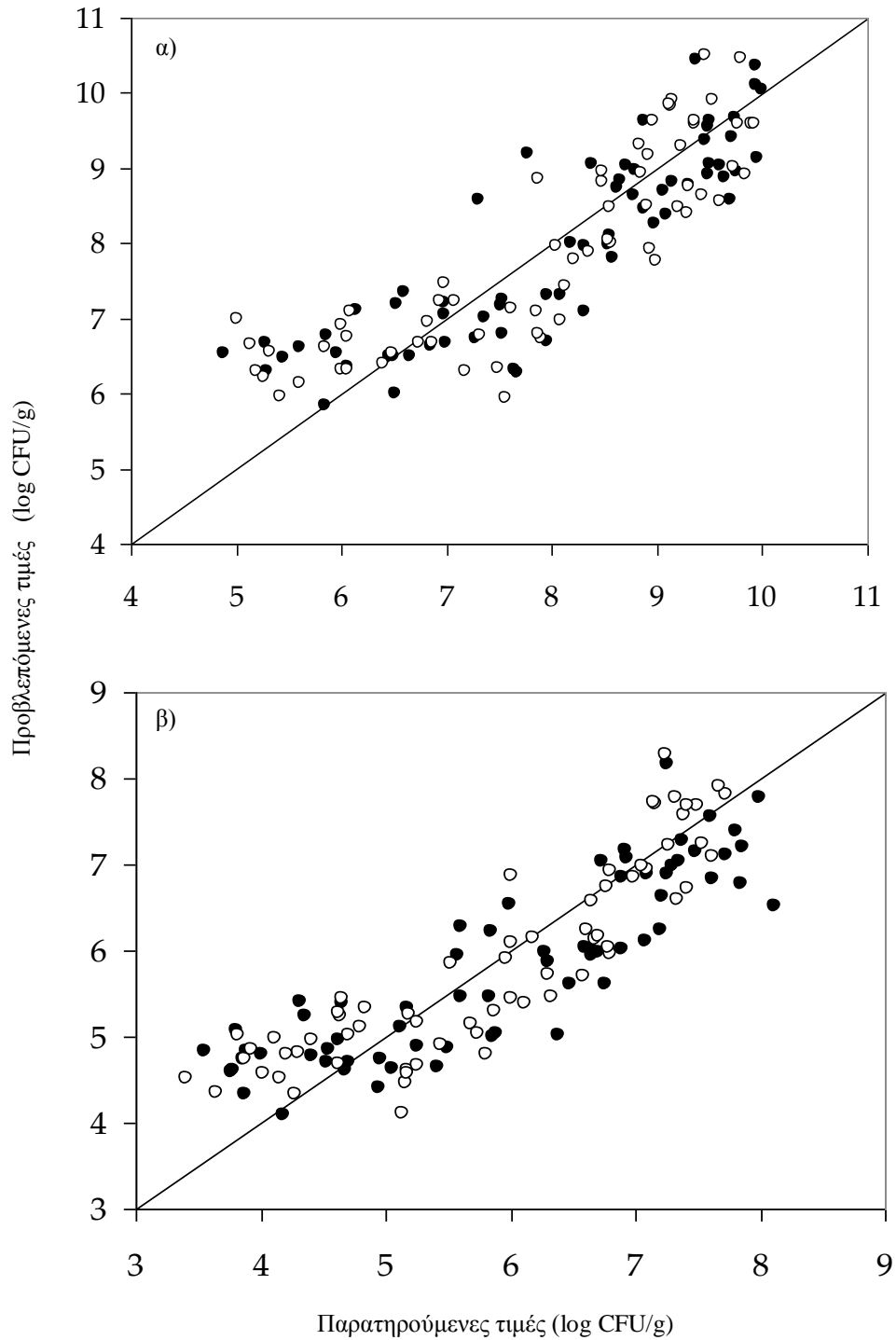
SEC: Standard error of prediction, τυπικό σφάλμα πρόβλεψης

SEP: Standard error of calibration, τυπικό σφάλμα βαθμονόμησης

r : συντελεστής συσχέτισης



Εικόνα 3.3.7: Βελτιστοποίηση του μοντέλου παλινδρόμησης (PLS-R) χρησιμοποιώντας λανθάνουσες μεταβλητές με εύρος 1 έως 20 κατά την **εκπαίδευση** και την **επικύρωση** των δεδομένων έπειτα από διασταυρούμενη επικύρωση με τη μέθοδο leave-one-out cross validation (LOOCV)

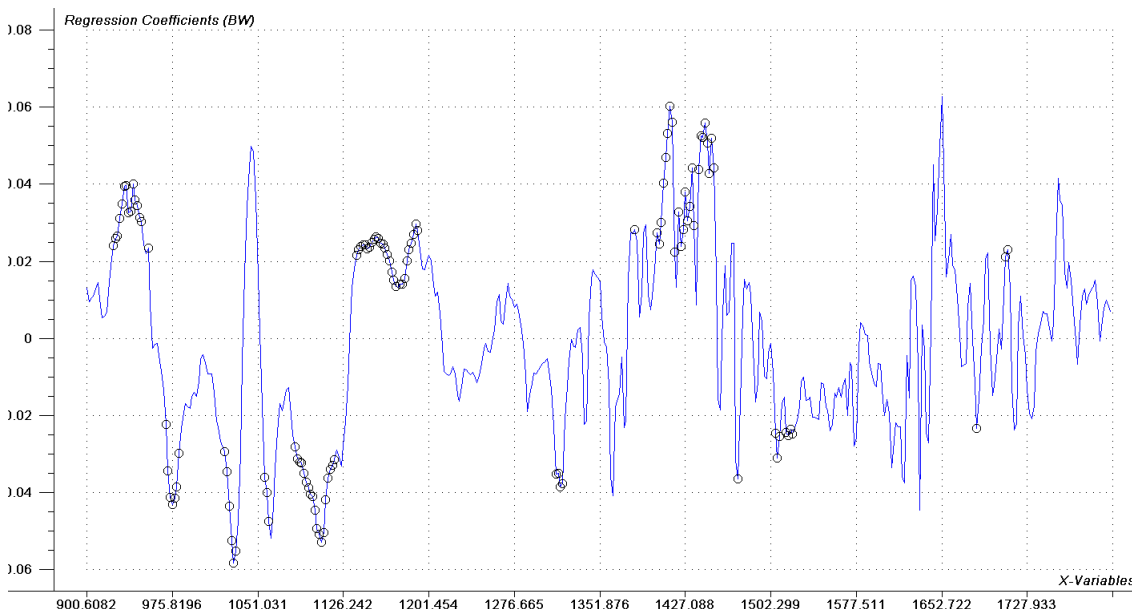


Εικόνα 3.3.8: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των *Pseudomonas* spp. (α) και των γαλακτικών βακτηρίων (β) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS-R (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης).

3.3.2.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Για την εκτίμηση της ποιότητας του χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες σε 4 θερμοκρασίες (0, 5, 10 και 15°C), δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα PLS-DA (βλέπε κεφ. 2), ενώ για την εκτίμηση των διαφορών ομάδων μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PLS-R (βλέπε κεφ. 2). Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου αριθμού λανθανουσών μεταβλητών (Latent Variables) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation) κατά την ανάπτυξη του μοντέλου. Κατά την ανάπτυξη του μοντέλου, δύο δείγματα αφαιρέθηκαν από την ανάλυση ως έκτοπα (outlier), με αποτέλεσμα η εκπαίδευση του μοντέλου να γίνει με 64 δείγματα χοιρινού κιμά. Όπως και στην περίπτωση της ανάλυσης του χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες, έτσι και σε αυτήν τη περίπτωση έγινε προσδιορισμός των πιο σημαντικών κυματαριθμών βάσει των συντελεστών παλινδρόμησης. Η Εικόνα 3.3.9 παρουσιάζει τους συντελεστές παλινδρόμησης (μαύρα σύμβολα) σε όλο το εύρος του φάσματος 1800-900cm⁻¹. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση των δεδομένων επικεντρώθηκε μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος, οι οποίες ήταν οι παρακάτω:

927-954cm⁻¹ (λίπος, εστερική ομάδα), 971-980cm⁻¹ (φωσφορικός δεσμός, P-O), 1020-1041cm⁻¹ (γλυκοζιτικός δεσμός, C-O-C), 1056-1062cm⁻¹ (αμίνες, C-N δονήσεις τάσης), 1083-1126cm⁻¹ (αμίνες, C-N δονήσεις τάσης, πρωτεόλυση), 1137-1141, 1315-1320 και 1471cm⁻¹ λίπος (C-O), 1384-1450cm⁻¹ (C-H δονήσεις κάμψης, λίπος), 1510-1525cm⁻¹ (Αμίδιο II, πρωτεΐνη), και 1683-1710cm⁻¹, (λίπος, Αμίδιο I and H-O-H δονήσεις κάμψης λόγω υγρασίας) (Ellis et al., 2002, 2004, Panagou et al., 2011, Pedersen, et al., 2003).



Κυμαριθμοί (cm^{-1})

Εικόνα 3.3.9: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης στο εύρος $1800\text{-}900\text{cm}^{-1}$ του φάσματος. Οι επιλεγμένες περιοχές συμβολίζονται με μαύρο (°)

3.3.2.2.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση των δεδομένων προκειμένου να ταξινομηθούν τα δείγματα κρέατος κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε κλάσεις ποιότητας σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακα διπλής εισόδου (Πίνακας 3.3.7), όπου φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις τρεις προκαθορισμένες κατηγορίες ποιότητας (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο). Για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου επιλέχθηκαν 6 λανθάνουσες μεταβλητές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.7, όπου φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες. Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου έδωσαν υψηλό βαθμό συσχέτισης στα δεδομένα εκπαίδευσης (ακρίβεια της πρόβλεψης: 84,70%), ενώ στην επικύρωση του μοντέλου τα αποτελέσματα ήταν χαμηλότερα (ακρίβεια της πρόβλεψης: 79,30%). Κατά την εκπαίδευση του μοντέλου η PLS-DA έδωσε 94,1% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί αλλοιωμένα, ενώ για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως

φρέσκα ή σχετικά φρέσκα οι προβλέψεις ήταν 80,0% και στις δύο περιπτώσεις. Τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε 3 εσφαλμένες ταξινομήσεις επί συνόλου 15 φρέσκων δειγμάτων κιμά, ενώ για τα δείγματα που έχουν χαρακτηριστεί ως σχετικά φρέσκα έγιναν 3 λανθασμένες ταξινομήσεις επί συνόλου 15 δειγμάτων κιμά στην εν λόγω ποιοτική κατηγορία. Τέλος, από τα αλλοιωμένα δείγματα έγιναν 2 εσφαλμένες ταξινομήσεις επί συνόλου 34 δειγμάτων.

Κατά την επικύρωση του μοντέλου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν χαμηλότερα, κάτι που δεν είναι ασυνήθιστο, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Ειδικότερα, το ποσοστό ταξινόμησης (ευαισθησία) για τις τρεις ποιοτικές κατηγορίες (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο) ήταν 87,5, 53,3 και 97,1% αντίστοιχα (Πίνακας 3.3.7). Το ποσοστό των λανθασμένων παρατηρήσεων στην «ασφαλή» πλευρά (fail safe) ήταν 10,6%, το οποίο αντιστοιχούσε σε 7 περιπτώσεις επί συνόλου 66 δειγμάτων. Επιπρόσθετα, οι λανθασμένες ταξινομήσεις στην «επικίνδυνη» πλευρά (fail dangerous) ήταν 4,54%, ποσοστό που αντιστοιχούσε σε 3 περιπτώσεις επί συνόλου 66 δειγμάτων. Αντίθετα, από τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στην αερόβια αλλοίωση του κιμά, στην αλλοίωση με τροποποιημένη ατμόσφαιρα φαίνεται πως η διάκριση μεταξύ των κλάσεων είναι αρκετά ασαφής, ιδιαίτερα στη διάκριση μεταξύ σχετικά φρέσκων με αλλοιωμένα ή φρέσκα δείγματα.

Πίνακας 3.3.7: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, όπως προέκυψε έπειτα από ανάλυση PLS-DA

Από/Σε	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα	Σύνολο	Ευαισθησία (%)
Δεδομένα εκπαίδευσης (n = 64)					
Φρέσκα	12	3	0	15	80,0
Σχετικά φρέσκα	3	12	0	15	80,0
Αλλοιωμένα	2	0	32	34	94,1
Ακρίβεια της πρόβλεψης					84,7

Δεδομένα επικύρωσης (n=66)					
Φρέσκα	14	1	1	16	87,5
Σχετικά φρέσκα	2	8	5	15	53,3
Αλλοιωμένα	1	0	34	35	97,1
Ακρίβεια της πρόβλεψης					79,3

3.3.2.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα των διάφορων ομάδων των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στο χοιρινό κιμά. Εφαρμόστηκαν μαθηματικά μοντέλα PLS-R χρησιμοποιώντας ως μεταβλητές εισόδου τις επιλεγμένες λανθάνουσες μεταβλητές (βλέπε κεφ. 3.3.2.1.2.) και ως μεταβλητές εξόδου τους πληθυσμούς της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, των *Pseudomonas* spp., του *B. thermosphacta* και των γαλακτικών βακτηρίων για κάθε περίπτωση. Πρέπει να τονιστεί πως δεν εφαρμόστηκε μοντέλο παλινδρόμησης για τις περιπτώσεις των *Enterobacteriaceae* και των ζυμών, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω. Το μοντέλο αναπτύχθηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε η πρώτη επανάληψη του πειράματος να χρησιμοποιηθεί για την εκπαίδευση του μοντέλου, ενώ η δεύτερη επανάληψη για την επικύρωσή του. Η Εικόνα 3.3.10, απεικονίζει τον αριθμό των λανθάνουσων μεταβλητών που εξηγούν την παραλλακτικότητα των δεδομένων. Φαίνεται ότι η παραλλακτικότητα του συνόλου δεδομένων ελέγχου αυξάνεται μέχρι τις πρώτες έξι λανθάνουσες μεταβλητές και στη συνέχεια αρχίζει να μειώνεται σταδιακά. Έτσι, επιλέχθηκαν 6 μεταβλητές οι οποίες έδωσαν το υψηλότερο ποσοστό διακύμανσης κατά την ανάπτυξη του μοντέλου για κάθε μικροβιακό πληθυσμό. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως υπήρξε καλός συσχετισμός μεταξύ των δεδομένων του FTIR και των μικροβιολογικών δεδομένων. Οι δείκτες επίδοσης κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.8. Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor) για όλες τις μικροβιακές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν

κοντά στην τιμή 1, αποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική, υπό ή υπερ-εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (accuracy factor), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν 6,0% και 5,9% για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και τις *Pseudomonas* spp. αντίστοιχα, ενώ για τα γαλακτικά βακτήρια και τον *B. thermosphacta* οι αντίστοιχες τιμές ήταν 8,7% και 10,5%. Όσον αφορά στο συντελεστή συσχέτισης (r) μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων στο μοντέλο η τιμή του βρέθηκε άνω του 0,80 μόνο στην περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων ($r=0,836$), ενώ για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0,65-0,77. Τιμές συντελεστή συσχέτισης μεταξύ 0,66-0,81 είναι αποδεκτές για έλεγχο και πρόβλεψη κατά προσέγγιση (Ait-Kaddour et al., 2011). Η καλύτερη συσχέτιση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων βρέθηκε για τα γαλακτικά βακτήρια και για τον *B. thermosphacta*. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στην Εικόνα 3.3.11, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων.

Πίνακας 3.3.8: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά με τα φασματικά δεδομένα σε δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες

Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	Γεκπαίδευσης	Γεπικόρωσης
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0,991	1,060	0,656	0,55	0,696	0,77
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,994	1,059	0,483	0,428	0,565	0,654
<i>B. thermosphacta</i>	0,984	1,087	0,74	0,641	0,672	0,746
Γαλακτικά βακτήρια	1,034	1,105	0,77	0,769	0,842	0,836

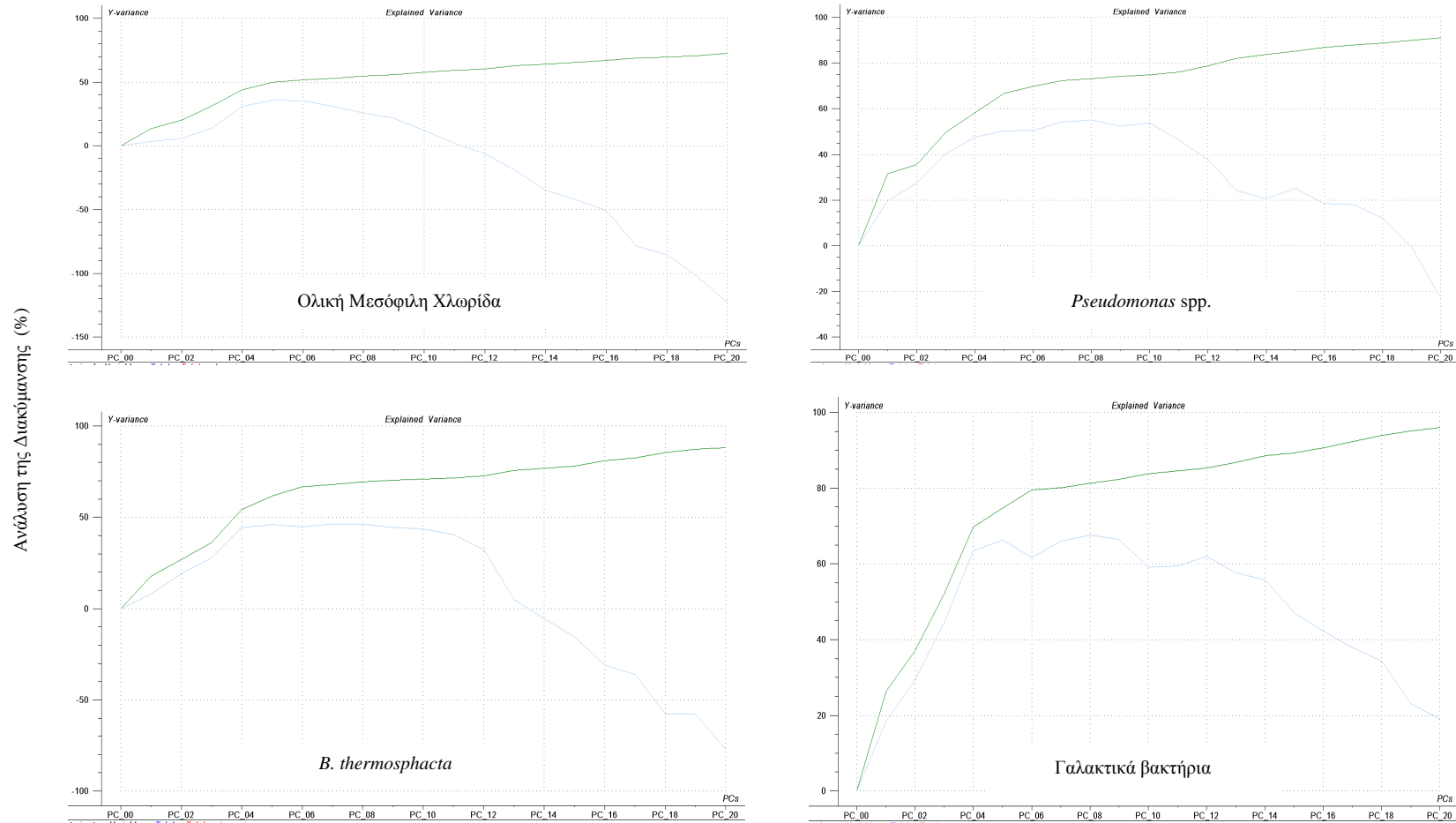
B_f : Bias factor, συντελεστής προκατάληψης

A_f : Accuracy factor, συντελεστής ακρίβειας

SEC: Standard error of prediction, τυπικό σφάλμα πρόβλεψης

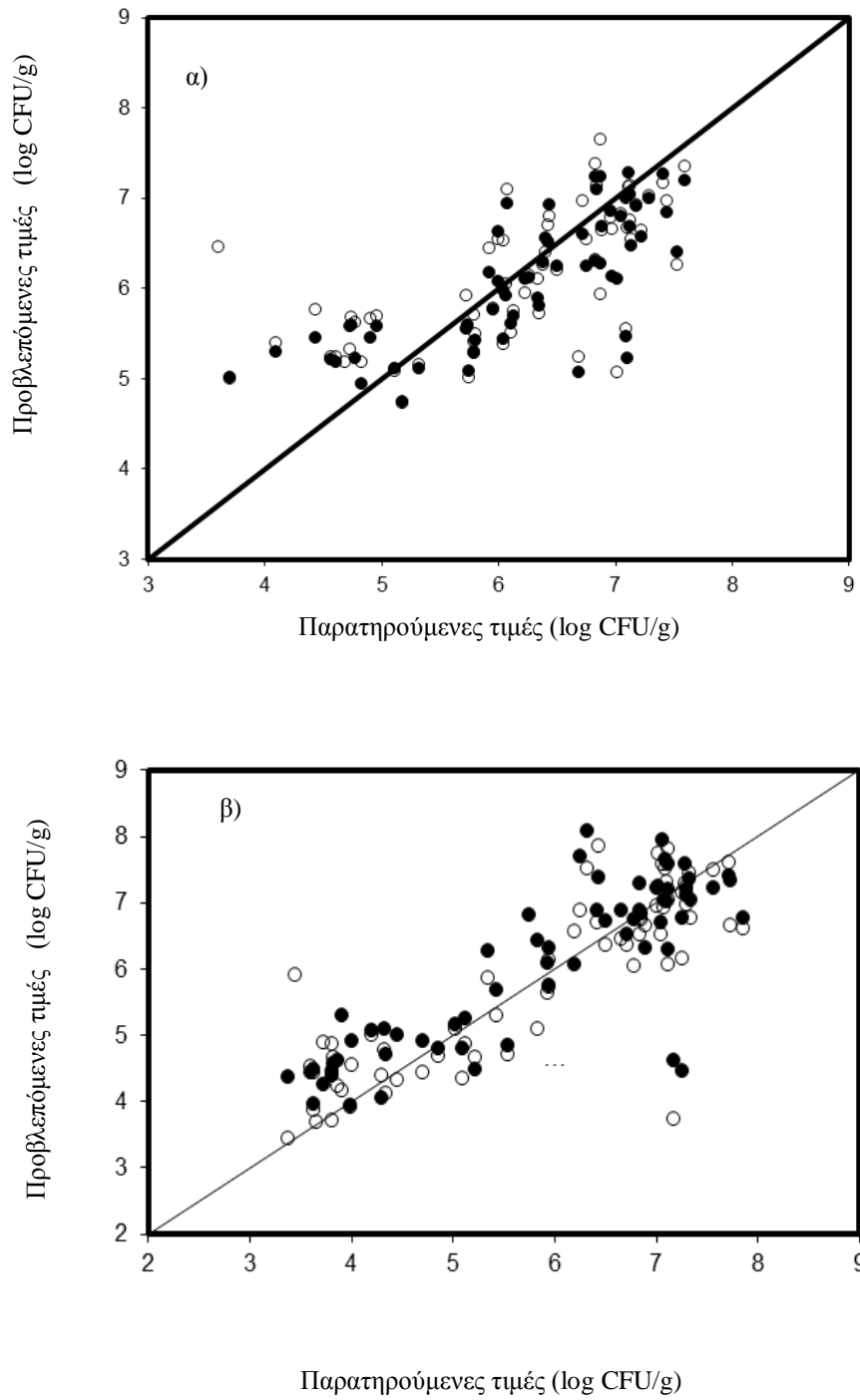
SEP: Standard error of calibration, τυπικό σφάλμα βαθμονόμησης

r : συντελεστής συσχέτισης



Λανθάνουσες Μεταβλητές (L.V.)

Εικόνα 3.3.10: Βελτιστοποίηση του μοντέλου παλινδρόμησης (PLS-R) χρησιμοποιώντας λανθάνουσες μεταβλητές με εύρος 1 έως 20 κατά την **εκπαίδευση** και την **επικύρωση** των δεδομένων έπειτα από διασταυρούμενη επικύρωση με τη μέθοδο leave-one-out cross validation (LOOCV)



Εικόνα 3.3.11: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του *B. thermosphacta* (α) και των γαλακτικών βακτηρίων (β) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)

3.3.2.3. Συζήτηση

Η αξιολόγηση της αλλοίωσης του κρέατος βασίζεται σε οργανοληπτικές και μικροβιολογικές αναλύσεις (Nychas et al., 2008). Η οργανοληπτική ανάλυση, παρόλο που είναι από τις πλέον αποδεκτές και κατάλληλες μεθόδους, απαιτεί άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό και συνεπώς την καθιστά δαπανηρή και μη ελκυστική για αναλύσεις ρουτίνας. Από την άλλη πλευρά, οι μικροβιολογικές αναλύσεις είναι είτε χρονοβόρες είτε δαπανηρές καθώς και καταστρεπτικές για το δείγμα, ενώ δεν είναι σε θέση να δώσουν την «άμεση απάντηση που απαιτείται» (Ammor et al., 2009, Nychas et al., 2008). Παράλληλα, βάσεις δεδομένων όπως είναι οι ComBase και Sym'Previs που είναι σχεδιασμένες ώστε να περιγράψουν την κινητική των μικροοργανισμών και να υπολογίζουν την εμπορική διάρκεια ζωής των τροφίμων, παρέχουν συγκεκριμένες πληροφορίες και μέχρι τώρα έχουν υποτιμηθεί παράγοντες όπως η δυναμική των μικροοργανισμών (λ.χ., παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών) (Ammor et al., 2009, Panagou et al., 2011). Έτσι έχουν γίνει προσπάθειες για την αντικατάσταση των μικροβιολογικών αναλύσεων με τις βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στο κρέας ως πιθανοί δείκτες της αξιολόγησης της αλλοίωσης του κρέατος. Κατά τα τελευταία 20 χρόνια έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες συσχέτισης των μεταβολιτών με τη μικροβιακή αλλοίωση του κρέατος και η βασική ιδέα είναι, ότι καθώς τα βακτήρια αναπτύσσονται στο κρέας καταναλώνουν θρεπτικές ουσίες και παράγουν υποπροϊόντα (Ellis & Goodacre 2001, Nychas et al., 2007). Η έννοια των metabolomics στη μικροβιολογία τροφίμων πρωτοαναφέρθηκε από τους Goodacre και συνεργάτες (Goodacre et al., 2004). Χημειομετρικές μέθοδοι (ανάλυση κυρίων συνιστωσών, ιεραρχική ομαδοποίηση δεδομένων) παράλληλα με μαθηματικά μοντέλα (τεχνητά νευρωνικά δίκτυα, ασαφής λογική) ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας του κρέατος (Ellis et al., 2002). Έτσι έγινε μια νέα προσέγγιση για να παραχθούν ταχείες πληροφορίες σχετικά με την συμβολή της εφήμερης αλλοιωγόνου χλωρίδας κατά την αλλοίωση του κρέατος ή για τον χαρακτηρισμό του κρέατος σε σχέση με τον τύπο της αλλοίωσης ή/ και τον τύπο του κρέατος (Ellis et al., 2005, Mataragas et al., 2007). Γνωρίζοντας ότι η αλλοίωση είναι αποτέλεσμα της αποσύνθεσης του κρέατος και του σχηματισμού μεταβολιτών που προκαλείται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών, οι πληροφορίες

αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν στην φασματοσκοπική ανάλυση. Ως εκ τούτου, η φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των βιοχημικών μεταβολών του υποστρώματος, επιταχύνοντας την ανίχνευση της αλλοίωσης του κρέατος (Ellis & Goodacre 2001). Η εφαρμογή του FTIR για τον έλεγχο της αλλοίωσης του κρέατος χρησιμοποιείται ήδη και έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές (Ellis and Goodacre, 2001, Ellis et al., 2002, 2004, Sinelli et al., 2010). Οι Ellis et al., (Ellis and Goodacre, 2001, Ellis et al., 2002, 2004) υπήρξαν οι πρωτοπόροι αποδεικνύοντας ότι το FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στην επιφάνεια των τροφίμων για τη παραγωγή βιοχημικών «δακτυλικών αποτυπωμάτων» (metabolic snapshots) τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταχεία ανίχνευση της μικροβιακής κατάστασης του κρέατος. Παρ' όλα αυτά, στις προαναφερθείσες μελέτες η έμφαση είχε δοθεί σε βόειο κρέας ή κρέας πουλερικών, ενώ για το χοιρινό κρέας δεν υπάρχουν πολλά ερευνητικά δεδομένα και επιπλέον η αλλοίωση εκφραζόταν μόνο μέσω της μεταβολής του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας. Στις προηγούμενες μελέτες, το δείγμα χαρακτηριζόταν ως αλλοιωμένο μόλις ο πληθυσμός της OMX ξεπερνούσε τους 7,0-8,0 λογαρίθμους, χωρίς όμως να γίνει κάποια προσπάθεια συσχέτισης φασματικών δεδομένων με τις ποιοτικές κατηγορίες του δείγματος όπως αυτές προκύπτουν από την οργανοληπτική αξιολόγηση. Επιπρόσθετα, η παρακολούθηση της αλλοίωσης αφορούσε μία μόνο θερμοκρασία συντήρησης που συνήθως ήταν η θερμοκρασία δωματίου. Νεότερες μελέτες, συσχέτισαν τα φασματικά δεδομένα του FTIR με την αλλοίωση βόειου κρέατος (μικροβιολογική και ποιοτική) το οποίο είχε συντηρηθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες και συσκευασίες (αερόβια, MAP και |MAP με την προσθήκη αιθέριου ελαίου) χρησιμοποιώντας προηγμένες στατιστικές μεθόδους όπως είναι τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα, η PLS-R, και οι Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης (Ammor et al., 2009, Argyri et al., 2010b, 2013, Panagou et al., 2011). Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν 3 κατηγορίες ποιότητας για την κατάταξη του χοιρινού κρέατος, οι οποίες ακολουθούν μία πιο ρεαλιστική αντίληψη της αλλοίωσης, παρόμοια με αυτή των καταναλωτών. Έτσι, πέρα από το «φρέσκο» και «αλλοιωμένο» δείγμα, προστέθηκε ακόμα μία ενδιάμεση κατηγορία, «σχετικά φρέσκο», στην οποία είναι εμφανή τα πρώτα σημάδια της αλλοίωσης, όπου το κρέας έχει αναπτύξει κάποια ελαφρά ανεπιθύμητη οσμή (off-odour), αλλά εξακολουθεί να είναι αποδεκτό για κατανάλωση. Στη συνέχεια, έγινε συσχέτιση

όλων των μικροβιακών ομάδων υπεύθυνων για την αλλοίωση του κρέατος. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η αλλοίωση οφείλεται σε συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών (εφήμερη αλλοιωγόνος χλωρίδα), συνεπώς η συσχέτιση αυτών μέσω φασματικών δεδομένων απλοποιεί τη διαδικασία και προσφέρεται για γρήγορη ανάλυση της μικροβιολογικής ποιότητας του κρέατος.

Από τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν παραπάνω φαίνεται πως υπήρξε αδυναμία πλήρους σωστής ομαδοποίησης μεταξύ των διαφορετικών ποιοτικών κατηγοριών στην αερόβια συντήρηση όπως και στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και ιδιαίτερα κατά την ταξινόμηση των δειγμάτων που είχαν χαρακτηριστεί στην ποιοτική κατηγορία «σχετικά φρέσκα». Άλλες παρόμοιες εργασίες όπως των Ammor et al. (2009), κατηγοριοποίησαν βόειο κιμά ο οποίος έχει συντηρηθεί σε 3 συσκευασίες και 4 θερμοκρασίες σε 3 κλάσεις ποιότητας χρησιμοποιώντας DFA στα φασματικά δεδομένα για όλες τις περιπτώσεις συσκευασίας μαζί και όχι ξεχωριστά όπως έγινε στην παρούσα μελέτη. Από τα αποτελέσματα τους, προέκυψε καλή κατηγοριοποίηση των δειγμάτων που είχαν χαρακτηριστεί ως αλλοιωμένα (80,0%) και σχετικά φρέσκα (80,3%), ενώ για τα φρέσκα δείγματα το αντίστοιχο ποσοστό ήταν χαμηλότερο (69,2%). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν κατά την κατηγοριοποίηση βόειου κιμά συντηρημένου σε 2 συσκευασίες μετά από επεξεργασία των φασμάτων του FTIR με γενετικούς αλγόριθμους (Argyri et al., 2013). Αντίθετα, στην παρούσα εργασία το ποσοστό των σωστών προβλέψεων για την κλάση «σχετικά φρέσκα» ήταν το χαμηλότερο ιδιαίτερα στην περίπτωση του χοιρινού κιμά συντηρημένου σε MAP. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στη διακύμανση των δειγμάτων και στην αβεβαιότητα της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Η επιστήμη του οργανοληπτικού ελέγχου (Sensory science) χρησιμοποιεί τις ανθρώπινες αισθήσεις ως όργανα μέτρησης και κατά συνέπεια η απόδοση του κάθε οργανολήπτη θα μπορούσε να επηρεαστεί από συστηματικά ή τυχαία σφάλματα (π.χ., αβεβαιότητα), τα οποία θα επηρεάσουν την τελική απόφαση (Versari et al., 2011). Έτσι, για να επιτευχθεί περαιτέρω βελτίωση στην πρόβλεψη, χρειάζεται καλύτερη κατάρτιση της ομάδας οργανοληπτικού ελέγχου σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ενός τυποποιημένου πρωτόκολλου για την αξιολόγηση του κρέατος. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν σε κάθε κατηγορία ποιότητας δεν ήταν ίδιος σε αριθμό λόγω του διαφορετικού ρυθμού αλλοίωσης του χοιρινού κιμά σε διαφορετικές

θερμοκρασίες συντήρησης, με αποτέλεσμα μεταβλητό αριθμό των δειγμάτων σε κάθε κλάση ποιότητας ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης. Έτσι, ο αριθμός των δειγμάτων για την αερόβια συντήρηση που είχαν χαρακτηριστεί ως αλλοιωμένα ήταν διπλάσιος από τα αντίστοιχα που είχαν χαρακτηριστεί ως φρέσκα ή σχετικά φρέσκα. Κάτι τέτοιο είναι δυνατόν να επηρέασε τη διαδικασία εκπαίδευσης και αυτό να προκάλεσε το χαμηλότερο ποσοστό ταξινόμησης στις συγκεκριμένες ποιοτικές κατηγορίες. Όσον αφορά στα δείγματα που συντηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένες ατμόσφαιρας, ένας επιπλέον παράγοντας που μπορεί να οδήγησε στην ασαφή διάκριση κυρίως στην κατηγορία των σχετικά φρέσκων δειγμάτων είναι η διαφορετική πορεία της αλλοίωσης που ακολουθεί το κρέας κατά τη συντήρησή του σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Σύμφωνα με τους Argyri et al. (2011) και Nychas & Skandamis (2005), κατά την αλλοίωση του κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας οι μεταβολίτες που παράγονται διαφέρουν από τους αντίστοιχους της αερόβιας αλλοίωσης. Έτσι, ενώ στην αερόβια αλλοίωση οι *Pseudomonas* spp αναπτύσσονται γρήγορα χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη του υποστρώματος, παράγοντας ως τελικά προϊόντα αμινοξέα, αμίνες, πυροσταφυλικό και οξικό οξύ, κατά την αλλοίωση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, οι μικροοργανισμοί που επικρατούν είναι τα γαλακτικά βακτήρια και ο *Brochothrix thermosphacta*, οι οποίοι παράγουν κυρίως διάφορα οξέα (Borch et al., 1996, Dainty, 1996, Ercolini et al., 2006, Nychas et al., 2008). Η αλλοίωση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι ηπιότερη σε σύγκριση με την αερόβια και είναι πιθανόν να μη γίνεται εύκολα αντιληπτή από την ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή λάθος κατηγοριοποίηση ενός δείγματος από την ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου το οποίο οδηγεί σε ελλιπή εκπαίδευση του μοντέλου. Τέλος, οι δείκτες επίδοσης του μοντέλου της PLS έδωσαν στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλές τιμές κατά την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου των διάφορων μικροβιακών ομάδων.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη αυτή δείχνουν πως τα φασματικά δεδομένα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδιαφέρον εργαλείο για τον έλεγχο της αλλοίωσης σε χοιρινό κιμά με τη μέτρηση των βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν στο κρέας. Τα συλλεγόμενα φάσματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοχημικά δακτυλικά αποτυπώματα που περιέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τη διάκριση των

δειγμάτων κρέατος σε ποιοτικές κατηγορίες οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικά επίπεδα αλλοίωσης, και θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη συσχέτιση του πληθυσμού των διαφόρων μικροβιακών ομάδων απευθείας από την επιφάνεια του δείγματος.

3.3.3. Ανάλυση χοιρινού κιμά με ηλεκτρονική μύτη

Τα δείγματα χοιρινού κιμά που αναλύθηκαν με την ηλεκτρονική μύτη συμπεριλάμβαναν 43 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 43 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η κάθε μέτρηση έγινε εις τριπλούν (129 δείγματα αέρα και 129 δείγματα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με PCA, DFA και με SVM.

3.3.3.1. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες

Τα αρχικά δεδομένα που ελήφθησαν από τις αποκρίσεις των αισθητήρων υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) και δημιουργήθηκε ο πίνακας συσχέτισης Pearson ανάμεσα στους 8 αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης (Εικόνα 3.3.12). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως εκτός από τον αισθητήρα DF2 όλοι οι υπόλοιποι παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συσχέτισης μεταξύ τους, με τιμές άνω του 0,7, γεγονός που υποδηλώνει το μεγάλο βαθμό αλληλεπικάλυψης της παρεχόμενης πληροφορίας από τους αισθητήρες. Για το σκοπό αυτό, δεν χρησιμοποιήθηκαν στην περαιτέρω ανάλυση οι πρωτογενείς αποκρίσεις των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης, αλλά οι παραγοντικοί βαθμοί (factor scores) των 4 πρώτων κυρίων συνιστωσών (PCs), οι οποίες εξηγούσαν ποσοστό 99,01% της συνολικής παραλλακτικότητας των δεδομένων. Στη συνέχεια τα δεδομένα αναλύθηκαν με Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων (Discriminant Function Analysis, DFA) για καθεμία από τις πέντε θερμοκρασίες συντήρησης, προκειμένου να γίνει κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας. Τα ίδια μετασχηματισμένα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ώστε να γίνει ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης (Support Vector Machines, SVM) για την ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις 3 κλάσεις ποιοτικής κατηγορίας. Σε αυτή τη περίπτωση, η ανάλυση έγινε σε όλο το σύνολο των δεδομένων ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, τα ίδια δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) στην ανάλυση με SVM με τα δεδομένα (μικροβιακό φορτίο) από την κάθε κατηγορία

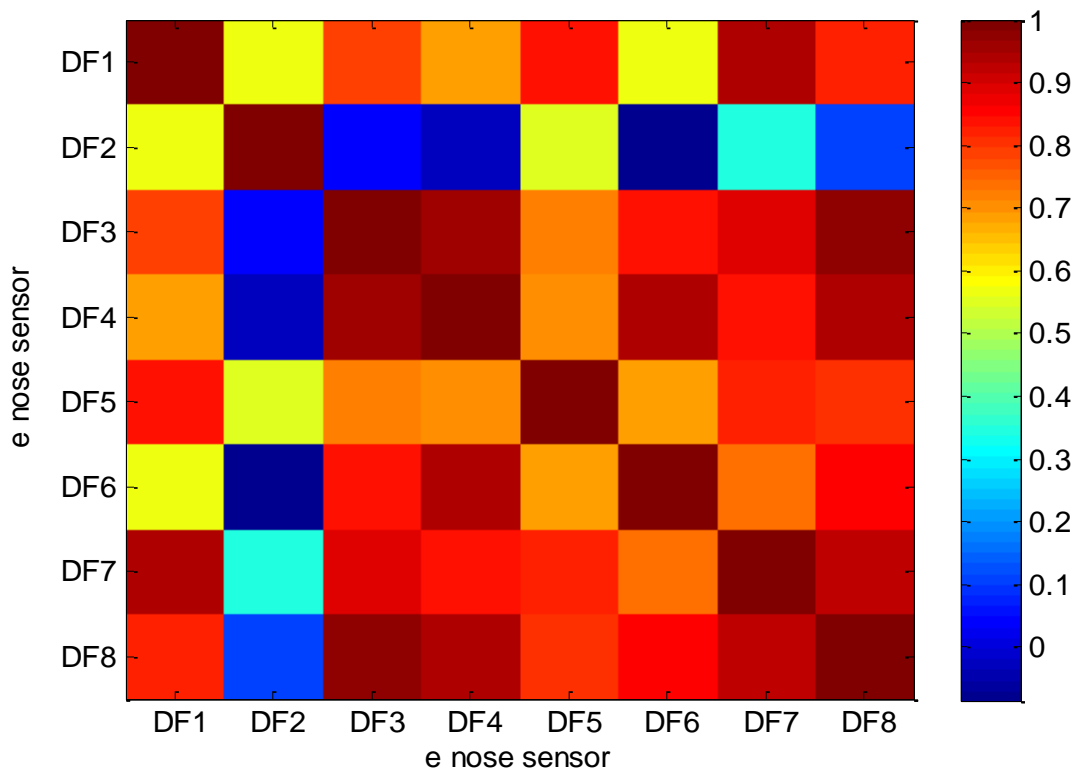
μικροοργανισμού ως μεταβλητές εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) για την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου.

3.3.3.1.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

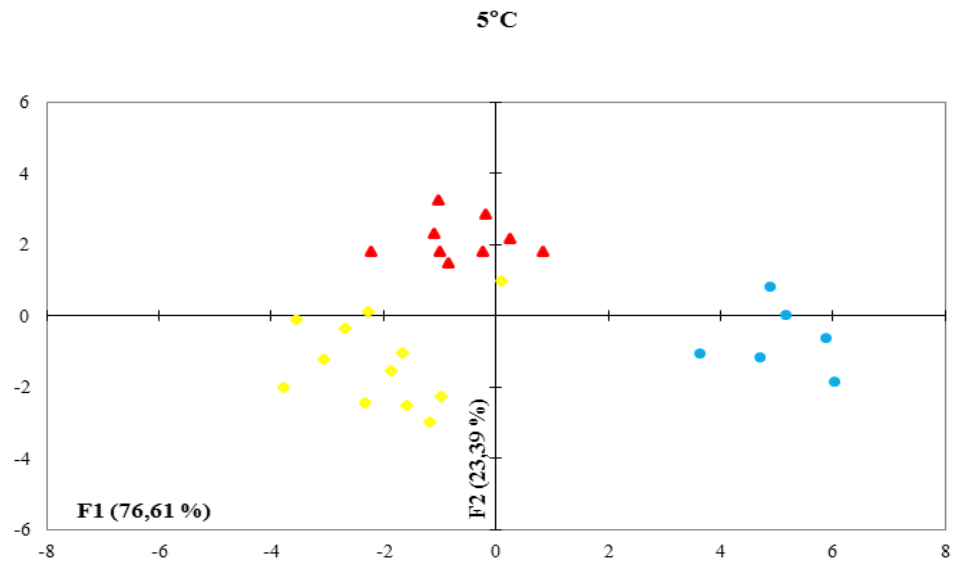
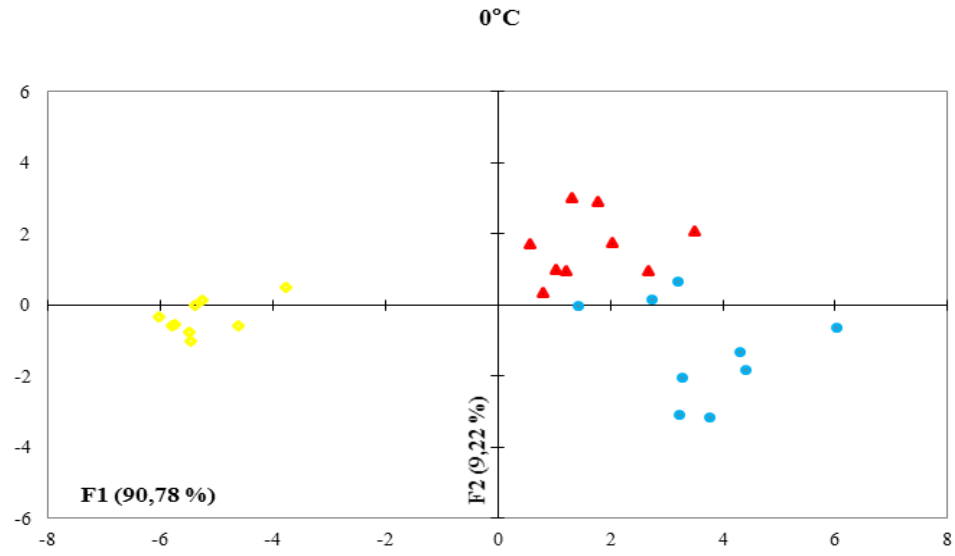
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων για κάθε θερμοκρασία συντήρησης ξεχωριστά παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.13. Οι δύο παράγοντες F εξηγούσαν το 100% της διακύμανσης των πειραματικών δεδομένων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως υπήρξε υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ των τριών κατηγοριών ποιότητας του χοιρινού κιμά, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα της ηλεκτρονικής μύτης για γρήγορη ανίχνευση της αλλοίωσης του κρέατος. Συγχρόνως, τα αποτελέσματα για την ευαισθησία και την ακρίβεια της πρόβλεψης της μεθόδου για όλες τις θερμοκρασίες που προέκυψαν έπειτα από διασταυρούμενη επικύρωση παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.3.9 και 3.3.10 για τα δεδομένα εκπαίδευσης και επικύρωσης του μοντέλου αντίστοιχα. Αναλυτικότερα, η τιμή για την ακρίβεια της πρόβλεψης ήταν αντίστοιχα 93,6% κατά την ανάπτυξη του μοντέλου, ενώ κατά την επικύρωση η αντίστοιχη τιμή ήταν 80,8%.

Είναι εξίσου σημαντικό να αναπτυχθεί ένα μοντέλο πρόβλεψης το οποίο δεν θα λαμβάνει υπόψη του τη θερμοκρασία, καθώς οι συνθήκες κατά την παραγωγή και διακίνηση του κρέατος δεν διατηρούνται πάντα σταθερές ενώ υπάρχουν συχνά περιπτώσεις κακομεταχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας (Nychas et al., 2008). Για αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης σε μία προσπάθεια να εξεταστεί η ικανότητα της ηλεκτρονικής μύτης στη διάκριση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία συντήρησης. Ως δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) χρησιμοποιήθηκαν οι παραγοντικοί βαθμοί των 4 κυρίων συνιστωσών που προέκυψαν από τις αποκρίσεις των αισθητήρων και ως δεδομένα εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) οι κλάσεις ποιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψαν από την οργανοληπτική δοκιμή. Για το κάθε μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν 2 πακέτα δεδομένων για εκπαίδευση και 1 για επικύρωση, όπως έχει ήδη αναλυθεί στο κεφάλαιο 2. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την επικύρωση του μαθηματικού μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.11. Η

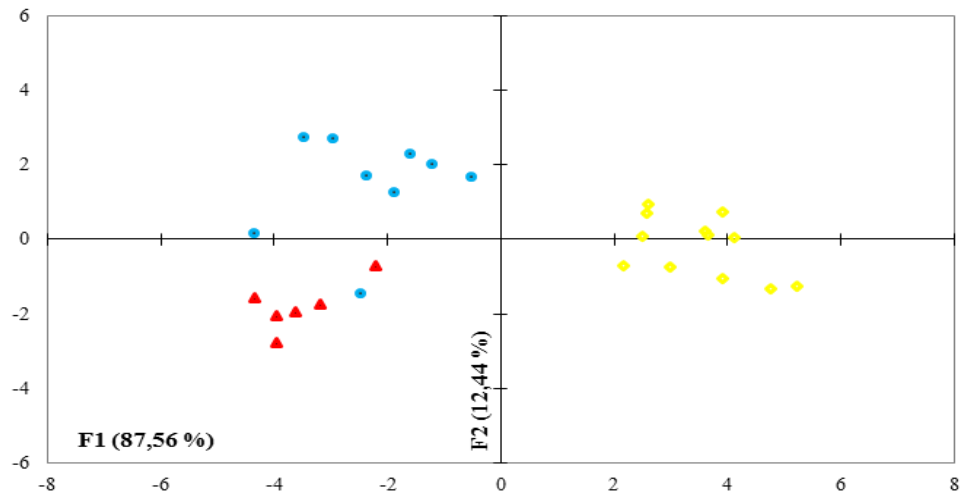
μέση πρόβλεψη για την ευαισθησία της μεθόδου ήταν 86,7%, 83,3% και 87,7% για τα φρέσκα, τα σχετικά φρέσκα και τα αλλοιωμένα δείγματα αντίστοιχα. Οι εσφαλμένες ταξινομήσεις, από την ασφαλή πλευρά (fail safe), ήταν 6,2%, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 8 λάθος προβλέψεις επί συνόλου 129 δειγμάτων, ενώ από την επικίνδυνη πλευρά (fail dangerous) το ποσοστό ήταν 7,75%, το οποίο αντιστοιχούσε σε 10 λάθος προβλέψεις επί συνόλου 129 δειγμάτων. Τέλος, η ακρίβεια της πρόβλεψης αντιστοιχούσε σε ποσοστό 86,0%.



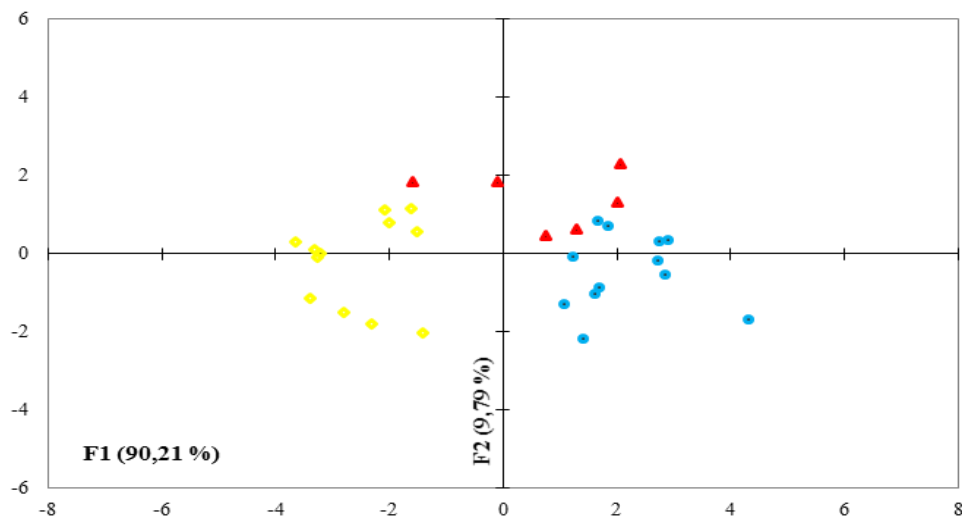
Εικόνα 3.3.12: Πίνακας συσχέτισης του Pearson για τους 8 αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης

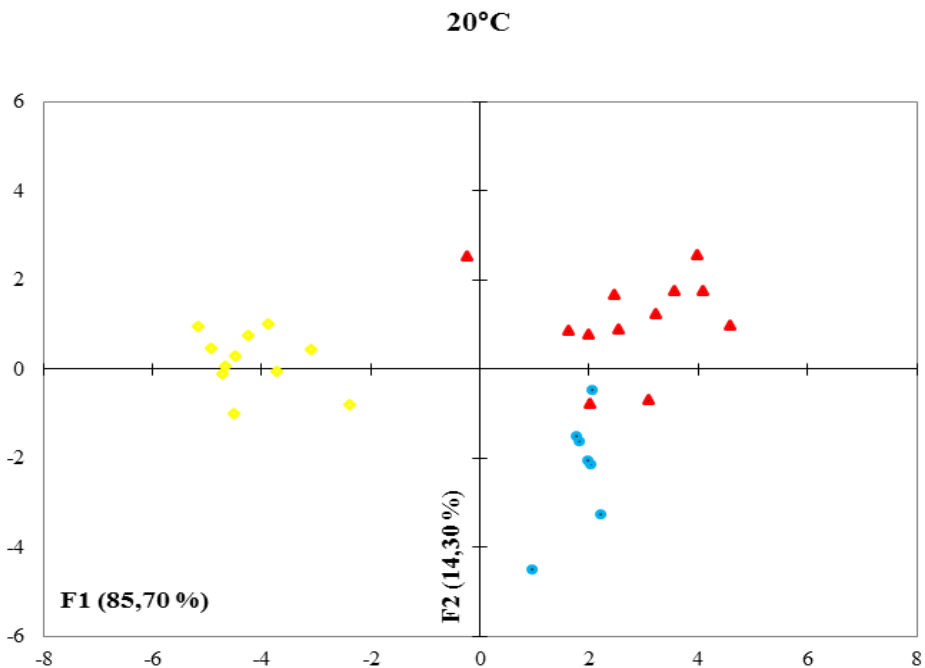


10°C



15°C





Εικόνα 3.3.13: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5, 10, 15 και 20°C) (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα)

Πίνακας 3.3.9: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων εκπαίδευσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Θερμοκρασία	Πραγματική κλάση	Προβλεπόμενη κλάση			Σύνολο δειγμάτων	Ευαισθησία (%)
		Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
0°C	Φρέσκα	7	2	0	9	77,8
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	9	9	100,0
5°C	Φρέσκα	6	0	0	6	100,0
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	1	11	12	91,7
10°C	Φρέσκα	7	2	0	9	77,8
	Σχετικά φρέσκα	0	6	0	6	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	12	12	100,0
15°C	Φρέσκα	11	1	0	12	91,7
	Σχετικά φρέσκα	0	5	1	6	83,3
	Αλλοιωμένα	0	0	12	12	100,0
20°C	Φρέσκα	6	1	0	7	85,7
	Σχετικά φρέσκα	1	11	0	12	91,7
	Αλλοιωμένα	0	0	11	11	100,0
Ακρίβεια της πρόβλεψης:						93,6

Πίνακας 3.3.10: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Θερμοκρασία	Πραγματική τάξη	Προβλεπόμενη τάξη			Σύνολο δειγμάτων	Ευαισθησία (%)
		Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
0°C	Φρέσκα	6	3	0	9	66,7
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	9	9	100,0
5°C	Φρέσκα	5	1	0	6	83,3
	Σχετικά φρέσκα	0	8	1	9	88,9
	Αλλοιωμένα	0	1	11	12	91,7
10°C	Φρέσκα	7	2	0	9	77,8
	Σχετικά φρέσκα	2	4	0	6	66,7
	Αλλοιωμένα	0	0	12	12	100,0
15°C	Φρέσκα	8	3	1	12	66,7
	Σχετικά φρέσκα	1	3	2	6	50,0
	Αλλοιωμένα	1	2	9	12	75,0
20°C	Φρέσκα	6	1	0	7	85,7
	Σχετικά φρέσκα	3	8	1	12	66,7
	Αλλοιωμένα	0	0	11	11	100,0
Ακρίβεια της πρόβλεψης:						80,8

Πίνακας 3.3.11: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Πραγματική τάξη	Προβλεπόμενη τάξη			Σύνολο	Ευαισθησία (%)
	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
Φρέσκα	26	3	1	30	86,7
Σχετικά φρέσκα	3	35	4	42	83,3
Αλλοιωμένα	3	4	50	57	87,7
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					86,0

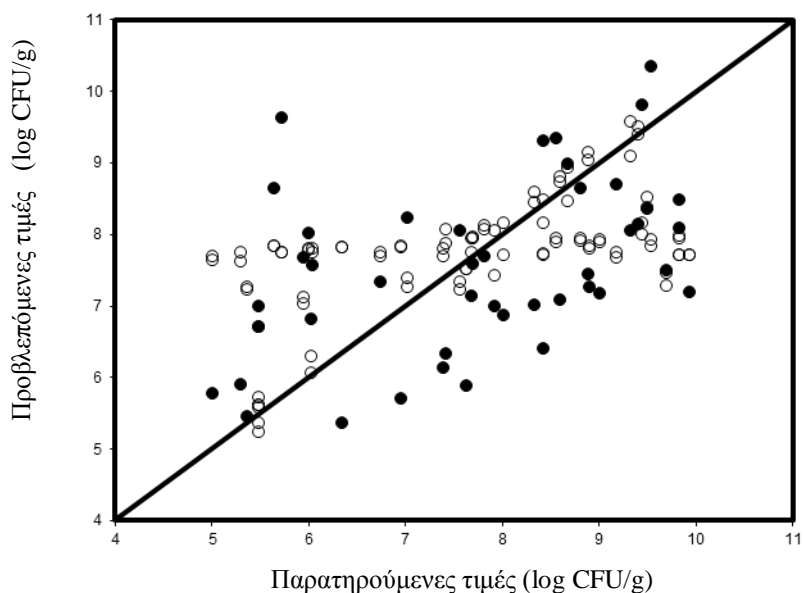
3.3.3.1.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τις αποκρίσεις των αισθητήρων

Μία εξίσου σημαντική προοπτική από μικροβιολογική σκοπιά θα ήταν ο συσχετισμός των αποκρίσεων των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης με το μικροβιακούς πληθυσμούς της κάθε μικροβιακής ομάδας ξεχωριστά. Με αυτόν τον τρόπο, η ηλεκτρονική μύτη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε ελέγχους ποιότητας ως μία γρήγορη, απλή και μη καταστρεπτική τεχνική για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στα τρόφιμα. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα με τη χρήση Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης, όπου τα δεδομένα εισόδου ήταν οι παραγοντικοί βαθμοί των κύριων συνιστωσών και τα δεδομένα εξόδου το μικροβιακό φορτίο (log CFU/g) από την κάθε κατηγορία μικροοργανισμού ξεχωριστά. Το μοντέλο αναπτύχθηκε όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις και τα αποτελέσματα επίδοσης του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.12. Δεν αναπτύχθηκαν μοντέλα για την οικογένεια των *Enterobacteriaceae* όπως και για τις ζύμες, καθώς η ανάπτυξή τους ξεκίνησε αφού τα δείγματα είχαν χαρακτηριστεί

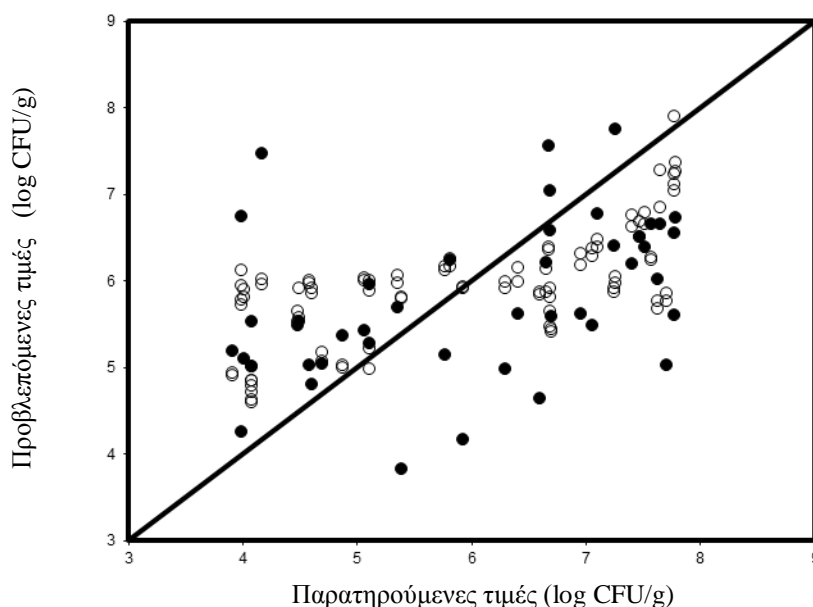
αλλοιωμένα από την ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης. Οι μέσες τιμές που υπολογίστηκαν για το δείκτη προκατάληψης (B_f) ήταν κοντά στη μονάδα σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, η μέση τιμή για το συντελεστή ακρίβειας (A_f) έδειξε πως η μέση απόκλιση μεταξύ των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών κυμάνθηκε από 13,8% για την OMX και *Pseudomonas* spp., μέχρι 15,6 και 15,7% για τον *B. thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια. Τέλος, οι μέσες τιμές για το συντελεστή συσχέτισης (r) κυμάνθηκαν από 0,576 έως 0,788 κατά την ανάπτυξη του μοντέλου, ενώ κατά την επικύρωσή του από 0,676 έως 0,855. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, τιμές r μεταξύ 0,66-0,81 είναι αποδεκτές για έλεγχο και πρόβλεψη κατά προσέγγιση, ενώ για τιμές r μεταξύ 0,50-0,63 το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για προληπτικό έλεγχο και διαλογή, καθώς το 50% της μεταβλητής Y εξηγείται από τη μεταβλητή X (Ait-Kaddour et al., 2011). Η καλύτερη συσχέτιση βρέθηκε για τα γαλακτικά βακτήρια και τις ψευδομονάδες, ενώ η επίδοση του μοντέλου επαληθεύεται γραφικά με τη σύγκριση των παρατηρούμενων έναντι των προβλεπόμενων τιμών (\log CFU/g) για τους επιλεγμένους μικροοργανισμούς (Εικόνες 3.3.14 και 3.3.15).

Πίνακας 3.3.12: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης για τη συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων των δειγμάτων χοιρινού κιμά με τις αποκρίσεις των αισθητήρων κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες

Σύνολο δεδομένων	Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	Γ_{train}	Γ_{test}
Μέσες τιμές	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	1,006	1,138	0,933	1,213	0,788	0,676
	<i>Pseudomonas</i> spp.	1,001	1,138	1,271	1,147	0,634	0,855
	<i>B. thermosphacta</i>	1,011	1,156	1,142	1,088	0,576	0,745
	Γαλακτικά βακτήρια	1,006	1,157	1,029	1,018	0,658	0,752



Εικόνα 3.3.14: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των *Pseudomonas* spp. από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε αερόβιες συνθήκες



Εικόνα 3.3.15: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των γαλακτικών βακτηρίων από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε αερόβιες συνθήκες

3.3.3.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

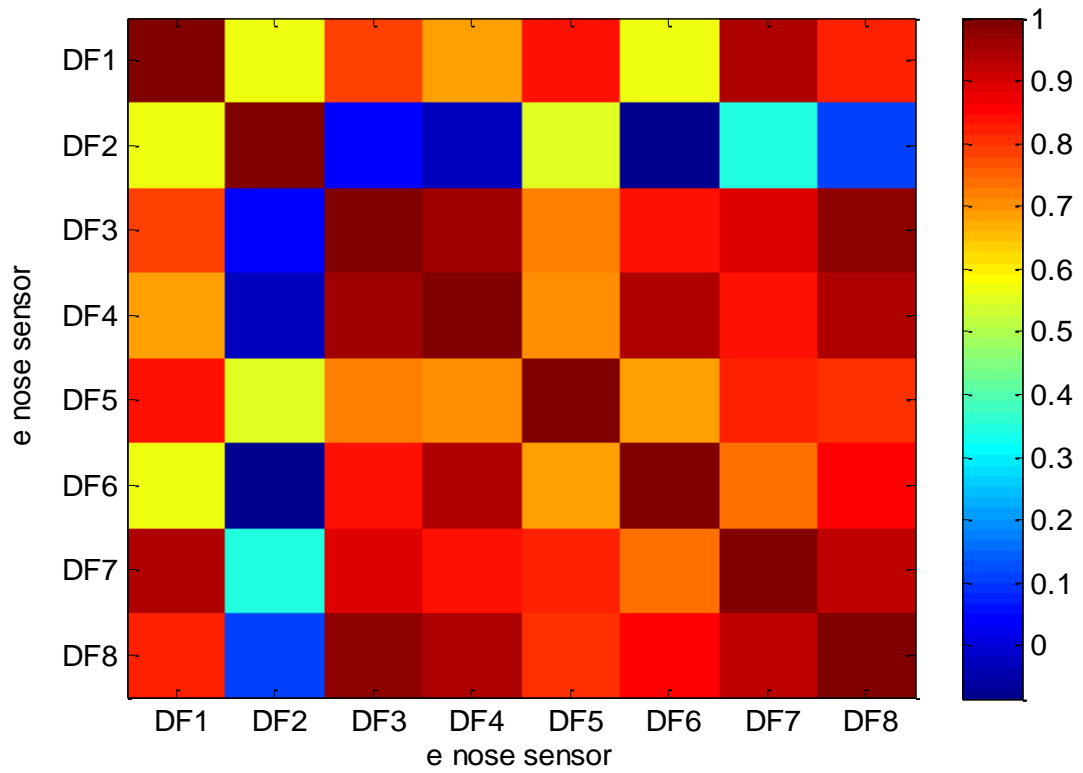
Τα αρχικά δεδομένα που ελήφθησαν από τις αποκρίσεις των αισθητήρων υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA) και δημιουργήθηκε ο πίνακας συσχέτισης Pearson ανάμεσα στους 8 αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης (Εικόνα 3.3.16). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως εκτός από τον αισθητήρα DF2 όλοι οι υπόλοιποι παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συσχέτισης μεταξύ τους, με τιμές άνω του 0,7, γεγονός που υποδηλώνει το μεγάλο βαθμό αλληλεπικάλυψης της παρεχόμενης πληροφορίας από τους αισθητήρες. Για το σκοπό αυτό, δεν χρησιμοποιήθηκαν στην περαιτέρω ανάλυση οι πρωτογενείς αποκρίσεις των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης, αλλά οι παραγοντικοί βαθμοί (factor scores) των 4 πρώτων κυρίων συνιστωσών (PCs), οι οποίες εξηγούσαν ποσοστό 98,80% της συνολικής παραλλακτικότητας των δεδομένων. Στη συνέχεια τα δεδομένα αναλύθηκαν με Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων για καθεμία από τις πέντε θερμοκρασίες, για να γίνει κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας. Τα ίδια μετασχηματισμένα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ώστε να γίνει ανάλυση με

Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης για την ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις 3 κλάσεις ποιοτικής κατηγορίας. Σε αυτή τη περίπτωση, η ανάλυση έγινε σε όλο το σύνολο των δεδομένων ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, τα ίδια δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) στις Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης και τα δεδομένα (μικροβιακό φορτίο) από την κάθε κατηγορία μικροοργανισμού ως μεταβλητές εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) για την εκπαίδευση και την επικύρωση του μοντέλου.

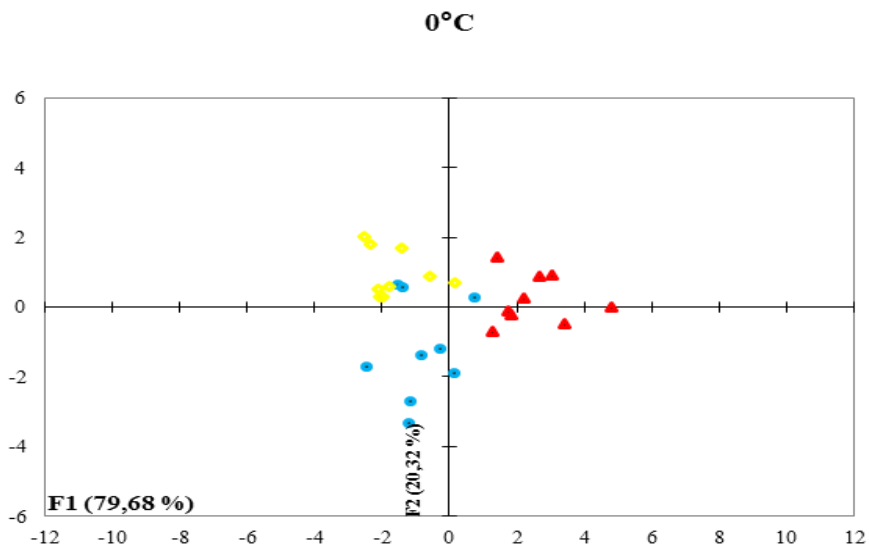
3.3.3.2.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από DFA για κάθε θερμοκρασία ξεχωριστά παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.17. Οι δύο παράγοντες F εξηγούσαν το 100% της διακύμανσης των πειραματικών δεδομένων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως υπήρξε υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ των τριών κατηγοριών ποιότητας του χοιρινού κιμά, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα της ηλεκτρονικής μύτης ως μέθοδο για γρήγορη ανίχνευση της αλλοίωσης του κρέατος. Συγχρόνως, τα αποτελέσματα για την ευαισθησία και την ακρίβεια της πρόβλεψης της μεθόδου για όλες τις θερμοκρασίες που προέκυψαν έπειτα από διασταυρούμενη επικύρωση παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.13 και 3.3.14 για τα δεδομένα εκπαίδευσης και επικύρωσης του μοντέλου αντίστοιχα. Αναλυτικότερα, η τιμή για την ακρίβεια της πρόβλεψης ήταν 96,4% κατά την ανάπτυξη του μοντέλου, ενώ κατά την επικύρωση η αντίστοιχη τιμή ήταν 86,5%. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε ένα μοντέλο χωρίς να ληφθούν ως παράγοντες οι διαφορετικές θερμοκρασίες. Για αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης, ώστε να γίνει διάκριση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία συντήρησης. Ως δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) χρησιμοποιήθηκαν οι παραγοντικοί βαθμοί των 4 κυρίων συνιστωσών που προέκυψαν από τις αποκρίσεις των αισθητήρων και ως δεδομένα εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) οι κλάσεις ποιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψαν από την οργανοληπτική δοκιμή. Για το κάθε μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν 2 πακέτα δεδομένων για ανάπτυξη και 1 για επικύρωση, όπως έχει ήδη αναλυθεί στο κεφάλαιο 2. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την επικύρωση του μαθηματικού μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.15. Η μέση πρόβλεψη για την ευαισθησία της

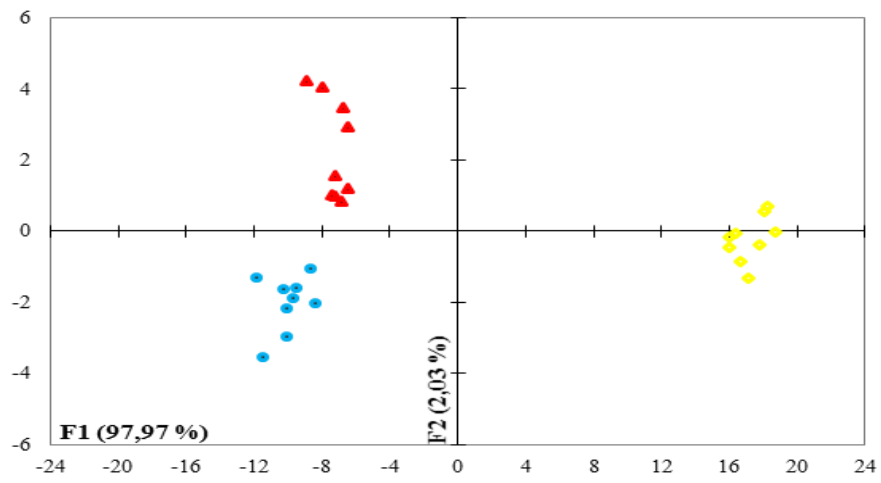
μεθόδου ήταν 90,0%, 79,2% και 89,4% για τα φρέσκα, τα σχετικά φρέσκα και τα αλλοιωμένα δείγματα αντίστοιχα. Οι εσφαλμένες ταξινομήσεις, από την ασφαλή πλευρά (fail safe), ήταν 8,52%, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 11 λάθος προβλέψεις επί συνόλου 129 δειγμάτων, ενώ από την επικίνδυνη πλευρά (fail dangerous) το ποσοστό ήταν 9,30%, το οποίο αντιστοιχούσε σε 12 λάθος προβλέψεις επί συνόλου 129 δειγμάτων. Τέλος, η ακρίβεια της πρόβλεψης αντιστοιχούσε σε ποσοστό 82,2%.



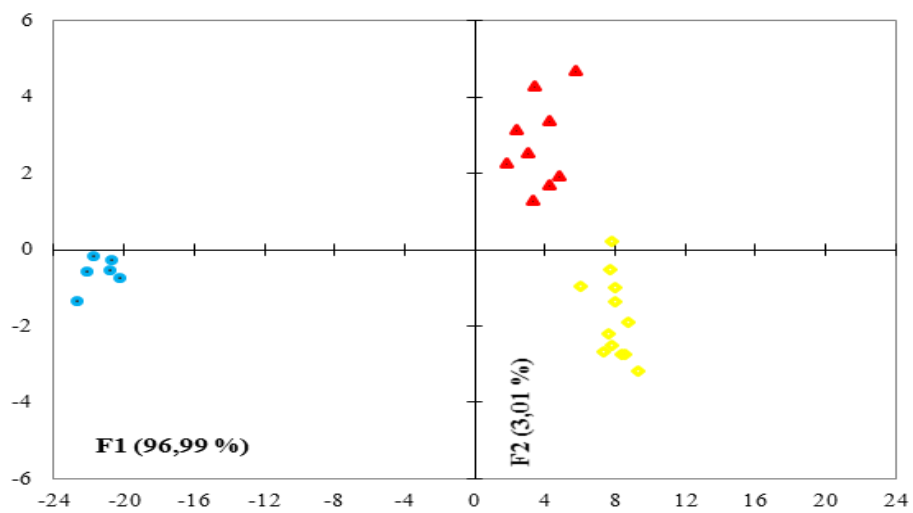
Εικόνα 3.3.16: Πίνακας συσχέτισης του Pearson για τους 8 αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης

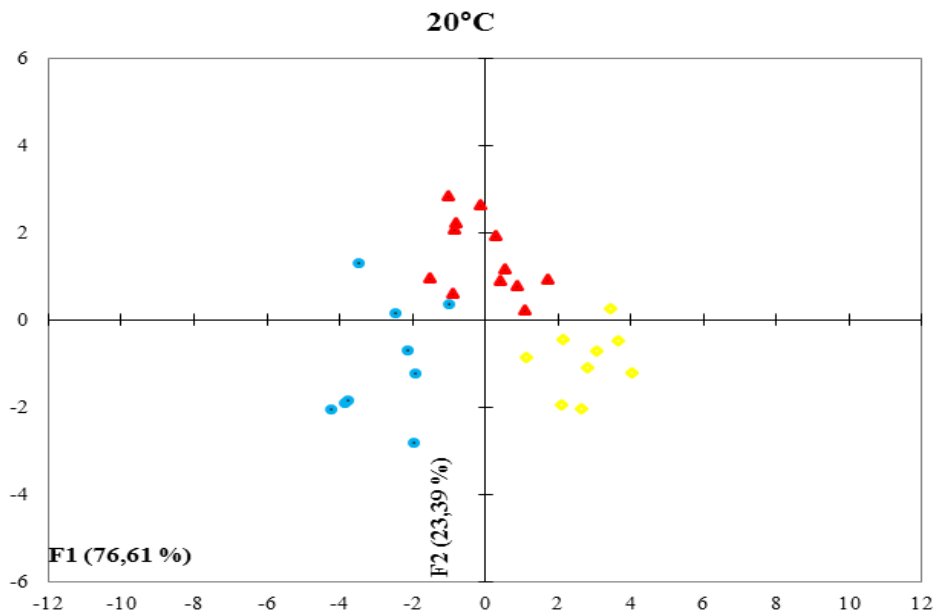
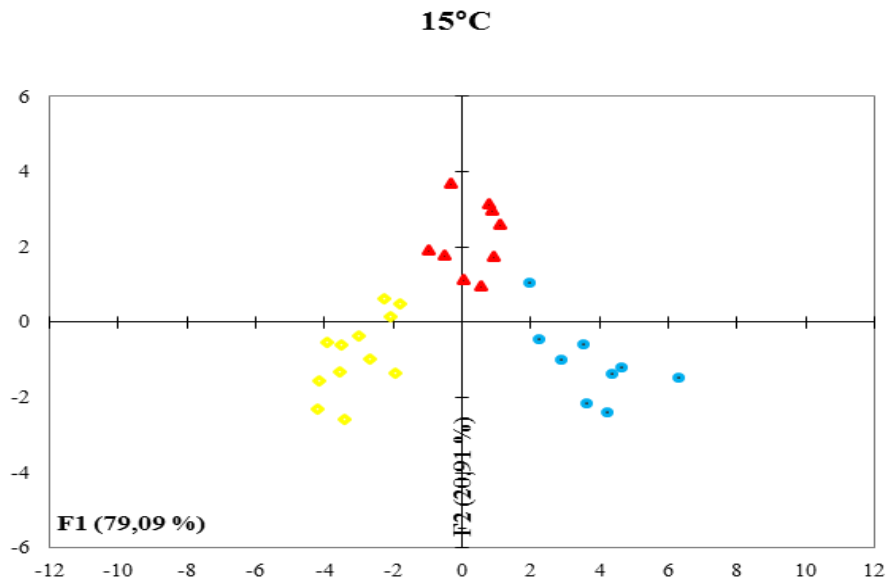


5°C



10°C





Εικόνα 3.3.17: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κρέατος σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5, 10, 15 και 20°C) (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά Φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα)

Πίνακας 3.3.13: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων εκπαίδευσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Θερμοκρασία	Πραγματική τάξη	Προβλεπόμενη τάξη			Σύνολο	Ευαισθησία (%)
		Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
0°C	Φρέσκα	6	1	2	9	66,7
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	9	9	100,0
5°C	Φρέσκα	9	0	0	9	100,0
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	9	9	100,0
10°C	Φρέσκα	6	0	0	6	100,0
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	12	12	100,0
15°C	Φρέσκα	8	1	0	9	88,9
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	12	12	100,0
20°C	Φρέσκα	8	1	0	9	88,9
	Σχετικά φρέσκα	0	12	0	12	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	9	9	100,0
Ακρίβεια της πρόβλεψης:						96,4

Πίνακας 3.3.14: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Θερμοκρασία	Πραγματική τάξη	Προβλεπόμενη τάξη			Σύνολο	Ευαισθησία (%)
		Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
0°C	Φρέσκα	6	1	2	9	66,7
	Σχετικά φρέσκα	1	7	1	9	77,8
	Αλλοιωμένα	1	1	7	9	77,8
5°C	Φρέσκα	9	0	0	9	100,0
	Σχετικά φρέσκα	2	7	0	9	77,8
	Αλλοιωμένα	0	0	7	9	100,0
10°C	Φρέσκα	6	0	0	6	100,0
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	0	12	12	100,0
15°C	Φρέσκα	7	2	0	9	77,8
	Σχετικά φρέσκα	0	9	0	9	100,0
	Αλλοιωμένα	0	1	11	12	91,7
20°C	Φρέσκα	7	2	0	9	77,8
	Σχετικά φρέσκα	1	9	2	12	75,0
	Αλλοιωμένα	0	0	9	9	100,0
Ακρίβεια της πρόβλεψης:						86,5

Πίνακας 3.3.15: Πίνακας διπλής εισόδου για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης των δεδομένων επικύρωσης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Πραγματική τάξη	Προβλεπόμενη τάξη			Σύνολο	Ευαισθησία (%)
	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
Φρέσκα	27	3	0	30	90,0
Σχετικά φρέσκα	2	38	8	48	79,2
Αλλοιωμένα	3	7	41	51	80,4
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					82,2

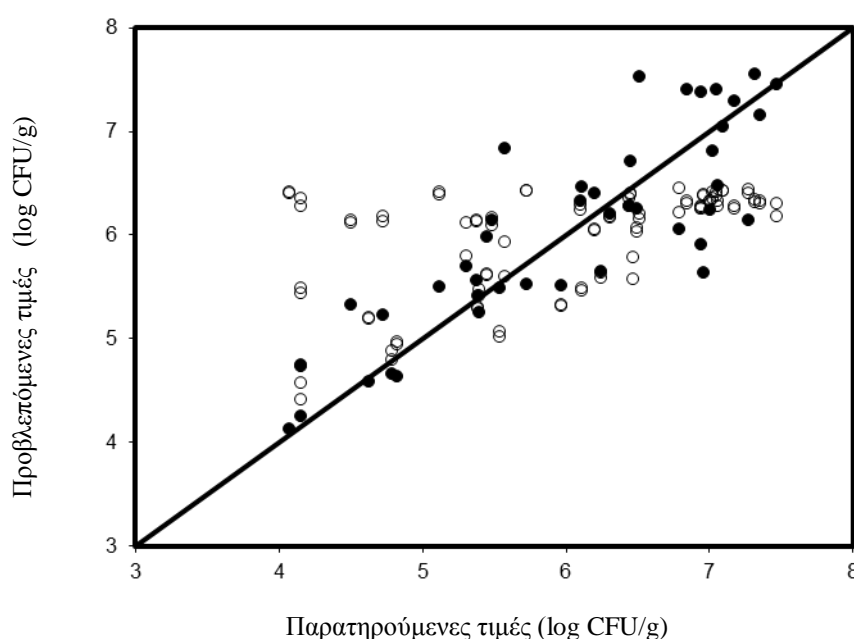
3.3.3.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τις αποκρίσεις των αισθητήρων

Στη συνέχεια έγινε συσχετισμός των αποκρίσεων των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης με τους μικροβιακούς πληθυσμούς της κάθε μικροβιακής ομάδας ξεχωριστά. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα με τη χρήση SVM, όπου τα δεδομένα εισόδου ήταν οι παραγοντικοί βαθμοί των κύριων συνιστωσών και τα δεδομένα εξόδου το μικροβιακό φορτίο (\log CFU/g) από την κάθε κατηγορία μικροοργανισμού ξεχωριστά. Το μοντέλο αναπτύχθηκε όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις και τα αποτελέσματα επίδοσης του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.16. Δεν αναπτύχθηκαν μοντέλα για την οικογένεια των *Enterobacteriaceae* όπως και για τις ζύμες, καθώς η ανάπτυξή τους ξεκίνησε αφού τα δείγματα είχαν χαρακτηριστεί αλλοιωμένα από το πάνελ των δοκιμαστών. Οι μέσες τιμές που λήφθηκαν για το δείκτη προκατάληψης (B_f) ήταν κοντά στη μονάδα σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, η μέση τιμή για το συντελεστή ακρίβειας (A_f) έδειξε πως η μέση απόκλιση μεταξύ των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών κυμάνθηκε από 4,8% για τις *Pseudomonas* spp., μέχρι 11,5% για τον *B. thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια. Τέλος, οι μέσες τιμές για το συντελεστή συσχέτισης (r) κυμάνθηκαν από 0,575 έως 0,937 κατά την ανάπτυξη του μοντέλου,

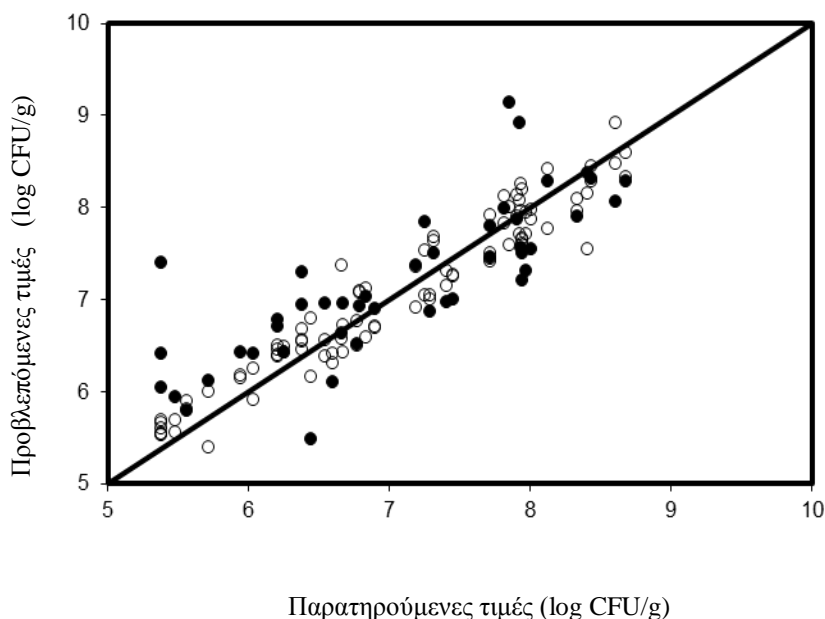
ενώ κατά την επικύρωσή του κυμάνθηκαν από 0,785 έως 0,878. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, τιμές r μεταξύ 0,83-0,86 είναι αποδεκτές για τις περισσότερες εφαρμογές, ενώ τιμές r μεταξύ 0,66-0,81 είναι αποδεκτές για έλεγχο και πρόβλεψη κατά προσέγγιση (Ait-Kaddour et al., 2011). Η επίδοση του μοντέλου των SVM επαληθεύεται γραφικά με τη σύγκριση των πραγματικών έναντι των προβλεπόμενων τιμών σε \log CFU/g για τον *Br. thermosphacta* και την OMX (Εικόνες 3.3.18 και 3.3.19).

Πίνακας 3.3.16: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης για τη συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων των δειγμάτων χοιρινού κιμά με τις αποκρίσεις των αισθητήρων κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Σύνολο							
δεδομένων	Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	r_{train}	r_{test}
Μέσες τιμές	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	1,009	1,063	0,337	0,540	0,937	0,835
	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,995	1,048	0,597	0,388	0,659	0,878
	<i>B. thermosphacta</i>	1,009	1,089	0,864	0,642	0,575	0,785
	Γαλακτικά βακτήρια	1,025	1,115	1,090	0,799	0,656	0,843



Εικόνα 3.3.18: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του *Br. thermosphacta* από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας



Εικόνα 3.3.19: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της OMX από το μοντέλο Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για χοιρινό κιμά συντηρημένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

3.3.3.3. Συζήτηση

Από το 1980 που πρωτοεμφανίστηκε η ηλεκτρονική μύτη ως ένα τεχνητό οσφρητικό σύστημα μέχρι και σήμερα, η ηλεκτρονική μύτη χρησιμοποιείται ευρέως για την ποιοτική ταξινόμηση ποικίλων ειδών του περιβάλλοντος. Κυρίαρχη θέση κατέχει η ανάλυση τροφίμων καθώς είναι από τις εφαρμογές της ηλεκτρονικής μύτης που χρησιμοποιείται περισσότερο από κάθε άλλη (Di Natale et al., 1997, 1998). Υπάρχουν πολλοί λόγοι για να αναπτυχθούν οι ηλεκτρονικές μύτες για εφαρμογές στον τομέα του ελέγχου των τροφίμων, όπως ο έλεγχος της ποιότητας των τροφίμων εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της ρύπανσης. Επιπροσθέτως, η ανάλυση του αρώματος των τροφίμων αποτελεί μία ευκαιρία, να συγκριθούν οι επιδόσεις της ηλεκτρονικής μύτης με αυτές του φυσικού οσφρητικού συστήματος καθώς η αντίληψη των πτητικών ενώσεων από τον άνθρωπο έχει μεγάλη σημασία για την αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων (Di Natale et al., 1997, Schaller et al., 1998). Η ηλεκτρονική μύτη έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την αναγνώριση

και την ταξινόμηση μεγάλης ποικιλίας τροφίμων όπως καφέ, κρέας, ψάρι, τυρί, κρασί και αλκοολούχα ποτά καθώς και για την αξιολόγηση ποικίλων χαρακτηριστικών όπως χρόνος αποθήκευσης, διαφορές λόγω του φύλου σε κρέας και ψάρι, καθώς και για την αξιολόγηση της ποιότητας τροφίμων όπως μανιτάρια, ελαιόλαδο, κρέας, ζάχαρη, τυρί και ψάρι (Boothe & Arnold, 2002, Di Natale et al., 1997, Panigrahi et al., 2006, Rajamaki et al., 2006, Schaller et al., 1998). Από τις εφαρμογές στα τρόφιμα, η πλειονότητα των δημοσιευμένων εργασιών αναφέρεται στο κρέας και προϊόντα του (Ghasemi-Varnamkhashti et al., 2009, Schaller et al., 1998). Για παράδειγμα, οι Blixt et al. (1999), χρησιμοποίησαν ηλεκτρονική μύτη για να μελετήσουν την αλλοίωση βόειου κρέατος συσκευασμένου υπό κενό στους 4°C. Έγινε προσπάθεια συσχέτισης των αποκρίσεων των αισθητήρων με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης της αλλοίωσης του βόειου κρέατος χρησιμοποιώντας PLS με σκοπό την ποσοτικοποίηση του βαθμού της αλλοίωσης. Από τα αποτελέσματα βρέθηκε υψηλός συντελεστής συσχέτισης ($r=0,94$) καταδεικνύοντας πως ο βαθμός της αλλοίωσης μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά.

Η εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης στην αξιολόγηση της ποιότητας του κρέατος έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για να συσχετίσει το προφίλ πτητικών ουσιών με τις μικροβιολογικές αναλύσεις, αλλά οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην πρόβλεψη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας για βόειο, πρόβειο και χοιρινό κρέας (Balasubramanian et al., 2009, El Barbri et al., 2008, Wang et al., 2012). Σε αυτές τις μελέτες οι υπολογιζόμενοι συντελεστές συσχέτισης για την OMX ήταν πάνω από 0,89 και 0,70 για την εκπαίδευση και την επικύρωση του συνόλου των δεδομένων, αντίστοιχα, το οποίο είναι συγκρίσιμο με τις τιμές που αναφέρονται σε αυτή τη μελέτη για το χοιρινό κρέας. Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η απαρίθμηση της OMX δεν είναι πάντα αντιπροσωπευτική της δυναμικής των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης του κρέατος, ενώ πρέπει να ληφθεί υπόψη η εφήμερη αλλοιωγόνο χλωρίδα (Ercolini et al., 2006, 2009, Koutsoumanis et al., 2006, Nychas et al., 2008). Οι Panigrahi et al. (2006), χρησιμοποίησαν διαφορετικές στατιστικές τεχνικές και διαφορετικές τεχνικές επικύρωσης των ανεπτυγμένων μοντέλων ώστε να συσχετίσουν το προφίλ των πτητικών ουσιών από βόειο κρέας το οποίο είχε συντηρηθεί σε 2 θερμοκρασίες ψύξης (4 και 10°C) με τις αποκρίσεις των αισθητήρων. Οι διαφορετικές στατιστικές τεχνικές έδωσαν διαφορετικά ποσοστά στην ακρίβεια ταξινόμησης του δείγματος

καταδεικνύοντας την ανάγκη να βρεθούν αξιόπιστα μοντέλα πρόβλεψης με τη βοήθεια των κατάλληλων τεχνικών ανάλυσης δεδομένων. Σε μια πρόσφατη εργασία (Rajamäki et al., 2006), διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής ηλεκτρονικής μύτης στην εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου της OMX, των γαλακτικών βακτηρίων, των αναερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* κατά τη διάρκεια της συντήρησης κρέατος πουλερικών συσκευασμένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Χρησιμοποιήθηκε μοντέλο PLS-R για να γίνει συσχέτιση μεταξύ του φορτίου των μικροβιακών πληθυσμών και των αποκρίσεων των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης και οι συγγραφείς ανέφεραν συσχετίσεις μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών, με τιμές 0,73 και 0,71 για τα δεδομένα της εκπαίδευσης και τα δεδομένα της επικύρωσης αντίστοιχα. Σε μία άλλη εργασία (Horvath et al., 2007) μελετήθηκε το πτητικό προφίλ από παϊδάκια χοιρινού κρέατος συντηρημένα αερόβια σε διάφορες θερμοκρασίες, ώστε να γίνει εκτίμηση του μικροβιολογικού φορτίου του δείγματος για OMX και ψευδομονάδες. Τα μοντέλα παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων που αναπτύχθηκαν έδειξαν συσχέτιση με τιμή 0,70 για τις *Pseudomonas* spp. ενώ για την OMX η τιμή ήταν χαμηλότερη (0,59). Τέλος, όταν έγινε μείωση των διαστάσεων των δεδομένων των αισθητήρων χρησιμοποιώντας PCA, οι συντελεστές συσχέτισης είχαν υψηλότερες τιμές. Και στις δύο αυτές εργασίες, οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ηλεκτρονική μύτη αποτελεί μια ταχεία και αξιόπιστη μέθοδο που μπορεί να αξιολογήσει την ποιότητα του κρέατος και να εκτιμήσει ικανοποιητικά το μικροβιακό πληθυσμό των επιλεγμένων μικροοργανισμών.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την παρούσα μελέτη κατέδειξαν πως οι αποκρίσεις των αισθητήρων που συλλέχθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πτητικά δακτυλικά αποτυπώματα μίας ενεργής βιολογικής ουσίας, τα οποία περιέχουν πληροφορίες για την ποιότητά της, η οποία αντιστοιχεί σε διαφορετικά επίπεδα αλλοίωσης. Επίσης, η ανάλυση των αποκρίσεων των αισθητήρων με τις Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης μπορούσε να προβλέψει αποτελεσματικά την κατηγορία της ποιοτικής κλάσης ενός δείγματος, με ακρίβεια πρόβλεψης που κυμάνθηκε από 82,2% έως 86,0% για τα δείγματα του χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και σε αερόβιες συνθήκες αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, οι SVM μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τις περισσότερες περιπτώσεις της εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου των διάφορων μικροβιακών

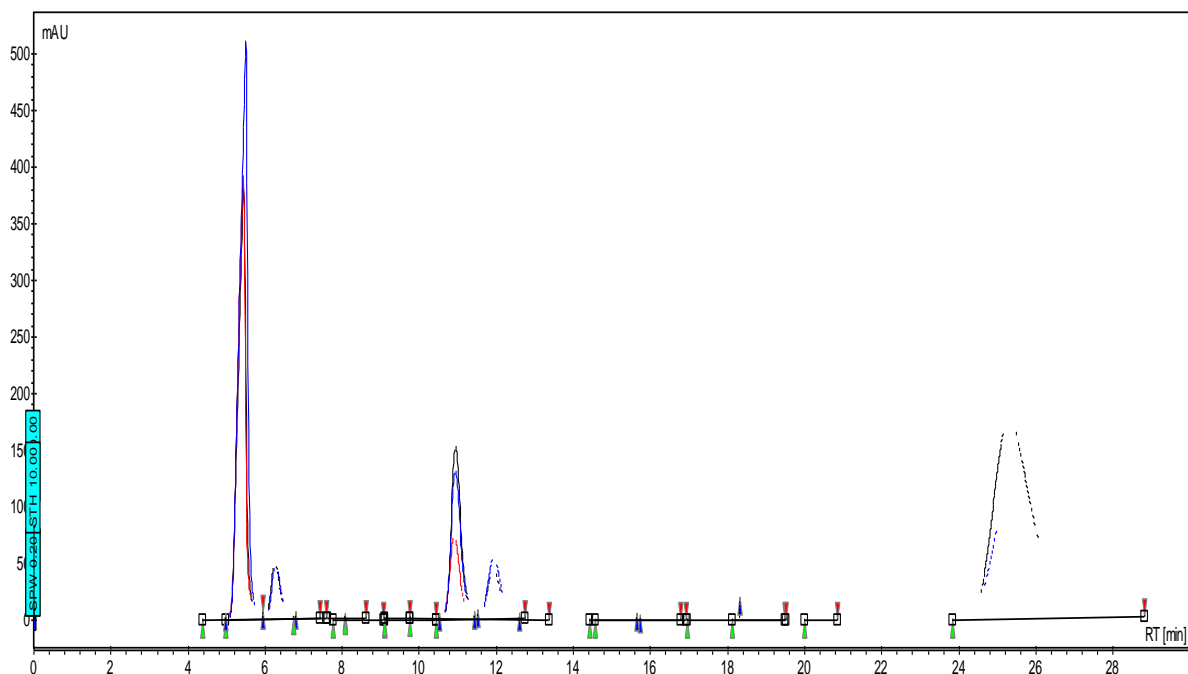
ομάδων, το οποίο αποδεικνύεται από τις τιμές συσχέτισης για την εκάστοτε ομάδα μικροοργανισμού. Παρόλα αυτά, χρειάζονται περαιτέρω προσπάθειες για την βελτιστοποίηση των παραμέτρων των SVM που χρησιμοποιήθηκαν καθώς σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ο συντελεστής συσχέτισης r βρέθηκε χαμηλός. Μελλοντική εργασία θα πρέπει να περιλαμβάνει τη χρήση διαφορετικών μοντέλων πρόβλεψης καθώς και τη χρήση μεγαλύτερων βάσεων δεδομένων για ανάπτυξη και επικύρωση των μοντέλων.

3.3.4. Ανάλυση χοιρινού κιμά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

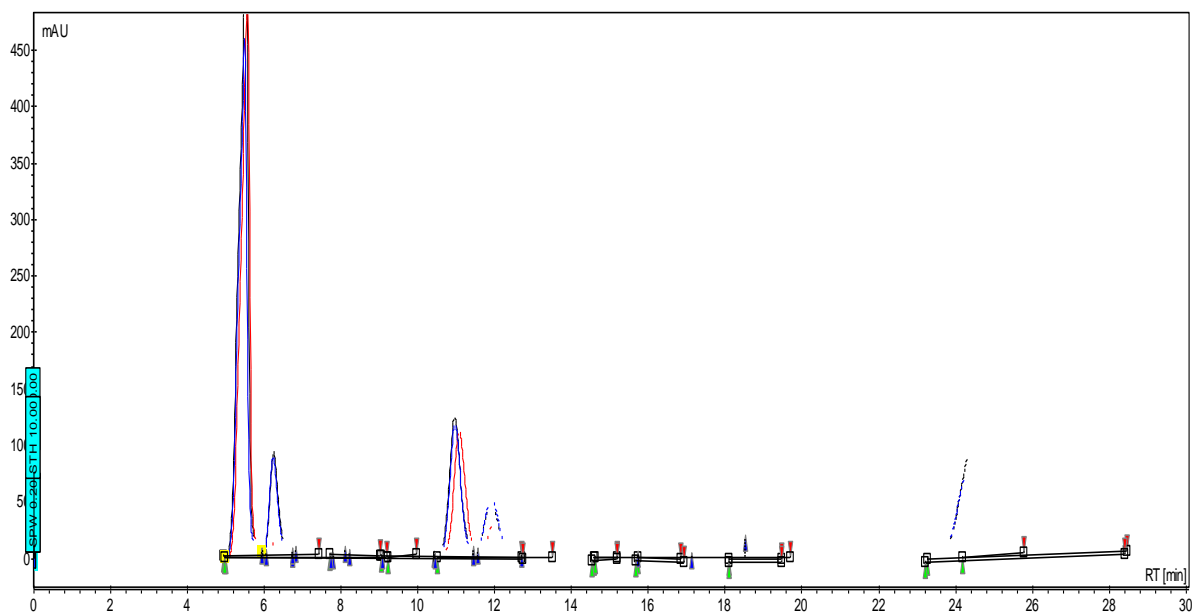
Τα δείγματα χοιρινού κιμά που αναλύθηκαν με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης από το κάθε πείραμα συμπεριλάμβαναν 84 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 81 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C αντίστοιχα. Η κάθε μέτρηση έγινε εις διπλούν και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Διακριτική Ανάλυση και με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης.

3.3.4.1 Ανάλυση οργανικών οξέων

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων των οργανικών οξέων οδήγησε στην επιλογή 16 κορυφών, οι οποίες ανήκαν είτε σε γνωστές ουσίες είτε σε ουσίες που δεν ταυτοποιήθηκαν. Όσον αφορά το μεταβολικό προφίλ, οι πληροφορίες που περιέχονται σε όλες τις κορυφές είναι σημαντικές για το χαρακτηρισμό της αλλοίωσης. Εξαιτίας αυτού, όλες οι κορυφές λήφθηκαν υπόψη, παρόλο που δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί η συγκέντρωσή τους. Τουναντίον, χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση ως μέτρο της συγκέντρωσης της εκάστοτε ουσίας η περιοχή του εμβαδού της κορυφής όπως προέκυψε από το χρωματογράφημα. Οι επιλεγμένες κορυφές είχαν τους εξής χρόνους κατακράτησης σε λεπτά (retention time, RT): 6,2 (άγνωστη), 6,9 (κιτρικό οξύ), 7,7 (άγνωστη), 8,2 (πυροσταφυλικό οξύ), 9,2 (ηλεκτρικό οξύ), 9,6 (άγνωστη), 10,9 (γαλακτικό οξύ), 11,8 (μυρμηκικό οξύ), 12,9 (οξικό οξύ), 14,9 (άγνωστη), 15,1 (προπιονικό οξύ), 16,1 (ισοβουτυρικό οξύ), 17,9 (άγνωστη), 18,6 (άγνωστη), 20,5 (άγνωστη) και 25,2 (άγνωστη). Από τα αποτελέσματα φαίνονται αλλαγές στις χρωματογραφικές περιοχές των κορυφών των εκλούμενων οξέων, οι οποίες σχετίζονται ή και όχι με τις συνθήκες συντήρησης (θερμοκρασία και συσκευασία). Στις Εικόνες 3.3.20 και 3.3.21 παρουσιάζεται ενδεικτικά το προφίλ των οργανικών οξέων κατά την αλλοίωση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 10°C για ένα φρέσκο, ένα σχετικά φρέσκο κι ένα αλλοιωμένο δείγμα καθώς επίσης και δείγματος χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασία 0°C αντίστοιχα.



Εικόνα 3.3.20: Μεταβολικό προφίλ οργανικών οξέων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 10°C για ένα φρέσκο, ένα σχετικά φρέσκο και ένα αλλοιωμένο δείγμα.



Εικόνα 3.3.21: Μεταβολικό προφίλ οργανικών οξέων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασία 0°C για ένα φρέσκο, ένα σχετικά φρέσκο και ένα αλλοιωμένο δείγμα

Στον Πίνακα 3.3.17 παρουσιάζονται οι μεταβολές στη χρωματογραφική περιοχή των εκλούομένων ουσιών για φρέσκο χοιρινό κιμά και για δείγματα τα οποία έχουν κατηγοριοποιηθεί από τον οργανοληπτικό έλεγχο ως αλλοιωμένα. Πιο

συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί το χρονικό σημείο του τέλους της διάρκειας ζωής του χοιρινού κιμά.

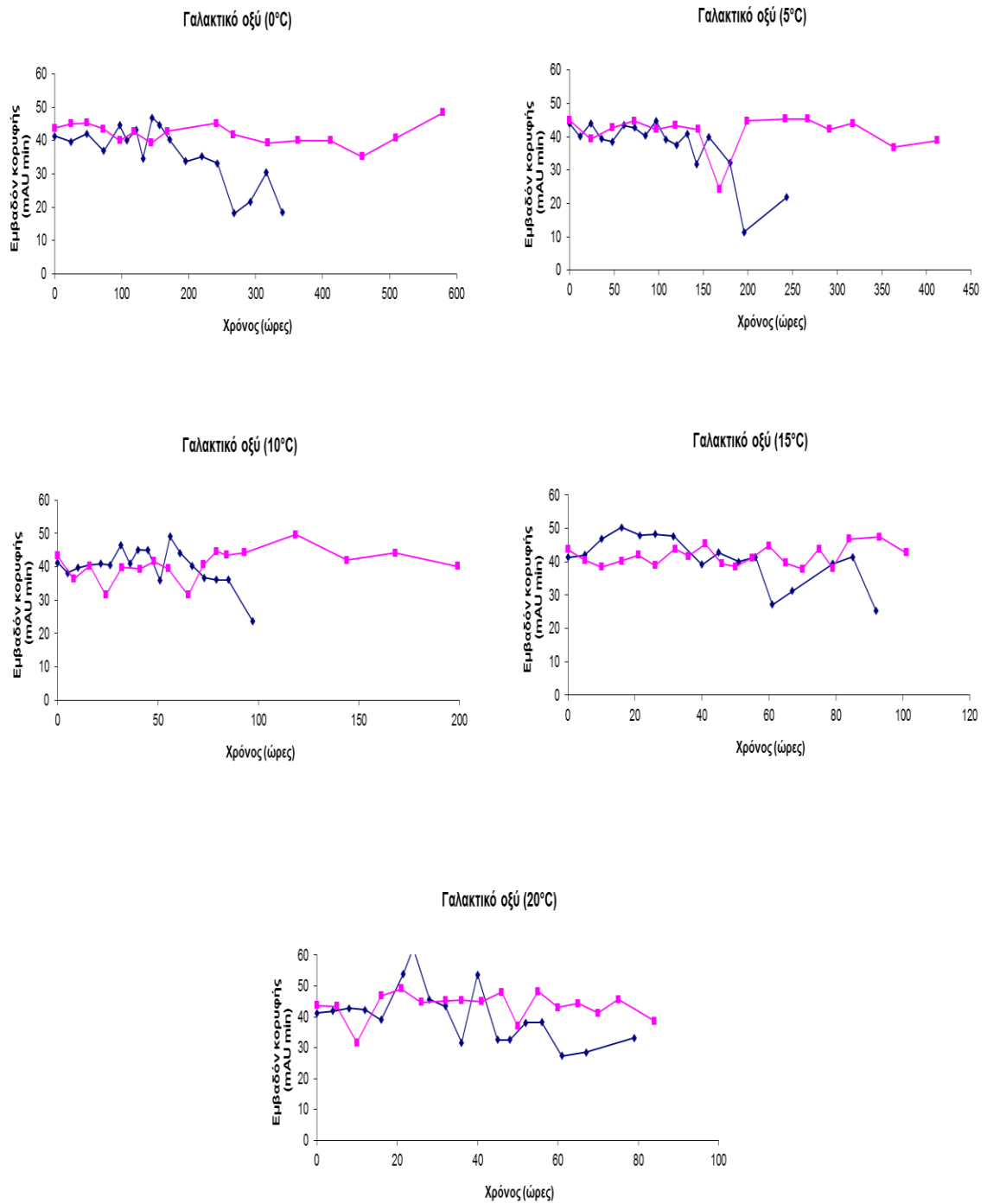
Πίνακας 3.3.17: Μεταβολές στο εμβαδόν των κορυφών κατά την έναρξη της συντήρησης (0 ώρες) και στο τέλος της διάρκειας ζωής του χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα

Κορυφές (χρόνος κατακράτησης σε λεπτά)	Εμβαδόν της κορυφής (mAU/min)											
	Τέλος διάρκειας ζωής χοιρινού κιμά											
	Αέρας						MAP					
	Φρέσκο κρέας	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	Φρέσκο κρέας	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C
P1-6,2 (άγνωστη)	18,83	10,5	12	6,5	6,4	7,2	28,27	9,9	12,3	12,7	9,2	11,1
P2-6,9 (κιτρικό οξύ)	2,10	3	3,7	3	2,4	3,2	2,63	2,7	2,9	2,9	2,3	1,7
P3-7,7 (άγνωστη)	0,90	1,9	3,8	- ^a	1,6	4,6	0,50	0,7	-	-	0	0,6
P4-8,2 (πυροσταφυλικό οξύ)	2,73	1,3	1,2	9,8	1,3	1,8	2,80	1,6	4,5	3	3	1,4
P5-9,2 (ηλεκτρικό οξύ)	0,03	0,2	0,2	-	1,1	4,9	-	0,7	-	-	-	0,3
P6-9,6 (άγνωστη)	2,73	2,3	0,8	0,1	39,2	62,2	3,43	-	2,7	1	0,2	-
P7-10,9 (γαλακτικό οξύ)	44,00	40,2	42,7	0,1	15	4,1	44,00	39,3	44,8	44,6	44,8	45,2
P8-11,8 (μυρμηκικό οξύ)	25,47	13,1	16,9	45	1,7	1,3	21,93	21,9	29,5	30,3	34,5	28,5
P9-12,9 (οξικό οξύ)	0,07	0,3	0,5	10,8	5,3	3,7	0,00	1,5	2,2	1,5	2,5	1,4
P10-14,9 (άγνωστη)	7,80	6,1	2,1	1,5	5,1	0,7	3,23	1,8	-	3,9	2,4	3,9
P11-15,1 (προπιονικό οξύ)	-	0	-	0,1	28,4	1,2	1,80	-	2,2	-	4,3	4,7
P12-16,1 (ισοβουτυρικό οξύ)	4,13	4,2	3,6	-	6,7	12,6	2,93	8	10,1	7,9	10,5	7,2
P13-17,9 (άγνωστη)	-	0,9	20,1	1,1	-	76,4	0,00	11,9	6,9	1,8	8,4	-
P14-18,6 (άγνωστη)	10,07	10,3	10,9	13,6	6,4	7,2	12,97	15,5	15,4	13,3	9,7	4
20,5 (άγνωστη)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P15-25,2 (άγνωστη)	172,73	97	24,3	11,2	2,4	3,2	193,33	16,9	-	11,7	-	66,6

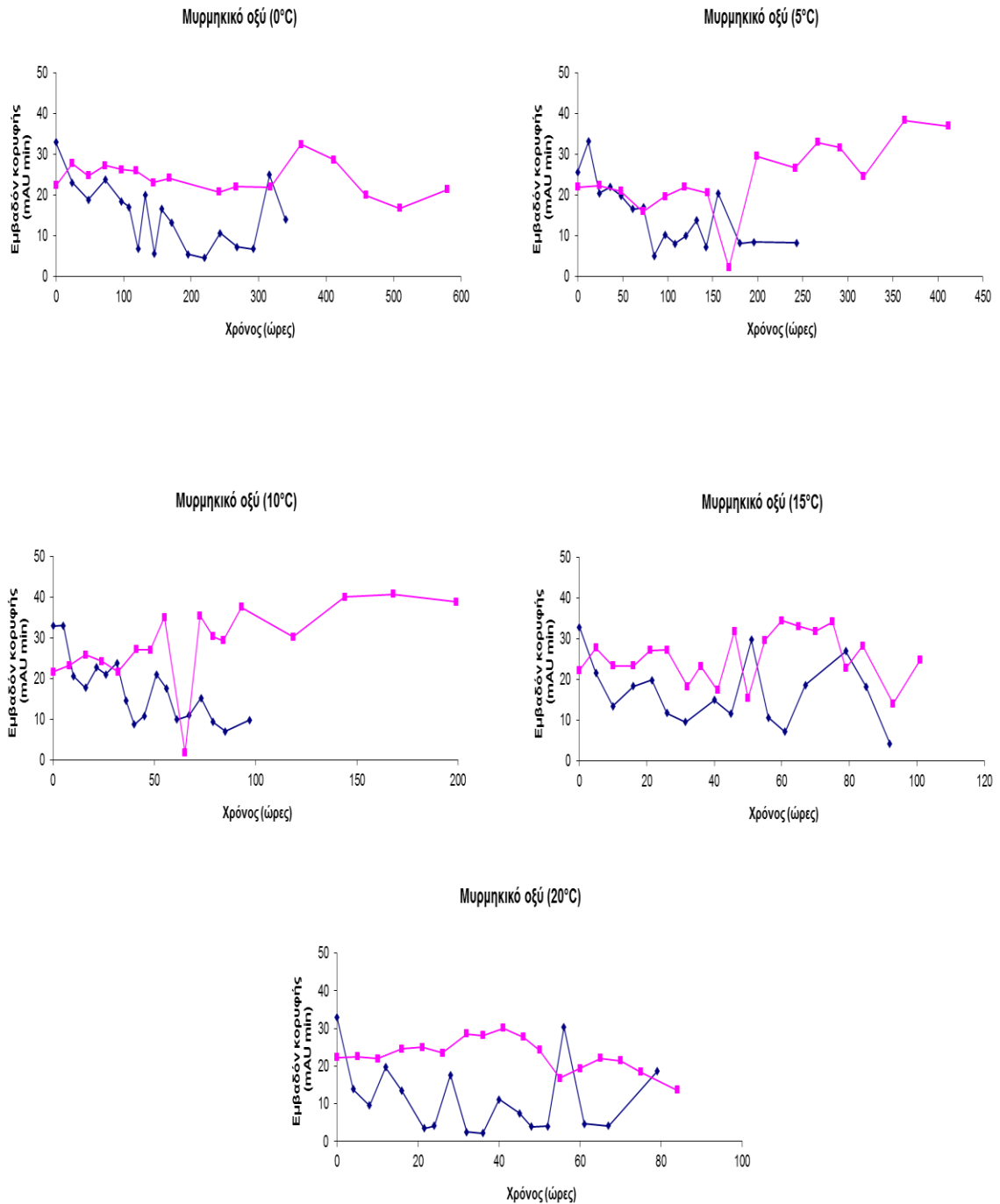
^a: δεν ανιχνεύθηκε

Φαίνεται, λοιπόν, πως το χρωματογραφικό προφίλ των οργανικών οξέων διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες συσκευασίας. Όσον αφορά στα δείγματα που έχουν συσκευαστεί αερόβια, παρατηρήθηκε αύξηση στις κορυφές με χρόνο κατακράτησης 7,7 και 17,9 λεπτά. Η κορυφή 20,5 ήταν εμφανής μόνο σε δείγματα πολύ αλλοιωμένα και κυρίως κατά την αερόβια αλλοίωση του χοιρινού κιμά. Οι τιμές

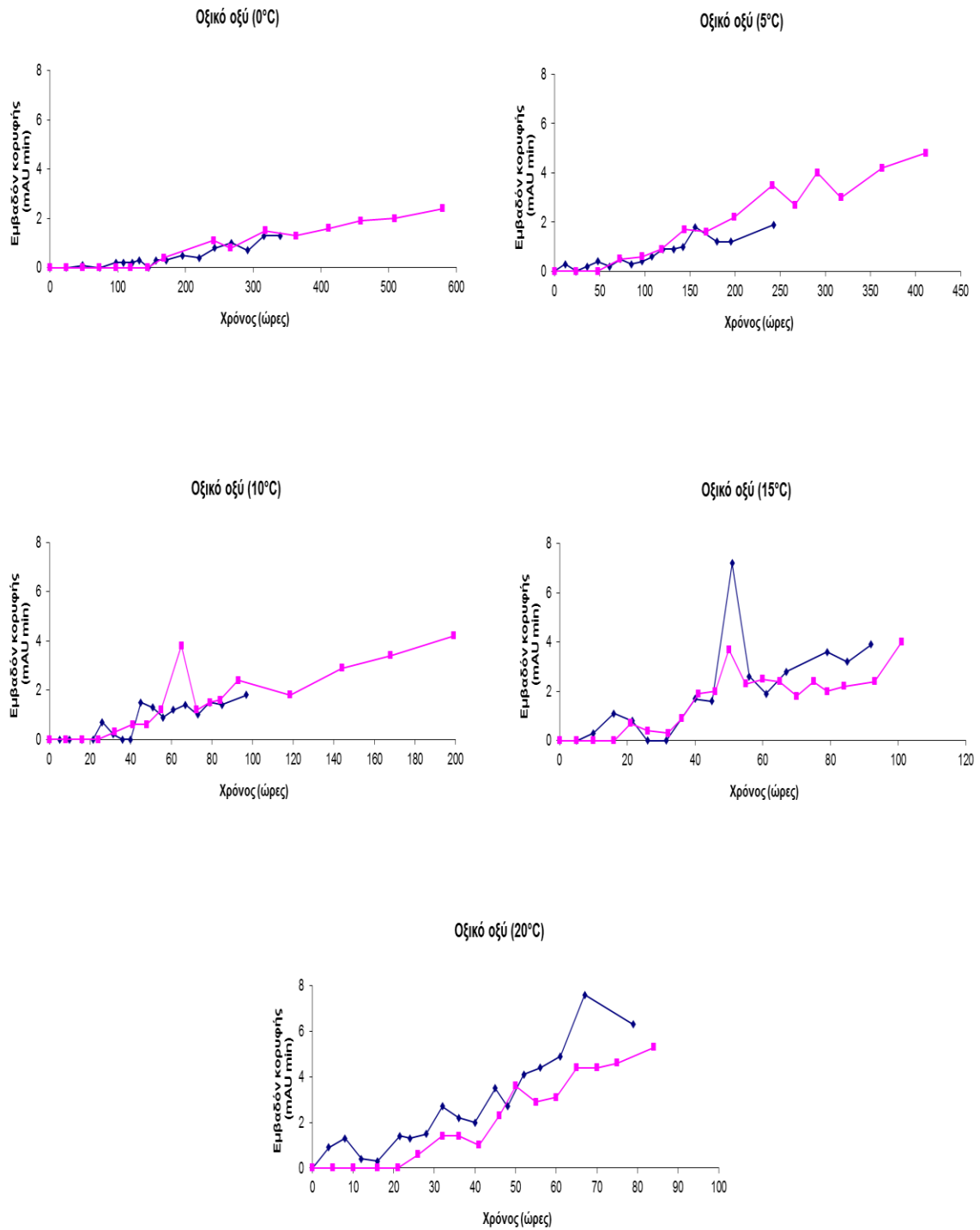
του γαλακτικού οξέος μειώθηκαν κατά την αερόβια αλλοίωση σε όλες τις θερμοκρασίες, ενώ αύξηση του ίδιου οξέος παρατηρήθηκε για τα δείγματα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Εικόνα 3.3.22). Το προπιονικό οξύ (κορυφή 15,1) αυξήθηκε στις θερμοκρασίες 10 και 15°C, ενώ στις πιο χαμηλές θερμοκρασίες δεν εμφανίστηκε κατά την αερόβια αλλοίωση. Αντίθετα, στα δείγματα που συντηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, η συγκέντρωση του προπιονικού οξέος αυξήθηκε σε θερμοκρασίες 5, 15 και 20°C. Μείωση παρατηρήθηκε στην ποσότητα του μυρμηκικού οξέος στις περισσότερες περιπτώσεις για τα δείγματα σε αερόβιες συνθήκες, ενώ για τα δείγματα σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες παρατηρήθηκε αύξηση στις περισσότερες περιπτώσεις (Εικόνα 3.3.23). Τέλος, η συγκέντρωση του οξικού οξέος αυξήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (Εικόνα 3.3.24).



Εικόνα 3.3.22: Αλλαγές στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος κατά τη συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C.



Εικόνα 3.3.23: Αλλαγές στη συγκέντρωση του μυρμηκικού οξέος κατά τη συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε αερόβιες και σε **συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας** σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C.



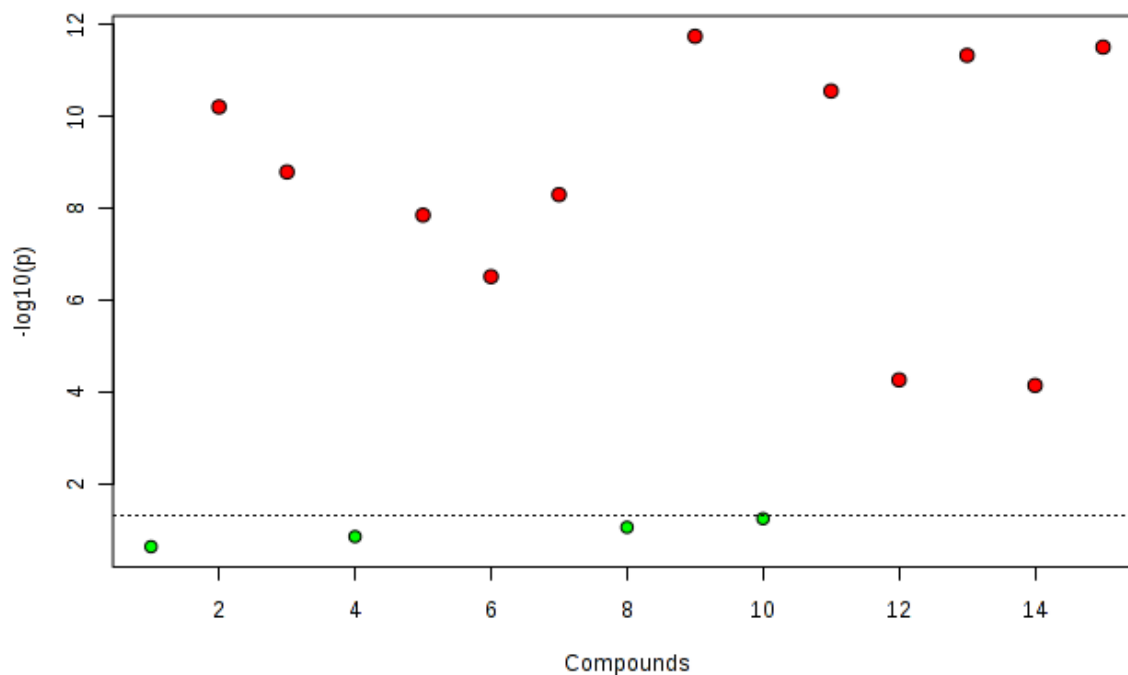
Εικόνα 3.3.24: Αλλαγές στη συγκέντρωση του οξικού οξέος κατά τη συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C.

3.3.4.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες

Στα αρχικά δεδομένα (εμβαδόν των κορυφών) που ελήφθησαν πραγματοποιήθηκε Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων (DFA) για τις πέντε θερμοκρασίες ώστε να γίνει κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κλάσεις (φρέσκα, σχετικά φρέσκα και αλλοιωμένα). Επιπλέον, τα δεδομένα αναλύθηκαν με το MetaboAnalyst (version 2.0) μέσω της ιστοσελίδας <http://www.metaboanalyst.ca>, για την ομαδοποίηση των δεδομένων (ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα, ανάλυση κατά συστάδες, διάγραμμα θερμικής απεικόνισης των δεδομένων και ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων).

3.3.4.2.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

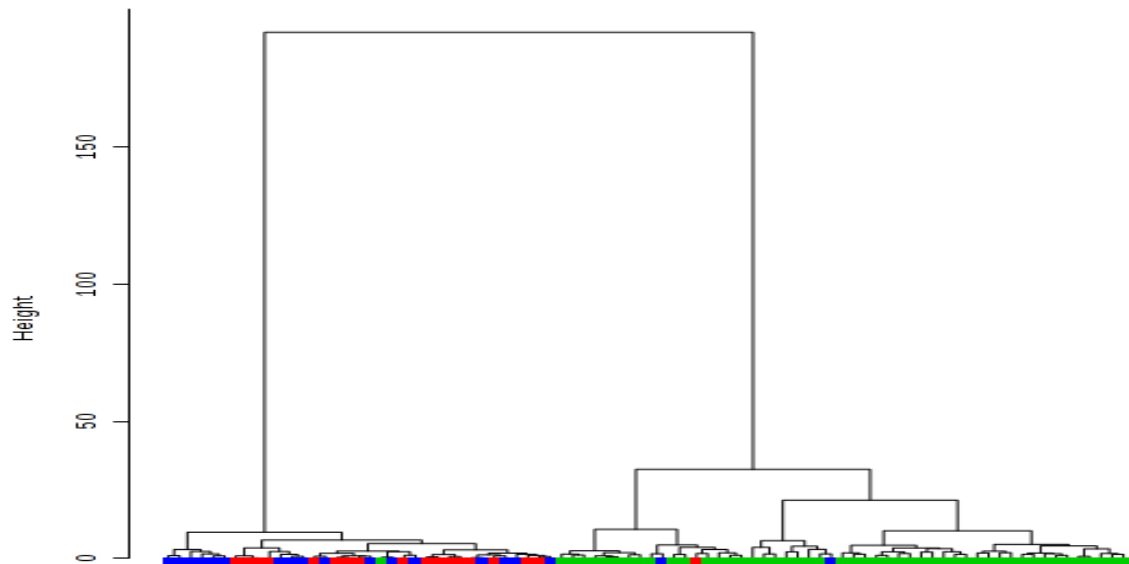
Τα δεδομένα από το εμβαδόν των κορυφών μαζί με την οργανοληπτική αξιολόγηση ομαδοποιήθηκαν σε δενδρόγραμμα και σε διάγραμμα θερμικής απεικόνισης (heatmap). Με το δενδρόγραμμα, έγινε διαχωρισμός των δειγμάτων βάση της ποιοτικής κατηγορίας που ανήκουν (Εικόνα 3.3.26) ενώ το διάγραμμα θερμικής απεικόνισης παρουσιάζει τις συσχετίσεις μεταξύ της ποιοτικής κατηγορίας των δειγμάτων και των κορυφών των οργανικών οξέων (Εικόνα 3.3.27). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση της διακύμανσης ώστε να μελετηθεί αν η συνολική σύγκριση μεταξύ των εκλουόμενων ουσιών και της ποιοτικής κατηγορίας του χοιρινού κιμά είναι σημαντική ή όχι. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως δεν είναι σημαντικά όλα τα οργανικά οξέα κατά την αερόβια αλλοίωση του χοιρινού κιμά (Εικόνα 3.3.25 και Πίνακας 3.3.18). Από τα οξέα που επιλέχθηκαν μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης (10 οξέα από το σύνολο των 15 οξέων), τα περισσότερα είναι δυνατόν να κάνουν διάκριση μεταξύ των ποιοτικών κατηγοριών «αλλοιωμένο από φρέσκο» και «αλλοιωμένο από σχετικά φρέσκο». Η κορυφή P6-9,6 (άγνωστη) είναι η μοναδική που είναι ικανή να κάνει διάκριση μεταξύ του «φρέσκο από σχετικά φρέσκο».



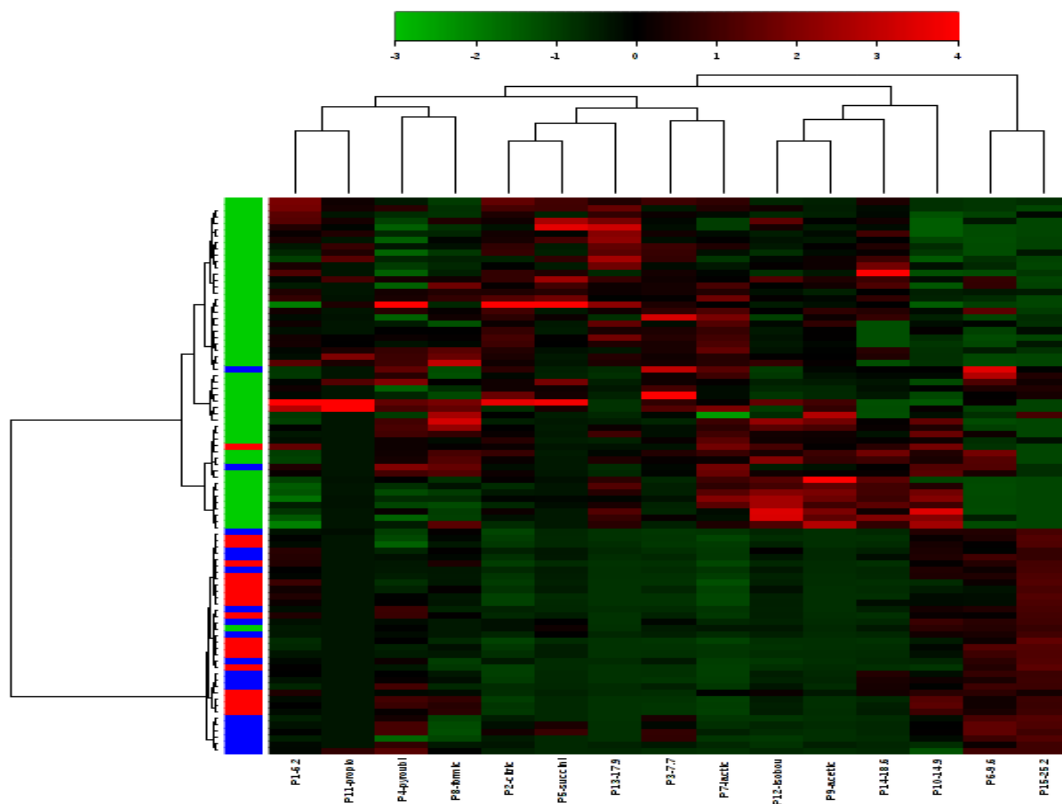
Εικόνα 3.3.25: Γραφική απεικόνιση της στατιστικής σημαντικότητας ($\alpha=0,05$) των κορυφών των οργανικών οξέων κατά την αερόβια συντήρηση χοιρινού κιμά. Τα πράσινα σημεία υποδηλώνουν μεταβλητές (οργανικά οξέα) που δεν είναι στατιστικά σημαντικές, ενώ αντίθετα τα κόκκινα σημεία χαρακτηρίζουν στατιστικά σημαντικές μεταβλητές

Πίνακας 3.3.18: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση του χοιρινού κιμά όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

Κορυφές (χρόνος κατακράτησης σε λεπτά)	Τιμή α	Fisher's LSD
P2-κιτρικό οξύ	0.0000	s - f; s - sf
P3-7,7 (άγνωστη)	0.0002	s - f; s - sf
P5-ηλεκτρικό οξύ	0.0004	s - f; s - sf
P6-9,6 (άγνωστη)	0,0000	f - s; sf - f; sf - s
P7-γαλακτικό οξύ	0,0000	s - f; s - sf
P9-οξικό οξύ	0,0000	s - f; s - sf
P12-ισοβουτυρικό οξύ	0.0001	s - f; s - sf
P13-17,9 (άγνωστη)	0,0000	s - f; s - sf
P14-18,6 (άγνωστη)	0.0010	s - f; s - sf
P15-25,2 (άγνωστη)	0,0000	f - s; sf - s



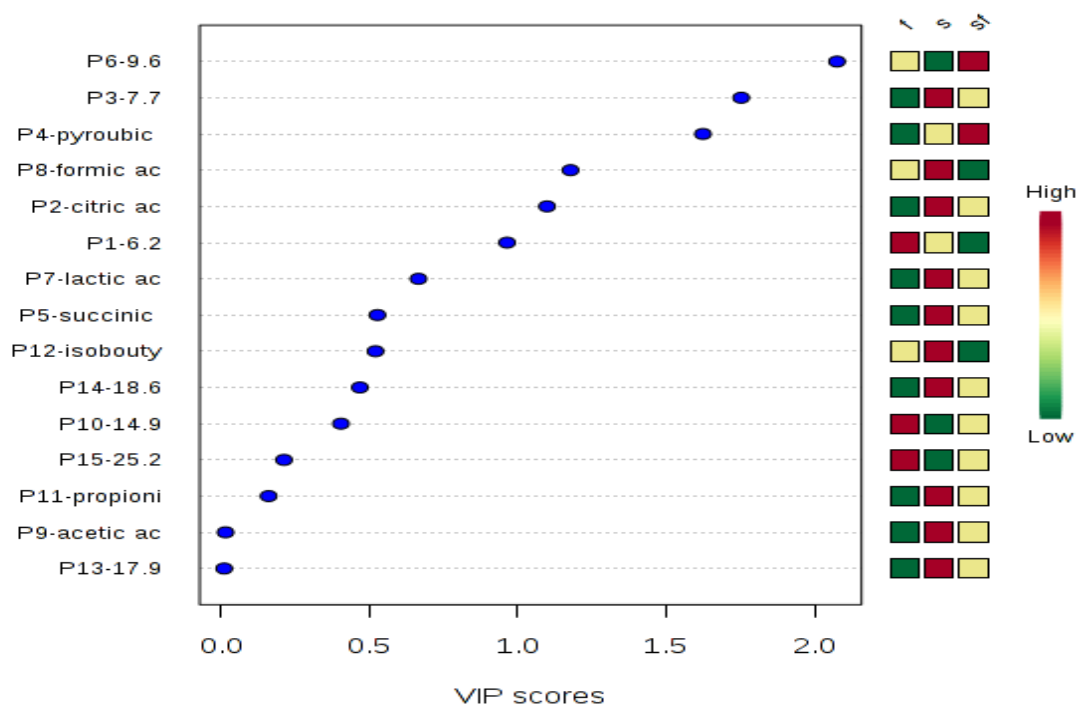
Εικόνα 3.3.26: Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ομαδοποίησης από τα δείγματα χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης ανά ποιοτική κατηγορία (φρέσκο, σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο)



Εικόνα 3.3.27: Διάγραμμα θερμικής απεικόνισης για τα δείγματα που συντηρήθηκαν αερόβια. Το πράσινο χρώμα σημαίνει χαμηλή συσχέτιση ενώ το κόκκινο χρώμα σημαίνει υψηλή συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού των χρωματογραφικών περιοχών και της αντίστοιχης κλάσης ποιότητας όπως προέκυψε από την οργανοληπτική αξιολόγηση (φρέσκο, σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 3.3.26) φαίνεται πως έγινε καλή συσχέτιση των ποιοτικών κατηγοριών του χοιρινού κιμά με τις δυναμικές αλλαγές των

χρωματογραφικών περιοχών των οργανικών οξέων σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος καθώς το δενδρόγραμμα διαχωρίζει τα δείγματα κιμά σε δύο μεγάλες συστάδες. Η μια συστάδα αποτελείται από τα αλλοιωμένα δείγματα, ενώ η άλλη από τα φρέσκα και τα σχετικά φρέσκα δείγματα. Τα ίδια αποτελέσματα παρουσιάζονται μέσω του διαγράμματος θερμικής απεικόνισης όπου απεικονίζεται η υψηλή ή χαμηλή συσχέτιση των ουσιών με τις ποιοτικές κατηγορίες του χοιρινού κιμά. Οι κορυφές P6-9,6 (άγνωστη), P4-πυροσταφυλικό οξύ, P10-14,9 (άγνωστη) και P15-25,2 (άγνωστη) είναι αυτές που σχετίζονται περισσότερο με τα φρέσκα ή τα σχετικά φρέσκα δείγματα.

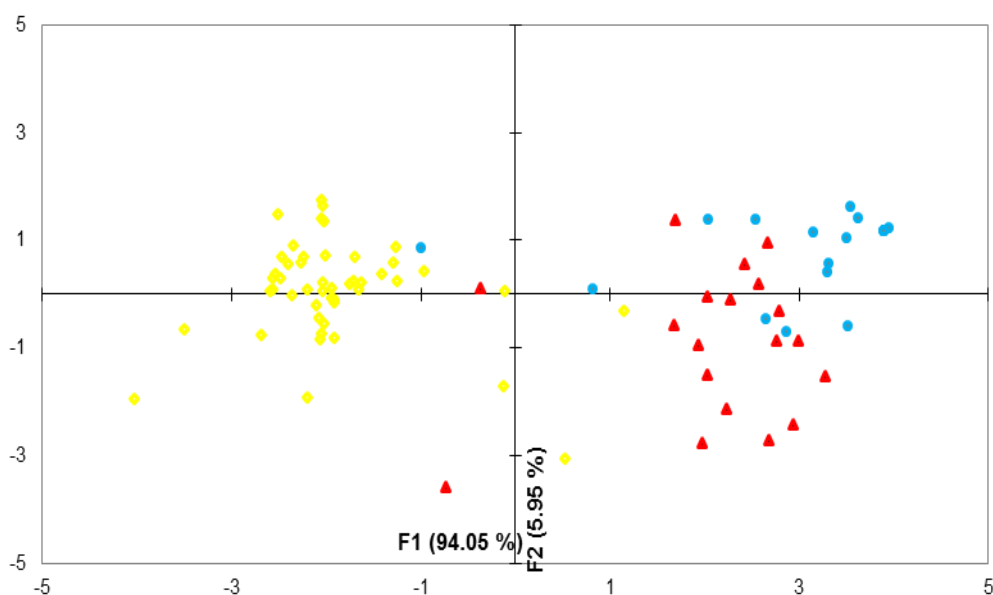


Εικόνα 3.3.28: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε κατηγορία της οργανοληπτικής αξιολόγησης

Κατόπιν, τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με ανάλυση PLS-DA (Εικόνα 3.3.28) όπου απεικονίζεται η σπουδαιότητα της κάθε ουσίας με μία από τις ποιοτικές κατηγορίες του κρέατος. Τα οργανικά οξέα που εκλούστηκαν στους χρόνους P1-6,2 (άγνωστη), P10-14,9 (άγνωστη), P15-25,2 (άγνωστη) σχετίζονται με τα φρέσκα δείγματα. Η ενδιάμεση ποιοτική κατηγορία (σχετικά φρέσκα) σχετίζεται με τα P4-

πυροσταφυλικό οξύ και P6-9,6 (άγνωστη), ενώ όλα τα υπόλοιπα οργανικά οξέα σχετίζονται καλύτερα με τα δείγματα που έχουν χαρακτηριστεί ως αλλοιωμένα.

Στη συνέχεια έγινε ανάλυση με DFA. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη DFA για τη θερμοκρασία παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.29. Οι δύο παράγοντες F εξηγούν το 100% της διακύμανσης των πειραματικών δεδομένων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως υπήρξε υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ των τριών κατηγοριών ποιότητας του χοιρινού κιμά καθώς κανένα δείγμα από την κατηγορία «φρέσκα» και «σχετικά φρέσκα» δεν ταξινομήθηκε σε λάθος κλάση ποιότητας, ενώ από την κατηγορία «αλλοιωμένα» έγιναν 2 λάθος ταξινομήσεις στην κατηγορία «σχετικά φρέσκα». Συγχρόνως, τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από διασταυρούμενη επικύρωση παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.19. Η τιμή για την ακρίβεια της μεθόδου ήταν 97,6% κατά την επικύρωση του μοντέλου.



Εικόνα 3.3.29: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης δύο παραγόντων για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες στις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά Φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα)

Πίνακας 3.3.19: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες έπειτα από διακριτική ανάλυση παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης

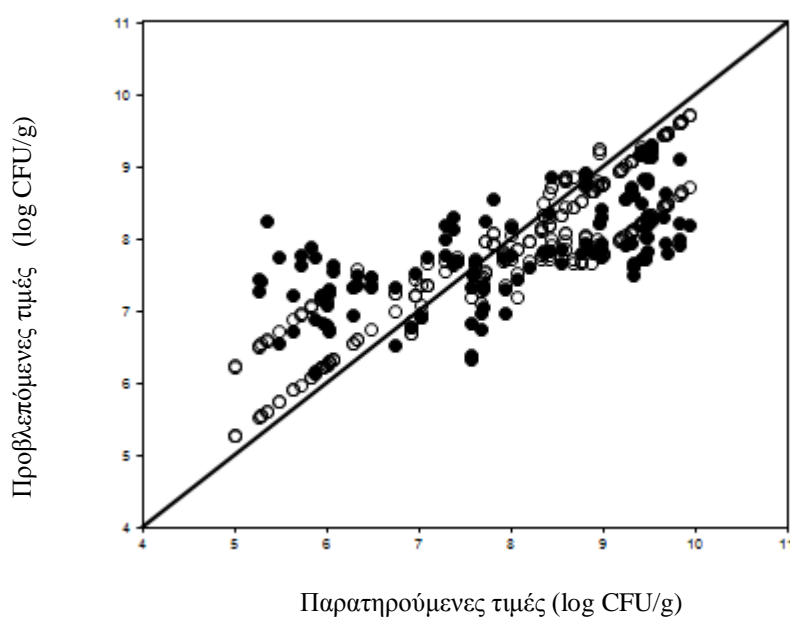
Πραγματική τάξη	Προβλεπόμενη τάξη			Σύνολο	Ευαισθησία (%)
	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
Φρέσκα	18	0	0	18	100
Σχετικά φρέσκα	0	19	0	19	100
Αλλοιωμένα	0	2	47	49	95,9
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					97,6

3.3.4.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με το εμβαδόν των κορυφών των οργανικών οξέων

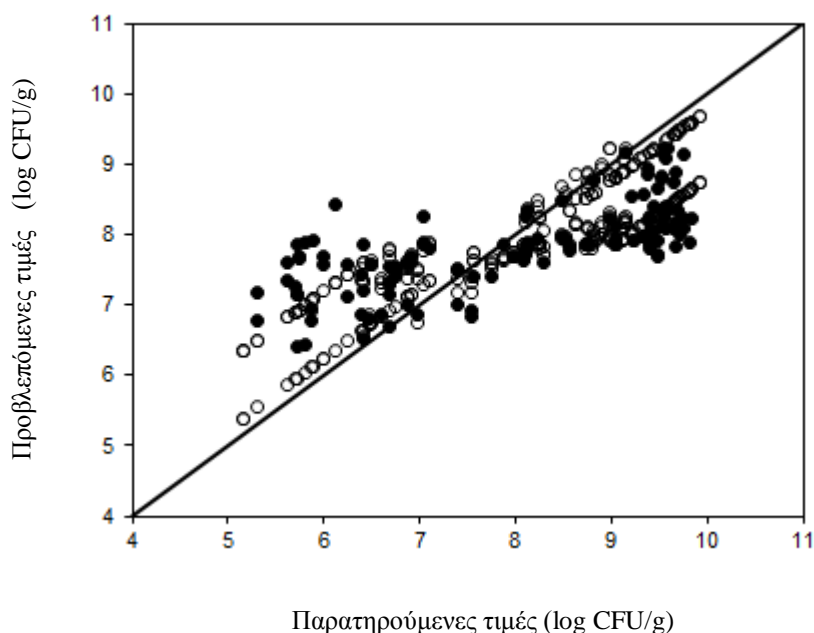
Στη συνέχεια έγινε συσχετισμός του εμβαδού των κορυφών που προέκυψαν από την ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων με το μικροβιολογικό φορτίο της κάθε μικροβιακής ομάδας ξεχωριστά. Δηλαδή, δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα με τη χρήση Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης, όπου τα δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) ήταν το εμβαδόν των κορυφών και τα δεδομένα εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) το μικροβιολογικό φορτίο (log CFU/g) από την κάθε κατηγορία μικροοργανισμών που απαριθμήθηκαν ξεχωριστά κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Τα μοντέλα αναπτύχθηκαν όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις και τα αποτελέσματα της επίδοσης των μοντέλων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.20. Δεν αναπτύχθηκαν μοντέλα για την οικογένεια των *Enterobacteriaceae* όπως και για τις ζύμες, καθώς η ανάπτυξή τους ξεκίνησε αφού τα δείγματα είχαν χαρακτηριστεί αλλοιωμένα από την ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης. Οι μέσες τιμές που λήφθηκαν για το δείκτη προκατάληψης (B_f) ήταν κοντά στη μονάδα σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, η μέση τιμή για το συντελεστή ακρίβειας (A_f) έδειξε πως η μέση απόκλιση μεταξύ των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών κυμάνθηκε από 13,2% για τις *Pseudomonas* spp., μέχρι 15,2% για τα γαλακτικά βακτήρια. Παρατηρήθηκε υποεκτίμηση του μικροβιακού φορτίου όπως φαίνεται στις Εικόνες 3.3.30 και 3.3.31 ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των δειγμάτων που ήταν αλλοιωμένα. Η

επίδοση του μοντέλου των SVM επαληθεύεται γραφικά με τη σύγκριση των παρατηρούμενων έναντι των προβλεπόμενων τιμών σε log CFU/g για επιλεγμένους μικροοργανισμούς (Εικόνες 3.3.30 και 3.3.31).

Τέλος, οι τιμές για το συντελεστή συσχέτισης (r) κυμάνθηκαν από 0,958 έως 0,994 κατά την εκπαίδευση του μοντέλου, ενώ κατά την επικύρωσή του από 0,726 έως 0,792. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, για τις παραπάνω τιμές (r) το μοντέλο που αναπτύχθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προβλέψεις του μικροβιακού πληθυσμού κατά προσέγγιση (Ait Kaddour et al., 2011).



Εικόνα 3.3.30: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών των *Pseudomonas* spp. κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)



Εικόνα 3.3.31: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)

Πίνακας 3.3.20: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με SVM συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά την αερόβια συντήρηση

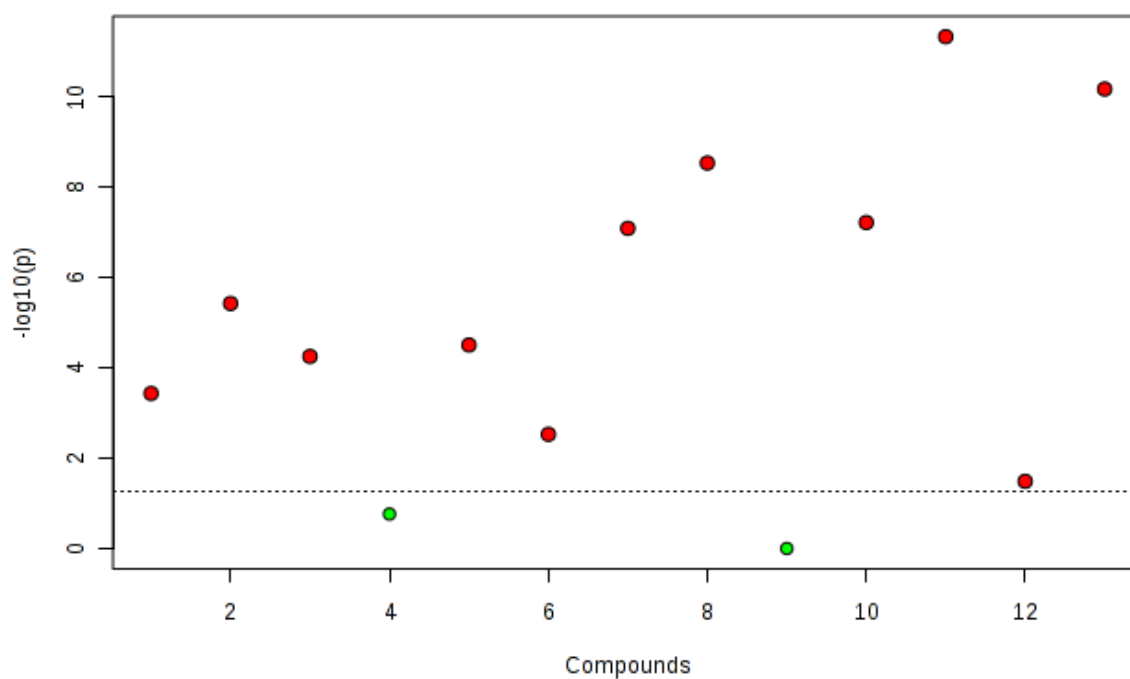
Σύνολο δεδομένων	Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	Γ_{train}	Γ_{test}
Μέσες τιμές	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0,994	1,133	0,666	1,108	0,958	0,792
	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,993	1,132	0,541	1,125	0,969	0,726
	<i>B. thermosphacta</i>	1,010	1,129	0,213	0,932	0,993	0,769
	Γαλακτικά βακτήρια	1,022	1,152	0,207	1,054	0,994	0,753

3.3.4.3. Ανάλυση χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Η ανάλυση του χοιρινού κιμά συντηρημένου σε MAP ακολούθησε την ίδια διαδικασία με την ανάλυση σε αερόβιες συνθήκες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

3.3.4.3.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

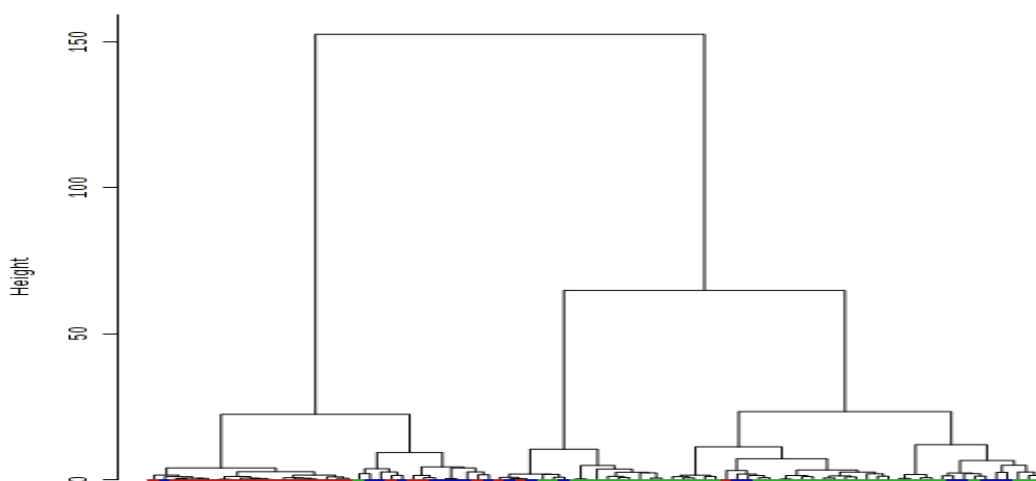
Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ανάλυση της διακύμανσης (Εικόνα 3.3.32 και Πίνακας 3.3.21) φαίνεται πως όλα τα οργανικά οξέα δεν είναι το ίδιο σημαντικά κατά την συντήρηση σε MAP του χοιρινού κιμά. 10 οξέα από το σύνολο των 13 οξέων επιλέχθηκαν μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης. Οι κορυφές P9-οξικό οξύ και P14-18,6 (άγνωστη) καθορίζουν τη διάκριση μεταξύ «αλλοιωμένο από φρέσκο», ενώ η κορυφή P1-6,2 (άγνωστη) προσδιορίζει τη διάκριση ανάμεσα σε «φρέσκο από αλλοιωμένο» και σχετικά φρέσκο από αλλοιωμένο». Η κορυφή P6-9,6 (άγνωστη) είναι η μοναδική που κάνει διάκριση των σχετικά φρέσκων δειγμάτων από τις υπόλοιπες κατηγορίες. Οι άλλες ουσίες διαφοροποιούν τις ποιοτικές κατηγορίες «αλλοιωμένο από φρέσκο» και «αλλοιωμένο από σχετικά φρέσκο», κ.ο.κ.



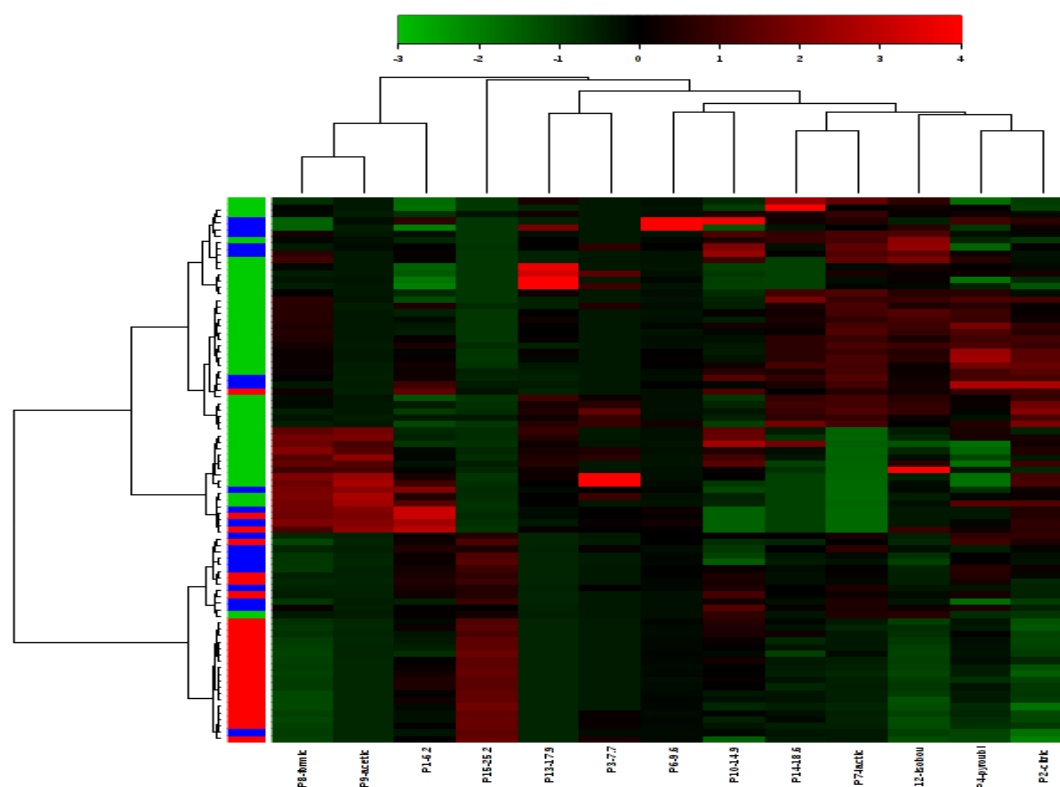
Εικόνα 3.3.32: Γραφική απεικόνιση της στατιστικής σημαντικότητας ($\alpha=0,05$) των κορυφών των οργανικών οξέων κατά την συντήρηση σε MAP χοιρινού κιμά. Τα πράσινα σημεία υποδηλώνουν μεταβλητές (οργανικά οξέα) που δεν είναι στατιστικά σημαντικές, ενώ αντίθετα τα κόκκινα σημεία χαρακτηρίζουν στατιστικά σημαντικές μεταβλητές

Πίνακας 3.3.21: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP του χοιρινού κιμά όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

Κορυφές (χρόνος κατακράτησης σε λεπτά)	Τιμή α	Fisher's LSD
P1-6,2 (άγνωστη)	0,0005	f - s; sf - s
P2-κιτρικό οξύ	0,0000	s - f; sf - f
P6-9,6 (άγνωστη)	0,0144	sf - f; sf - s
P7-γαλακτικό οξύ	0,0357	s - f; sf - f
P8-μυρμηκικό οξύ	0,0000	s - f; s - sf
P9-οξικό οξύ	0,0431	s - f
P12-ισοβουτυρικό οξύ	0,0000	s - f; sf - f
P13-17,9 (άγνωστη)	0,0000	s - f; s - sf
P14-18,6 (άγνωστη)	0,0151	s - f
P15-25,2 (άγνωστη)	0,0000	f - s; f - sf; sf - s

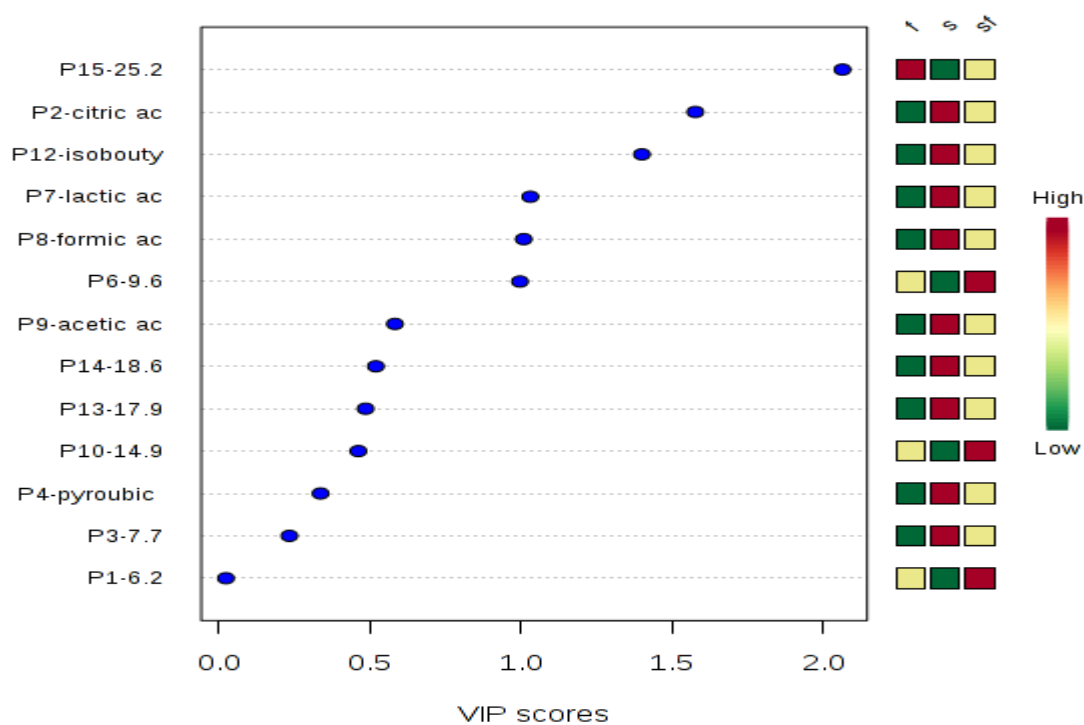


Εικόνα 3.3.33: Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ομαδοποίησης από τα δείγματα χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε MAP ανά ποιοτική κατηγορία (φρέσκο, σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο)



Εικόνα 3.3.34: Διάγραμμα θερμικής απεικόνισης για τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε MAP. Το πράσινο χρώμα σημαίνει χαμηλή συσχέτιση ενώ το κόκκινο χρώμα σημαίνει υψηλή συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού των χρωματογραφικών περιοχών και της αντίστοιχης κλάσης ποιότητας όπως προέκυψε από την οργανοληπτική αξιολόγηση (**φρέσκο**, **σχετικά φρέσκο** και **αλλοιωμένο**)

Κατόπιν, τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν με δενδρόγραμμα ιεραρχικής ομαδοποίησης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο δενδρόγραμμα της Εικόνας (3.3.33). Το δενδρόγραμμα διαχωρίζει τα δείγματα κιμά σε δύο μεγάλες συστάδες. Η μια συστάδα αποτελείται από τα αλλοιωμένα δείγματα, ενώ η άλλη αποτελείται από δύο ακόμα υποομάδες όπου διαχωρίζονται τα φρέσκα από τα σχετικά φρέσκα δείγματα σε μεγάλο ποσοστό. Τα ίδια αποτελέσματα παρουσιάζονται μέσω του διαγράμματος θερμικής απεικόνισης (Εικόνα 3.3.34) όπου απεικονίζεται η υψηλή ή χαμηλή συσχέτιση των ουσιών με τις ποιοτικές κατηγορίες του χοιρινού κιμά. Η κορυφή P15-25,2 (άγνωστη) είναι αυτή που σχετίζεται περισσότερο με τα φρέσκα δείγματα.

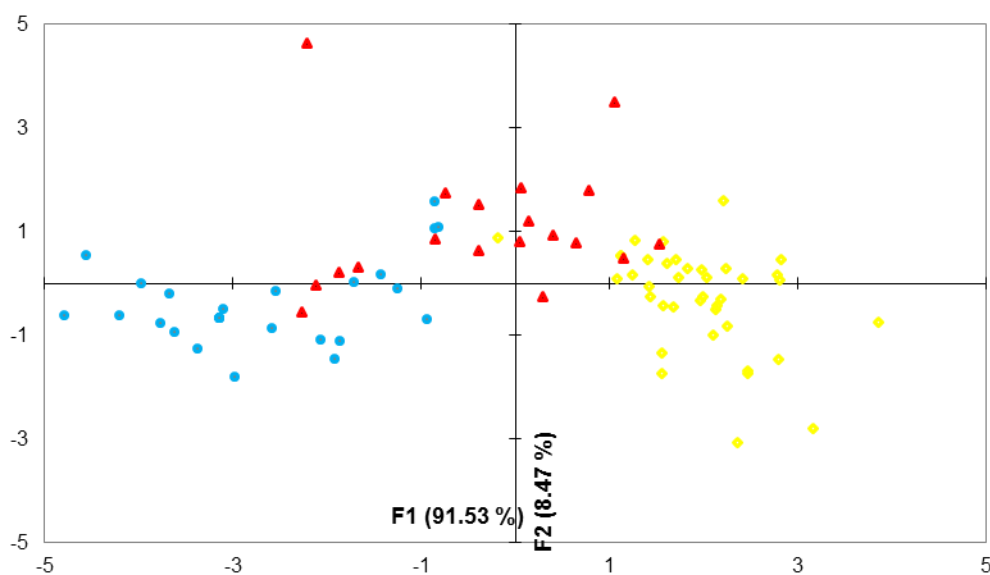


Εικόνα 3.3.35: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε κατηγορία της οργανοληπτικής αξιολόγησης

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με ανάλυση PLS-DA (Εικόνα 3.3.35) όπου απεικονίζεται η σπουδαιότητα της κάθε ουσίας με μία από τις ποιοτικές κατηγορίες του κρέατος. Το οργανικό οξύ που εκλούστηκε στο χρόνο P15-25,2 (άγνωστη) σχετίζεται με τα φρέσκα δείγματα ενώ τα οργανικά οξέα που εκλούστηκαν στους χρόνους P1-6,2 (άγνωστη), P6-9,6 (άγνωστη), P10-14,9 (άγνωστη), σχετίζονται με την ενδιάμεση ποιοτική κατηγορία (σχετικά φρέσκα). Όλα τα υπόλοιπα οργανικά οξέα σχετίζονται καλύτερα με τα δείγματα που έχουν χαρακτηριστεί ως αλλοιωμένα.

Ακολούθησε ανάλυση με DFA για όλες τις περιπτώσεις των δειγμάτων που είχαν συντηρηθεί σε MAP και τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.36. Οι δύο παράγοντες F εξηγούν το 100% της διακύμανσης των πειραματικών δεδομένων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως υπήρξε υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ των τριών κατηγοριών ποιότητας του χοιρινού κιμά καθώς κανένα δείγμα από την κατηγορία «φρέσκα» δεν ταξινομήθηκε σε λάθος κλάση ποιότητας, ενώ από τις κατηγορίες «σχετικά φρέσκα» και «αλλοιωμένα» έγινε 1 λάθος ταξινόμηση στην κατηγορία «φρέσκα» και «σχετικά φρέσκα» αντίστοιχα. Επίσης, στον Πίνακα 3.3.22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα

από διασταυρούμενη επικύρωση. Η τιμή για την ακρίβεια της μεθόδου ήταν αντίστοιχα 97,6% κατά την επικύρωση του μοντέλου.



Εικόνα 3.3.36: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης δύο παραγόντων για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες (● - Φρέσκα, ▲ - Σχετικά Φρέσκα, ◆ - Αλλοιωμένα)

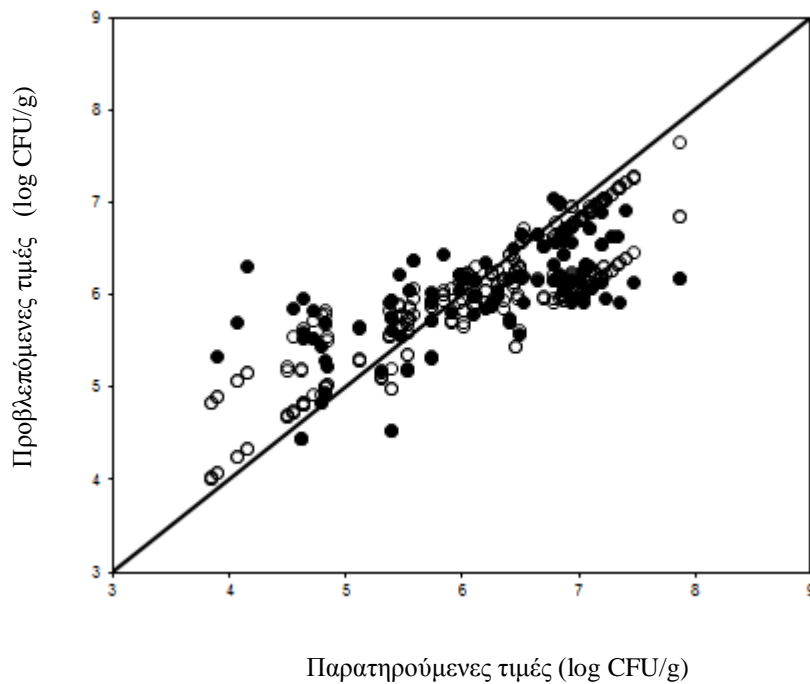
Πίνακας 3.3.22: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έπειτα από διακριτική ανάλυση παραγόντων των δεδομένων επικύρωσης

Πραγματική τάξη	Προβλεπόμενη τάξη			Σύνολο	Εναισθησία (%)
	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα		
Φρέσκα	26	0	0	26	100
Σχετικά φρέσκα	1	18	0	19	94,7
Αλλοιωμένα	0	1	38	39	97,4
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					97,6

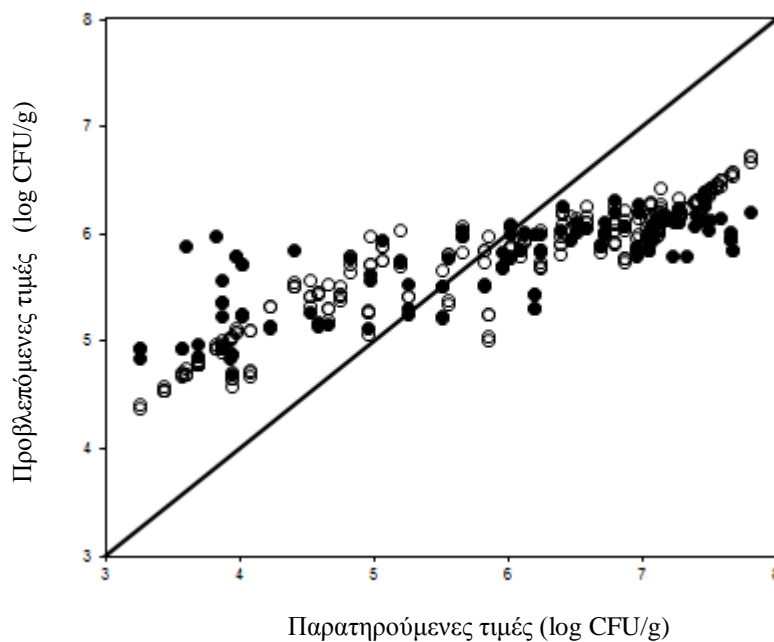
3.3.4.3.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με το εμβαδόν των κορυφών των οργανικών οξέων

Στη συνέχεια έγινε συσχετισμός των κορυφών που προέκυψαν από το εμβαδόν των κορυφών έπειτα από ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων, με το μικροβιολογικό φορτίο της κάθε μικροβιακής ομάδας ξεχωριστά. Δηλαδή, δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα με τη χρήση Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης, όπου τα δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) ήταν το εμβαδόν των κορυφών και τα δεδομένα εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) το μικροβιολογικό φορτίο ($\log \text{CFU/g}$) από την κάθε κατηγορία μικροοργανισμού που απαριθμήθηκαν ξεχωριστά. Τα μοντέλα αναπτύχθηκαν όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις και τα αποτελέσματα της επίδοσης των μοντέλων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.23. Οι μέσες τιμές που λήφθηκαν για το δείκτη προκατάληψης (B_f) ήταν κοντά στη μονάδα στις περισσότερες περιπτώσεις καταδεικνύοντας συμφωνία μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών. Στη περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3.38, παρατηρείται υποεκτίμηση του πληθυσμού τους μέχρι $2 \log \text{CFU/g}$ ιδιαίτερα σε δείγματα με μικροβιακό φορτίο άνω των $6 \log \text{CFU/g}$. Το ίδιο παρατηρείται για το συντελεστή ακρίβειας (A_f) καθώς η μέση απόκλιση μεταξύ των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών ήταν 18,0% για τα γαλακτικά βακτήρια. Η επίδοση του μοντέλου SVM επαληθεύεται γραφικά με τη σύγκριση των πραγματικών έναντι των προβλεπόμενων τιμών σε $\log \text{CFU/g}$ για επιλεγμένους μικροοργανισμούς (Εικόνες 3.3.37 και 3.3.38).

Τέλος, οι μέσες τιμές για το συντελεστή συσχέτισης (r) κυμάνθηκαν από 0,832 έως 0,947 κατά την εκπαίδευση του μοντέλου, ενώ κατά την επικύρωσή του από 0,639 έως 0,811. Η τιμή $r=0,639$ αφορούσε την ανάπτυξη του μοντέλου για τις ψευδομονάδες, κάτι που σημαίνει πως το μοντέλο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για προληπτικό έλεγχο και διαλογή, καθώς το 50% της μεταβλητής Y εξηγείται από τη μεταβλητή X . Για τις υπόλοιπες ομάδες των μικροοργανισμών, με την τιμή του συντελεστή συσχέτισης να βρίσκεται στο εύρος 0,66 έως 0,81, το μαθηματικό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαλογή και προβλέψεις κατά προσέγγιση (Ait Kaddour et al., 2011).



Εικόνα 3.3.37.: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών του *B. thermosphacta* κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)



Εικόνα 3.3.38: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης SVM (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)

Πίνακας 3.3.23: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου έπειτα από ανάλυση με Μηχανές Διανυσμάτων Υποστήριξης συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα των δειγμάτων χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Σύνολο δεδομένων	Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	Γ_{train}	Γ_{test}
Μέσες τιμές	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0,993	1,072	0,370	0,627	0,947	0,762
	<i>Pseudomonas</i> spp.	1,048	1,107	0,641	0,733	0,832	0,639
	<i>B. thermosphacta</i>	0,981	1,099	0,411	0,827	0,937	0,707
	Γαλακτικά βακτήρια	0,992	1,180	0,898	1,096	0,939	0,811

3.3.4.4. Συζήτηση

Η αλλοίωση των τροφίμων ανιχνεύεται με μικροβιολογικές και οργανοληπτικές μεθόδους (Dainty, 1996, Nychas et al., 2008). Μία εναλλακτική μέθοδος για τις προαναφερθείσες αναλύσεις περιλαμβάνει την μέτρηση των χημικών μεταβολών που συνδέονται με την ανάπτυξη της εφήμερης αλλοιωγόνου χλωρίδας κατά την συντήρηση του κρέατος και των προϊόντων του (Nychas et al., 1998, 2008, Skandamis & Nychas, 2001). Η συγκέντρωση ουσιών στο κρέας όπως γλυκογόνο, γλυκόζη και γαλακτικό οξύ, αν και βρίσκεται σε χαμηλότερα ποσά συγκριτικά με τα αντίστοιχα των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, είναι αρκετή για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Koutsoumanis & Nychas, 1999). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν το είδος και το ποσοστό της αλλοίωσης και αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις των μικροβιακών μεταβολιτών που αντιλαμβανόμαστε ως αλλοίωση (Nychas et al., 1998, 2008, Koutsoumanis & Nychas, 1999, Labropoulou et al., 1996). Έτσι, η σχέση μεταξύ της μικροβιακής ανάπτυξης και των χημικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά τη συντήρηση κρέατος έχει αναγνωριστεί ως ένα εν δυνάμει μέσο για την εύρεση δεικτών που μπορεί να είναι χρήσιμοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ποιότητας του κρέατος (Argyri et al., 2011, Dainty, 1996, Nychas et al., 2008). Από τους διάφορους μικροβιακούς μεταβολίτες που έχουν ανιχνευθεί σε κρέας, οι πλέον συχνότεροι προέρχονται από τα προϊόντα της γλυκολιτικής οδού και είναι τα παρακάτω οξέα; γαλακτικό, κιτρικό, μυρμηκικό, οξικό, γλυκονικό, προπιονικό και ηλεκτρικό οξύ (Argyri et al., 2011, Borch et al., 1996, Dainty, 1996, Ercolini et al.,

2006, 2009, Nychas et al., 2008, Skandamis & Nychas, 2002). Παρά το γεγονός πως η πιο συχνά εφαρμοζόμενη τεχνική για την ανάλυση των οργανικών οξέων είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), η εφαρμογή της σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι περιορισμένη (Nychas & Tassou, 1997). Οι Skandamis και Nychas (2001, 2002) μελέτησαν το προφίλ των οργανικών οξέων σε δείγματα βόειου κρέατος και βόειου κιμά τα οποία είχαν συντηρηθεί σε διάφορες συνθήκες συσκευασίας και θερμοκρασίας με ή χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης και παρατήρησαν αλλαγές στη μεταβολή των οργανικών οξέων κατά τις διάφορες συνθήκες συσκευασίας. Αντίστοιχα, οι Koutsoumanis & Nychas (1999), αναφέρουν διαφορές στις ποσότητες των οργανικών οξέων από στείρο ιστό ψαριού συγκριτικά με τις αντίστοιχες που προέρχονται από εμβολιασμένο ιστό ψαριού με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς. Παρόμοια αποτελέσματα για στείρο ιστό κρέατος εμβολιασμένο με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς αναφέρουν οι Tsigarida & Nychas (2001), καθώς παρατηρούν διαφορές στο προφίλ των οργανικών οξέων ανάλογα με τη συσκευασία και τον μικροοργανισμό που είχε εμβολιαστεί το κρέας.

Στην παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των οργανικών οξέων με HPLC έδειξαν πως οι 16 εκλούμενες ουσίες δεν σχετίζονταν για όλες τις περιπτώσεις με τη θερμοκρασία ή τη συσκευασία. Για παράδειγμα, το γαλακτικό οξύ, το οποίο παράγεται κυρίως από τα γαλακτικά βακτήρια μέσω της γλυκολυτικής οδού, στην αερόβια αλλοίωση μειώθηκε, ενώ στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας παρέμεινε σταθερό και αυξήθηκε προς το τέλος της συντήρησης του χοιρινού κιμά. Η μείωση του γαλακτικού οξέος μπορεί να σχετίζεται με αλλαγές στις μεταβολικές οδούς ορισμένων μικροβίων, όπως των ετεροζυμωτικών ή ομοζυμωτικών στελεχών των γαλακτικών βακτηρίων (Nychas et al., 1998). Περισσότερα γαλακτικά βακτήρια με ετεροζυμωτικό χαρακτήρα οδηγούν στην παραγωγή, μέσω της πεντόζης-φωσφορικής οδού (pentose-phosphate pathway), γαλακτικού οξέος, ακεταλδεΐδης και αιθανόλης (Zaunmüller et al., 2006). Αντίθετα, το οξικό οξύ αυξήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, με πιο εμφανή την αύξηση κατά την αερόβια αλλοίωση. Το οξικό οξύ παράγεται από τα περισσότερα μέλη της μικροβιακής κοινότητας που είναι παρόντα στο κρέας (*Pseudomonas* spp, *Br. thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* και γαλακτικά βακτήρια) και επομένως ήταν αναμενόμενη η αύξηση της συγκέντρωσής του. Επίσης, η αύξηση

κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι πιθανόν να οφείλεται στην οξείδωση του ενδογενούς και του μικροβιακού d- και l- γαλακτικού οξέος από διάφορα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων όταν οι πηγές γλυκόζης έχουν εξαντληθεί ή εξαιτίας του ετεροζυμωτικού χαρακτήρα των συγκεκριμένων στελεχών (Argyri et al., 2011, Drosinos & Board, 1995, Doulgeraki et al., 2010b). Άλλα οξέα, όπως προπιονικό, ισοβουτυρικό, άγνωστα (P14-18,6, P15-25,2), δεν έδειξαν κάποια ιδιαίτερη τάση σε σχέση με το χρόνο και το είδος συσκευασίας κατά τη συντήρηση των δειγμάτων. Έτσι, η χρήση των επιμέρους ενώσεων οι οποίες είναι μικροβιακοί μεταβολίτες, ως δυνητικούς δείκτες αλλοίωσης, είναι αμφισβητήσιμη διότι δεν μπορούν να ικανοποιηθούν συγκεκριμένα κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά προϋποθέτουν ότι η ένωση: α) θα πρέπει να είναι απύσση ή σε χαμηλά επίπεδα στο κρέας, β) θα πρέπει να αυξηθεί με την αποθήκευση και γ) θα πρέπει να παράγεται από την κυρίαρχη χλωρίδα και να έχει καλή συσχέτιση με τον οργανοληπτικό έλεγχο. Σε παρόμοια συμπεράσματα έχουν καταλήξει και άλλοι ερευνητές (Argyri et al., 2011, Dainty, 1996, Ellis et al., 2002, Goodacre et al., 2004, Jay, 1986).

Για να μπορέσει να γίνει ολοκληρωμένη ανάλυση είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω στρατηγικές, οι οποίες έχουν ευρύτερη κάλυψη όσον αφορά τον τύπο και τον αριθμό των μεταβολιτών που αναλύθηκαν (Goodacre et al., 2004). Αυτή η προσέγγιση εξετάστηκε σε αυτό το κεφάλαιο μέσω της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης, χρησιμοποιώντας PLS-DA, ανάλυση διακύμανσης, DFA, και SVM και τα αποτελέσματα ήταν ελπιδοφόρα. Η προσέγγιση μέσω της ανάλυσης της διασποράς ενός παράγοντα, βοήθησε στη διάκριση των οργανικών οξέων μεταξύ των ποιοτικών κατηγοριών του κρέατος αλλά και των δύο συσκευασιών καθώς τα οξέα που προσδιορίστηκαν είχαν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με το περιβάλλον συσκευασίας. Η ανάλυση με DFA έδωσε πολύ υψηλά ποσοστά διάκρισης των τριών προκαθορισμένων ποιοτικών κατηγοριών του κρέατος. Ειδικότερα, κανένα δείγμα δεν χαρακτηρίστηκε φρέσκο ενώ ήταν αλλοιωμένο και το αντίθετο. Τέλος, η εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου των μικροβιακών ομάδων του κρέατος με SVM έδωσε ικανοποιητικούς δείκτες συσχέτισης.

Πιο πρόσφατες εργασίες έχουν χρησιμοποιήσει την HPLC σε συνδυασμό με πολυμεταβλητές στατιστικές τεχνικές με σκοπό τη πρόβλεψη της αλλοίωσης με περισσότερη ακρίβεια. Οι Argyri et al. (2011), χρησιμοποίησαν τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση του προφίλ των οργανικών οξέων μέσω της HPLC από

βόειο κιμά συντηρημένο σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας, σε συνδυασμό με πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση (PCA, DFA, PLS-R) σε μία προσπάθεια διάκρισης της ποιοτικής κατηγορίας του κρέατος και της εκτίμησης του φορτίου της κάθε βακτηριακής ομάδας ξεχωριστά. Στην προαναφερθείσα εργασία, η ανάλυση με DFA έδωσε υψηλά ποσοστά ταξινόμησης για την ποιοτική κατάταξη του βόειου κιμά παρόμοια με αυτά της παρούσας εργασίας. Επίσης, οι δείκτες επίδοσης του μοντέλου παλινδρόμησης PLS-R ήταν υψηλοί, ενώ παρατηρήθηκε υπερεκτίμηση του πληθυσμού της OMX σε περιπτώσεις που ο παρατηρούμενος πληθυσμός ήταν χαμηλός (Argyri et al., 2011). Αντίστοιχα, μια πρόσφατη εργασία για μεταποιημένο προϊόν κρέατος διερεύνησε την δυνατότητα εκτίμησης της εμπορικής διάρκειας ζωής του προϊόντος χρησιμοποιώντας το προφίλ 3 οργανικών οξέων από την HPLC σε συνδυασμό με την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος και τη πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση (Stolzenbach et al., 2009). Στη συγκεκριμένη εργασία οι ερευνητές αναφέρουν πως δεν ήταν εφικτό να βρεθεί μέσω της ανάλυσης της παλινδρόμησης κάποιο από τα εξεταζόμενα οξέα κατάλληλο για εκτίμηση της οργανοληπτικής κατάστασης του προϊόντος και πρόβλεψη της εμπορικής διάρκειας ζωής του.

Σε αυτήν τη μελέτη έγινε προσπάθεια να συγκριθούν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρονοβόρα και διαθέσιμη εκ των υστέρων μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων, την οργανοληπτική αξιολόγηση που απαιτεί ειδικά εξειδικευμένο προσωπικό με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τη χρήση προηγμένων στατιστικών πακέτων. Ο συνδυασμός των μεταβολιτών, που λαμβάνονται από την HPLC, με τη πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση φαίνεται να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στη διάκριση ποιότητας κρέατος και εκτίμησης του πληθυσμού των επιμέρους μικροβιακών ομάδων του κρέατος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως μια μέθοδος γρήγορης ανίχνευσης της αλλοίωσης του κρέατος. Ωστόσο, είναι προφανές ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επικύρωση αυτής της προσέγγισης, χρησιμοποιώντας διαφορετικές παρτίδες κρέατος με διαφορετικό μικροβιακό φορτίο, pH και από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο μεγαλύτερη βάση δεδομένων για την ανάπτυξη και επικύρωση μαθηματικών μοντέλων.

3.3.5. Ανάλυση χοιρινού κιμά με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης HS/SPME

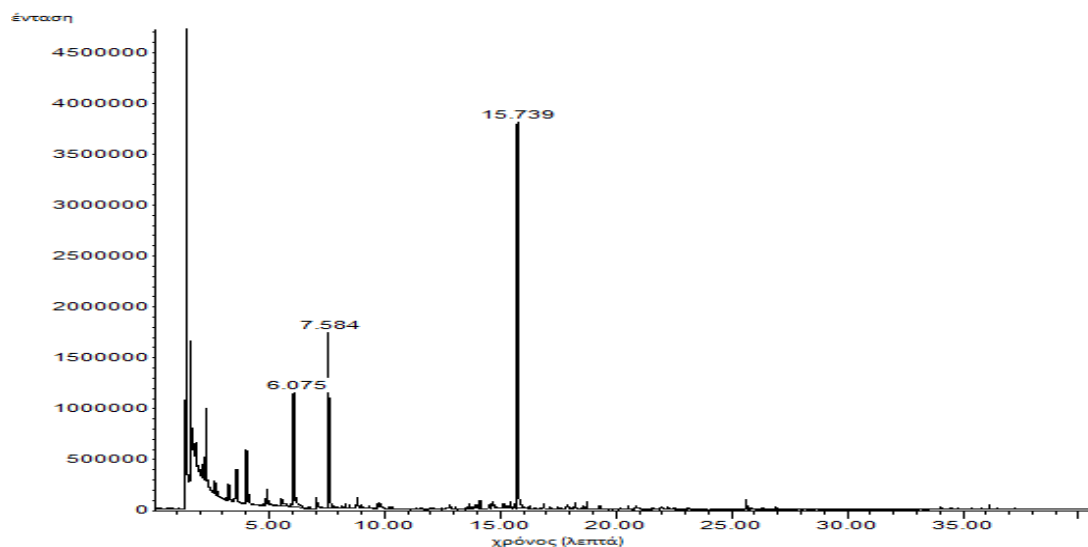
Τα δείγματα χοιρινού κιμά που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας συμπεριλάμβαναν 47 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και 46 δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η κάθε μέτρηση έγινε εις διπλούν και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Διακριτική Ανάλυση Παραγόντων (DFA) και με Γραμμική Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) (βλέπε Κεφ. 2).

3.3.5.1. Ανάλυση πτητικών ενώσεων

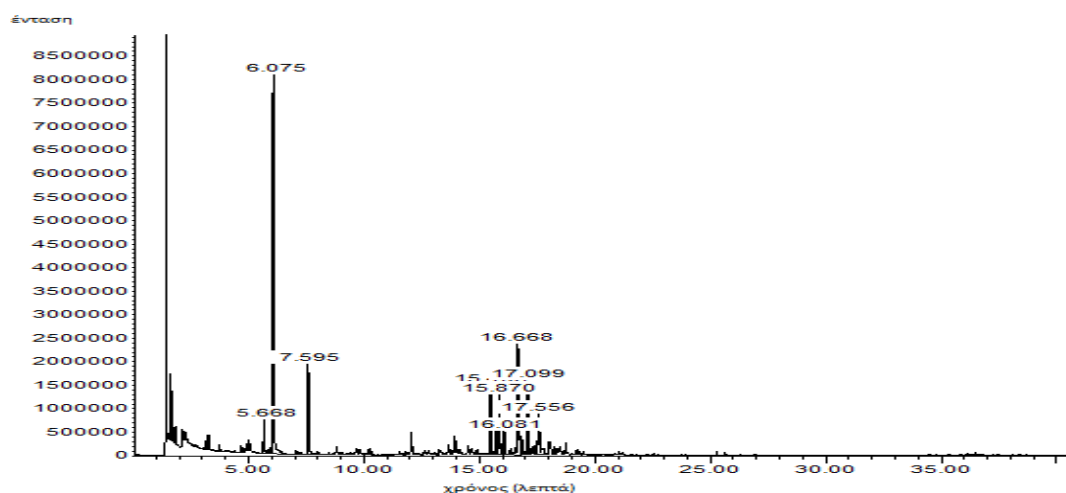
Η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας, διευκόλυνε τη διερεύνηση των πτητικών ενώσεων που είναι παρούσες κατά τη συντήρηση του χοιρινού κιμά σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας. Ο Πίνακας 3.3.24 δείχνει τις ουσίες που ανιχνεύθηκαν στο χοιρινό κιμά στις πέντε θερμοκρασίες συντήρησης και στις δύο συσκευασίες. Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν βρέθηκαν να εξαρτώνται από τη θερμοκρασία ή/και τη συσκευασία. Η Εικόνα 3.3.39 αντιπροσωπεύει ένα τυπικό φασματογράφημα αέριας χρωματογραφίας κατά την αερόβια αλλοίωση σε θερμοκρασία 10°C και στην Εικόνα 3.3.40 φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα κατά την αλλοίωση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασία 0°C.

Η παρουσία ή απουσία πτητικών ουσιών που βρέθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις στο χοιρινό κιμά και οι ουσίες που επιλέχθηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της οργανοληπτικής ποιότητας καθώς και την εκτίμηση του μικροβιολογικού φορτίου του χοιρινού κιμά σημειώνονται στον Πίνακα 3.3.24. Από μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν, μερικές από τις αναγνωρισμένες ενώσεις της παρούσας έρευνας έχουν βρεθεί κατά τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος και προϊόντων κρέατος σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας σε παρόμοιες μελέτες (Calkins et al., 2007, Dainty et al., 1989, Edwards et al., 1987, Ercolini et al., 2009, Insausti et al., 2002, Jackson et al., 1992, Leroy et al., 2009, Stutz et al., 1991, Tsigarida & Nychas, 2001). Σε κάθε μελέτη ταυτοποιήθηκε μια πληθώρα από διαφορετικές ενώσεις ανάλογα με τη

χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο, το είδος του κρέατος και τις συνθήκες αποθήκευσης, καθιστώντας τις συσχετίσεις δύσκολες. Οι κύριες ομάδες των πτητικών ενώσεων που έχουν βρεθεί κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης του κρέατος είναι οι ακόλουθες: αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες, εστέρες και θειούχες ενώσεις (Ercolini et al., 2009, Leroy et al., 2009, Nychas et al., 2007).



Εικόνα 3.3.39.: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασία 10°C έπειτα από 67 ώρες συντήρησης



Εικόνα 3.3.40.: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασία 0°C έπειτα από 118 ώρες συντήρησης

Για να περιγραφεί η συμπεριφορά των πτητικών ουσιών που ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά, η κάθε ομάδα ενώσεων (οξέα, αλκοόλες, καρβονυλικές ενώσεις, εστέρες, υδρογονάνθρακες, τερπένια και διάφορες ουσίες) χωρίστηκε σε υποομάδες σύμφωνα με την ομοιότητα που παρουσίαζαν στην κινητική κατά τη συντήρηση του χοιρινού κιμά.

Πίνακας 3.3.24: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15 και 20°C

Ουσίες	Ιόν στόχος (m/z) ^a	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	LRI ^b	ΑΕΡΑΣ					MAP					
				0	5	10	15	20	0	5	10	15	20	
Οξέα														
Οξικό οξύ*	60	2.321	624	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Αλκοόλες														
Αιθανόλη*	45	1.554	516	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπανόλη*	31	1.859	567	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
Πεντ-1-εν-3-όλη*	57	2.907	675	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-μέθυλοβουταν-1-όλη*	55	3.886	725	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μέθυλοβουταν-1-όλη	56	3.974	729	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξαν-2-όλη*	45	4.532	753	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Πενταν-1-όλη*	42	4.777	759	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξανόλη*	56	8.614	870	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-βουτοξυπροπαν-2-όλη*	57	11.549	943	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-1-εν-3-όλη*	57	13.141	980	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοεξαν-1-όλη*	57	15.108	1030	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2,6-διμέθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	59	16.8	1074	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-φαινυλαιθανόλη	91	18.267	1112	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Καρβονυλικές ενώσεις														
<i>Αλδεΐδες</i>														
3-μέθυλοβουτανάλη*	58	2.57	647	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μέθυλοβουτανάλη*	57	2.691	657	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Εξανάλη	56	5.873	802	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Πεντανάλη*	58	3.127	697	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Επτανάλη*	70	9.86	902	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Επταν-2-άλη*	83	12.125	954	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Φαινυλακεταλδεΐδη*	91	15.605	1043	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτανάλη	43	14.091	1003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
τρανς οκτεν-2-άλη*	70	16.258	1060	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Εννεανάλη*	57	17.981	1105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Κετόνες</i>														
Ακετόνη*	58	1.628	527	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Διακετύλιο (βουτανο-2,3-διόνη)*	86	2.002	591	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ακετοΐνη (3-υδρόξυβουταν-2-όνη)*	45	3.542	715	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Επταν-2-όνη*	43	9.43	888	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτανε-2,5-διόνη*	43	13.371	987	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Εννεαν-2-όνη*	58	17.566	1094	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Βουταν-2-όνη*	72	2.074	600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,1,δικυκλοπεντανόνη				-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Οκτ-1-εν-3-όνη*	70	13.33	980							+	+	+	+	+
Εστέρες														
(E)-2-μεθυλοβουτενοϊκός αιθυλεστέρας	83	11.547	943	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
οξικός προπυλεστέρας	61	3.472	712	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
2-μέθυλοβουτυλ αιθυλεστέρας	43	9.067	882	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
αιθυλ-4-μέθυλοπεντανοϊκός εστέρας	88	12.587	963	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

προπιονικός αιθυλεστέρας	57	3.416	710	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας	71	4.576	754	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
αιθυλ-2-μέθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	57	7.821	848	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
αιθυλ-3-μέθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας*	88	7.956	851	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ισοαμυλικός αιθυλεστέρας	70	8.939	879	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
βουτανοϊκός αιθυλεστέρας*	88	5.949	805	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
εξανοϊκός αιθυλεστέρας*	88	14.01	1001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτανοϊκός αιθυλεστέρας*	88	21.38	1198	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
βουτυλικός αιθυλεστέρας*	43	6.49	818	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
οξικός αιθυλεστέρας*	61	2.203	613	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
οξικός εξυλεστέρας *	43	14.545	1016	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Υδρογονάνθρακες													
Επτ-1-ένιο	56	3.04	689	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C7 ^γ	71	3.164	700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	4.884	767	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	5.434	787	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	8.341	864	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C8	85	5.823	802	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-4-ένιο	112	6.086	808	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-2-ένιο	112	6.365	815	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	55	4.484	751	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	69	6.963	830	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	13.464	989	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.441	1065	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C9	57	9.797	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	9.273	887	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	97	8.712	873	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	11.612	944	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C10	57	13.948	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	13.383	987	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	15.257	1034	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	15.458	1040	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	15.719	1046	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	15.928	1052	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.027	1054	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.104	1056	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.69	1071	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	141	16.877	1076	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.951	1078	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	17.567	1094	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	18.483	1118	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	18.59	1121	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	18.744	1126	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	20.232	1167	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.595	1069	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	17.321	1087	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	17.391	1089	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	15.134	1025	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο	57	17.849	1100	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	14.325	1010	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	14.897	1025	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.243	1060	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.595	1069	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Δωδεκένιο	57	21.472	1200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Βενζόλιο	78	2.67	655	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθυλοβενζόλιο	91	8.125	858	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Τολουόλιο	91	4.712	757	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ξυλ-1-ένιο	91	8.448	864	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ξυλ-2-ένιο	91	9.438	891	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Στυρένιο	104	9.356	888	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερή του βενζολίου	105	13.588	992	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερή του βενζολίου	105	14.732	1021	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ναφθαλένιο	128	20.731	1180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ινδάνιο	117	15.198	1033	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Τερπένια														
α-πινένιο	93	11.091	930	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Μυρκενίο	93	13.559	991	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρ-3-ένιο	93	14.249	1009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-κυμένιο	119	14.865	1024	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Λιμονένιο	93	15.022	1028	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
g-τερπινένιο	93	16.232	1059	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του p-κυμενίου	119	17.222	1085	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Διάφορες ουσίες														
2-αιθυλοφουράνιο	81	3.212	702	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,4-διθειοπεντάνιο	61	9.221	886	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Φαινόλη	94	13.309	985	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-πέντυλο φουράνιο	81	13.603	991	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	69	18.571	1121	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	82	24.654	1295	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	82	25.329	1316	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Διμεθυλοσουλφίδιο	62	1.712	543	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Διμέθυλο δισουλφίδιο	94	4.11	737	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Διμέθυλο τρισουλφίδιο	126	12.743	966	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
μεθυλοξική θειόλη	90	3.182	701	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Μεθανθειόλη	48	1.507	508	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+

^α: ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση

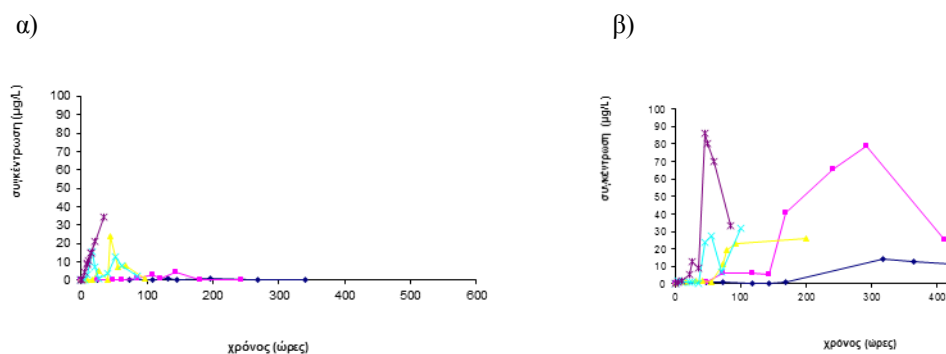
^β: γραμμικοί δείκτες κατακράτησης

^γ: κορεσμένα κανονικά αλκάλια

*: αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της οργανοληπτικής ποιότητας και του μικροβιακού φορτίου

Οξέα

Κατά τη συντήρηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά ανιχνεύθηκε μόνο το οξικό οξύ. Στην παρακάτω Εικόνα (Εικόνα 3.3.41) παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσής του σε σχέση με το χρόνο. Φαίνεται πως το οξικό οξύ στην αερόβια αλλοίωση εμφανίζεται έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα συντήρησης των δειγμάτων, ιδιαίτερα στις θερμοκρασίες των 0, 5, και 10°C και παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα της συντήρησης σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, το οξικό οξύ αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης και στη συνέχεια ακολουθεί πτωτική τάση.



Εικόνα 3.3.41: Μεταβολή του οξικού οξέος σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)

Αλκοόλες

Η ομάδα των αλκοολών που ανιχνεύθηκε περιείχε 13 αλκοόλες. Στις Εικόνες 3.3.42., 3.3.43., παρουσιάζεται η μεταβολή της αιθανόλης και της εξανόλης κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αέρα και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Σύμφωνα με τα προφίλ των αλκοολών, φαίνεται πως διαφορετικές ποσότητες και διαφορετικές τάσεις παρατηρούνται μεταξύ των ίδιων ενώσεων σε διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας. Η παραγωγή αλκοολών μπορεί να αποδοθεί σε μεταβολισμό της γλυκόζης και των αμινοξέων παρουσία μικροοργανισμών ή και εξαιτίας της οξείδωσης λιπαρών οξέων. Αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως οι *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella* έχουν βρεθεί ότι παράγουν αιθανόλη, μεθανόλη, 2-μεθυλοπροπανόλη (πρόδρομος βαλίνης) και 2-μεθυλοβουτανόλη (πρόδρομος ισολευκίνης) (Nychas et al., 2007). Το βακτήριο *B. thermosphacta* παράγει διαφορετικούς τύπους αλκοολών ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης, λόγω της αλλαγής του μεταβολισμού του. Στις αναερόβιες συνθήκες παράγει κυρίως αιθανόλη, ενώ κάτω από αερόβιες συνθήκες παράγει αιθανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη (πρόδρομος λευκίνης), 2-μεθυλοβουτανόλη (πρόδρομος ισολευκίνης), βουτανο-2,3-διόλη (πρόδρομος διακετυλίου) και 2-μεθυλοπροπανόλη (πρόδρομος βαλίνης) (Nychas et al., 2007, Samelis, 2006). Ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια έχουν αναφερθεί για την παραγωγή αιθανόλης, η οποία πιθανότατα προέρχεται από τον καταβολισμό της γλυκόζης ή/και της μικροβιακής μετατροπής της θρεονίνης (Leroy et al., 2009, Nychas et al., 2007, Tsigarida & Nychas 2001). Πιθανά προϊόντα βακτηριακών μετατροπών είναι η 3-μεθυλοβουτανόλη και η 2-μεθυλοπροπανόλη που προέρχονται από τα αμινοξέα λευκίνη και βαλίνη, αντιστοίχως, μετά την αποδόμηση

Strecker των αμινοξέων κατά τη διάρκεια της πρωτεόλυσης (Ercolini et al., 2009, Luna et al., 2006, Smit et al., 2005). Ορισμένες από τις παρατηρηθείς αλκοόλες έχουν επίσης αναφερθεί ως πιθανά προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων. Αυτές είναι προπαν-1-όλη, βουταν-1-όλη, εξανόλη, επταν-1-όλη, οκταν-1-όλη, οκτ-1-εν-3-όλη και 2-αιθυλοεξαν-1-όλη (Calkins & Hodgen, 2007, Leroy et al., 2009, O'Sullivan et al., 2005). Ειδικότερα:

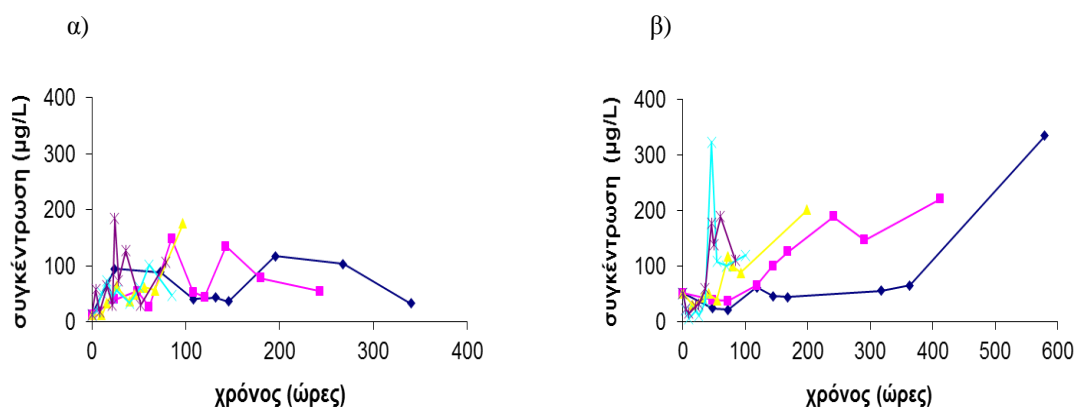
- 1) Η προπανόλη και η 2-φαινυλαιθανόλη ακολουθούν αντίστοιχη πορεία και στις δύο συσκευασίες. Στην αρχή της συντήρησης δεν ανευρίσκονται στα δείγματα, ενώ αρχίζουν να εμφανίζονται κατά τη μέση ή προς το τέλος της συντήρησης του χοιρινού κιμά. Ανάλογα με τη θερμοκρασία, οι δύο αυτές ουσίες εμφανίζονται πιο νωρίς στις υψηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης και στις δύο συσκευασίες, ενώ μπορεί να απουσιάζουν ή να βρίσκονται σε ίχνη στις θερμοκρασίες ψύξης.
- 2) Η 3-μεθυλοβουταν-1-όλη και 2-μεθυλοβουταν-1-όλη έχουν παρόμοιο προφίλ και παρουσιάζουν μικρή αύξηση και στις δύο συσκευασίες.
- 3) Η αιθανόλη κατά τη συντήρηση του κιμά σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα αυξάνεται σε όλες τις θερμοκρασίες, εκτός από τις θερμοκρασίες 15 και 20°C που παρουσιάζει ελαφρά μείωση κατά το τέλος της συντήρησης. Απεναντίας, στη συντήρηση σε αερόβια συνθήκες, η αιθανόλη παρουσιάζει μεικτό προφίλ. Στην αρχή της συντήρησης αυξάνεται σε όλες τις θερμοκρασίες, ενώ κατά τη διάρκεια της συντήρησης μειώνεται η συγκέντρωσή της στις θερμοκρασίες ψύξης (0 και 5°C) και σε θερμοκρασία 15°C ενώ σε θερμοκρασία 10 και 20°C αυξάνεται (Εικόνα 3.3.42).
- 4) Η αλκοόλη οκτ-1-εν-3-όλη (αμυλοβενυλοκαρβινόλη) παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από τις αντίστοιχες σε αερόβια συντήρηση. Σε φρέσκο κιμά ανευρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση και στις δύο συσκευασίες. Κατά τη συντήρηση του κιμά, στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας η συγκέντρωση της αλκοόλης αυξάνει, ιδιαίτερα στις θερμοκρασίες ψύξης. Κατά την αερόβια αλλοίωση του κιμά, η συγκέντρωση της αλκοόλης ακολουθεί πτωτική πορεία σε όλες τις περιπτώσεις.
- 5) Οι αλκοόλες πεντ-1-εν-3-όλη και 2,6, διμεθυλο-οκτ-7-έν-2-ολη εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ. Πιο συγκεκριμένα, ανευρίσκονται σε χαμηλό ποσοστό σε όλη τη διάρκεια ζωής τού χοιρινού κιμά στις περισσότερες περιπτώσεις. Επίσης, η πεντ-1-εν-

3-όλη σταματάει να ανιχνεύεται προς το τέλος της αλλοίωσης του χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες.

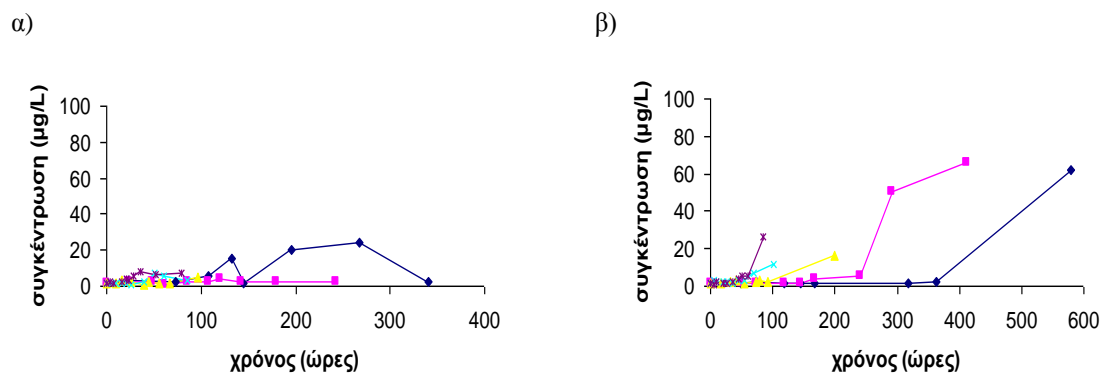
6) Οι αλκοόλες πενταν-1-όλη (αμυλική αλκοόλη), εξανόλη, εξαν-2-όλη αυξάνονται κατά τη συντήρηση του χοιρινού κιμά σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Κατά την αερόβια συντήρηση, οι αλκοόλες παρουσιάζουν μεικτό προφίλ. Η πενταν-1-όλη μειώνεται, η εξαν-2-όλη μειώνεται στις θερμοκρασίες ψύξης και αυξάνεται ελαφρά στις υψηλότερες θερμοκρασίες και τέλος η εξανόλη παρουσιάζει ελαφρά αύξηση σε όλες τις περιπτώσεις.

7) Η αλκοόλη 2-αιθυλοεξαν-1-όλη (2-αιθυλεξυλική αλκοόλη) κατά την αερόβια συντήρηση αυξάνεται μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής τού κιμά. Αντιθέτως, κατά τη συντήρηση με τροποποιημένη ατμόσφαιρα ανευρίσκεται μόνο στο φρέσκο κιμά και στη συνέχεια δεν ανιχνεύεται (θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 20°C) ή ανιχνεύεται σε ίχνη (15°C).

8) 1-βουτοξυπροπαν-2-όλη στην αερόβια συντήρηση ανευρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης του χοιρινού κιμά. Στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, στο φρέσκο κιμά ανιχνεύεται σε υψηλότερη συγκέντρωση, ενώ κατά την πορεία της συντήρησης η ποσότητα της αλκοόλης μειώνεται.



Εικόνα 3.3.42: Μεταβολή της αιθανόλης σε αέρα (α) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)



Εικόνα 3.3.43: Μεταβολή της εξανόλης σε αέρα α) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα β) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)

Καρβονυλικές ενώσεις

Η ομάδα των καρβονυλικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν περιείχε 10 αλδεΐδες και 9 κετόνες. Στις Εικόνες 3.3.44, 3.3.45, 3.3.46, παρουσιάζεται ενδεικτικά η μεταβολή της αλδεΐδης πεντανάλης και των κετονών βουτανο-2,3-διόνη και επταν-2-όνης κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αέρα και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

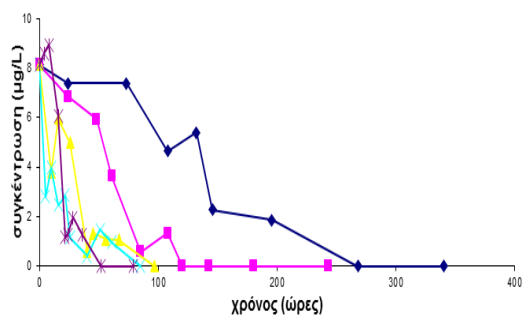
Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες, όπως και οι αλκοόλες, μπορούν να παραχθούν με μεταβολισμό της γλυκόζης, των αμινοξέων και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Οι γραμμικές κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες με περισσότερα από πέντε άτομα άνθρακα οφείλονται στην οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων, ενώ οι αλδεΐδες με μεθύλιο και οι φαινυλοαλδεΐδες σχετίζονται περισσότερο με την αποικοδόμηση των αμινοξέων (Xie et al., 2008). Αλδεΐδες, όπως η εξανάλη, εννεανάλη, και δεκανάλη μπορεί να προέρχονται από υδρόλυση των τριγλυκεριδίων ή από αποικοδόμηση αμινοξέων (Ercolini et al., 2009). Η εξανάλη είναι πιθανό να προκύψει από οξείδωση ακόρεστων ω-6 λιπαρών οξέων, υδρόλυση τριγλυκεριδίων ή/και αποικοδόμηση αμινοξέων (Brewer & Vega, 1995, Montel et al., 1998). Η εννεανάλη αναφέρθηκε ως προϊόν αποσύνθεσης του 10-υδροϋπεροξειδίου που παράγεται από την οξείδωση του ελαϊκού οξέος, το οποίο είναι το κύριο λιπαρό οξύ στο λίπος του βόειου κρέατος (Insausti et al., 2002). Η 3-μεθυλοβουτανάλη έχει αναφερθεί να παράγεται σε αερόβιες συνθήκες από το βακτήριο *B. thermosphacta* (Samelis, 2006), ενώ η 2-μεθυλοβουτανάλη (πρόδρομος ισολευκίνης) μπορεί να παραχθεί από διάφορα

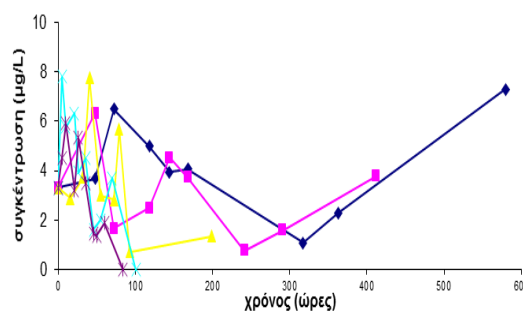
αρνητικά κατά Gram βακτήρια (π.χ., *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*) (Nychas et al., 2007). Παρακάτω, αναλύονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις ορισμένων αλδευδών.

- 1) Οι αλδεύδες 3-μέθυλοβουτανάλη και 2-μέθυλοβουτανάλη δεν ανευρίσκονται στο φρέσκο κρέας, ενώ εμφανίζονται σε χαμηλή συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης του χοιρινού κιμά. Η 2-μέθυλοβουτανάλη σε θερμοκρασία 0°C στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα δεν ανιχνεύθηκε.
- 2) Οι αλδεύδες εξανάλη πεντανάλη, επτανάλη και επταν-2-άλη εμφανίζουν μεικτό προφίλ για τις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Στις θερμοκρασίες 0 και 4°C αυξάνεται η συγκέντρωσή τους, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις μειώνεται. Στην αερόβια συντήρηση η συγκέντρωσή τους μειώνεται.
- 3) Η φαινυλακεταλδεύδη στο φρέσκο κρέας βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση ή δεν ανιχνεύεται. Με την πάροδο της συντήρησης του χοιρινού κιμά, η συγκέντρωσή της αυξάνεται και ιδιαίτερα στα δείγματα που έχουν συντηρηθεί σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες.
- 4) Η οκτανάλη και η τρανς οκτ-2-ενάλη ανιχνεύονται στο φρέσκο κρέας σε χαμηλή συγκέντρωση. Κατά την πορεία της αλλοίωσης, η συγκέντρωσή τους παρουσιάζει αρχικά μικρή αύξηση και στη συνέχεια μείωση. Στην αερόβια αλλοίωση η τρανς οκτ-2-ενάλη δεν ανιχνεύεται στο τέλος της αλλοίωσης σε θερμοκρασίες 10 και 20°C όπως και σε θερμοκρασία 15°C στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα.
- 5) Η εννεανάλη παρουσιάζει μικρές μεταβολές στη συγκέντρωσή της σε όλες τις περιπτώσεις.

α)



β)



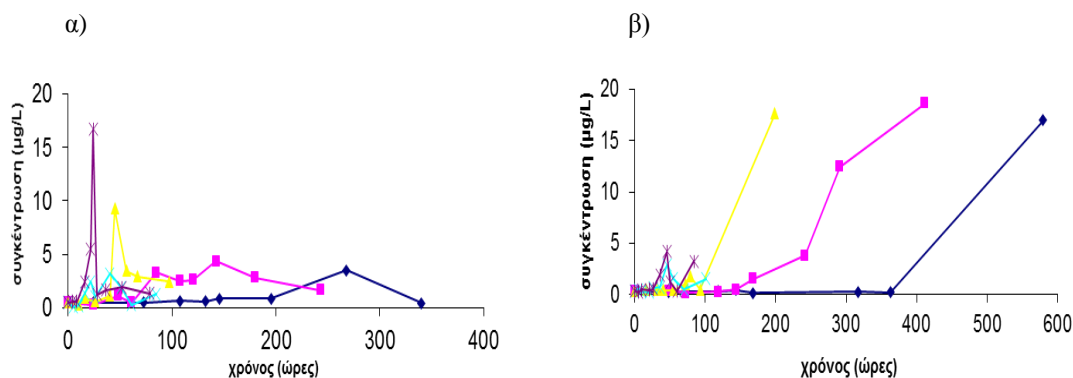
Εικόνα 3.3.44.: Μεταβολή της πεντανάλης σε αέρα (α) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)

Κετόνες

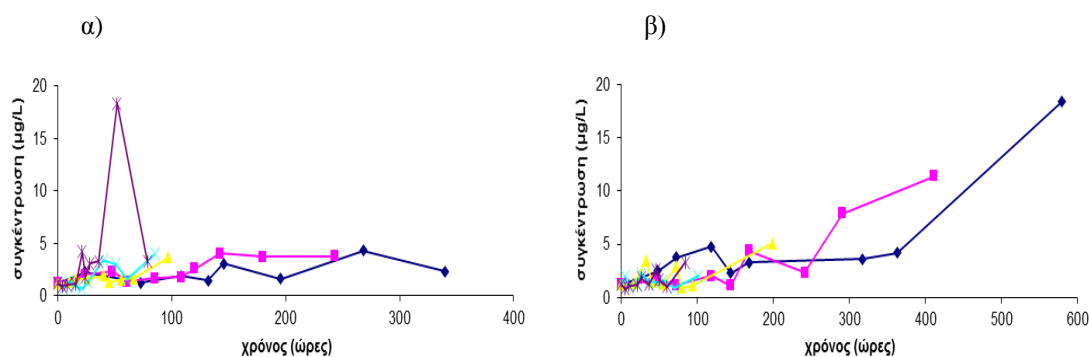
Οι κετόνες που ανιχνεύθηκαν παρουσίασαν μεικτό προφίλ σε κάθε περίπτωση συσκευασίας και θερμοκρασίας συντήρησης. Από προηγούμενες μελέτες, είναι γνωστό ότι το βακτήριο *B. thermosphacta* παράγει ακετοΐνη (πρόδρομος αλανίνης, γλυκόζης, διακετυλίου) σε αερόβιες συνθήκες. Επίσης, κάποια αρνητικά κατά Gram βακτήρια (π.χ., *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*) καθώς και ομοζυμοτικά γαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Carnobacterium*) έχουν βρεθεί ότι παράγουν ακετοΐνη και διακετύλιο (Nychas et al., 2007). Οι κετόνες που ανιχνεύθηκαν στο χοιρινό κιμά (επταν-2-όνη, οκτανε-2,5-διόνη, εννεανόνη, βουταν-2-όνη) είναι πιθανό να προέρχονται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων, αυτοοξείδωση, ενζυματική α - και β -οξείδωση (Ercolini et al., 2009, Leroy et al., 2009, Yu et al., 2008). Τέλος, η βουταν-2-όνη έχει αναφερθεί πως παράγεται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια (π.χ., *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*) (Nychas et al., 2007).

- 1) Οι κετόνες ακετόνη, διακετύλιο (βουτανο-2,3-διόνη), ακετοΐνη (3-υδροξυβουταν-2-όνη), επταν-2-όνη, οκτανε-2,5-διόνη παρουσιάζουν αύξηση στη συγκέντρωσή τους κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε όλες τις θερμοκρασίες. Στην αερόβια συντήρηση παρατηρείται μεικτό προφίλ για την κάθε ουσία με μικρές μεταβολές είτε αύξησης είτε μείωσης στη συγκέντρωσή τους.
- 2) Η εννεαν-2-όνη ανιχνεύεται στο φρέσκο κρέας. Κατά την αερόβια αλλοίωση η συγκέντρωσή της αυξάνει, ενώ κατά την αλλοίωση σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η κετόνη αυτή δεν ανιχνεύεται.
- 3) Η βουταν-2-όνη σε όλη τη διάρκεια της αλλοίωσης του χοιρινού κιμά ανιχνεύεται και παρατηρείται στις περισσότερες περιπτώσεις μικρή αύξηση.
- 4) Η κετονή 1,1, δικυκλοπεντενόνη, δεν βρέθηκε στο φρέσκο χοιρινό κιμά. Κατά την αερόβια αλλοίωση δεν εντοπίστηκε, ενώ κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας άρχισε να ανιχνεύεται από τις πρώτες ώρες της συντήρησης σε όλες τις θερμοκρασίες.
- 5) Η κετόνη οκτ-1-εν-3-όνη υπάρχει στο φρέσκο κρέας. Κατά τη συντήρηση και στις δύο συσκευασίες ακολουθεί πτωτική τάση. Στην αερόβια αλλοίωση η κετόνη δεν ανιχνεύεται από τη μέση της συντήρησης σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ στη

συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας το αντίστοιχο παρατηρείται μόνο για θερμοκρασία 20°C.



Εικόνα 3.3.45: Μεταβολή της βουτανο-2,3-διόνης αέρα σε α) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα β) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)



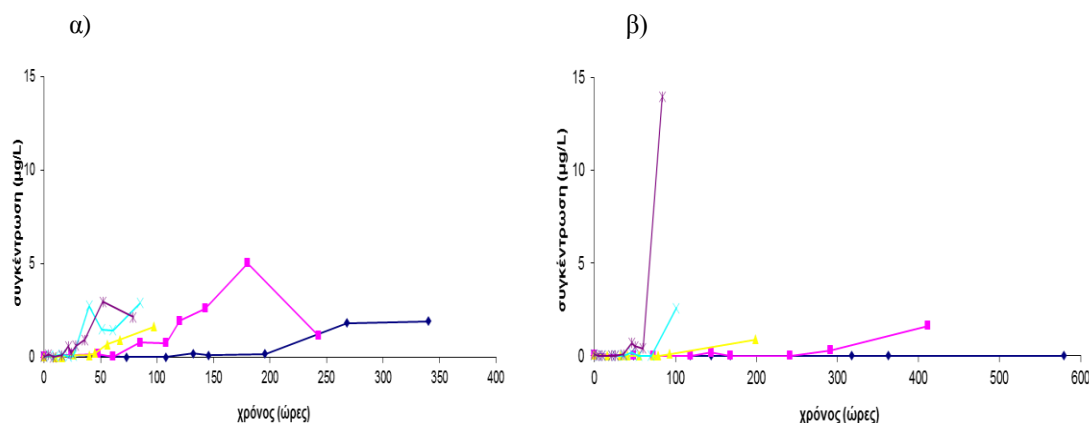
Εικόνα 3.3.46: Μεταβολή της επταν-2-όνης σε αέρα α) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα β) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)

Εστέρες

Η ομάδα των εστέρων που ανιχνεύθηκε περιείχε 15 ενώσεις. Κατά τους Insausti et al. (2002), οι εστέρες παράγονται έπειτα από εστεροποίηση διαφόρων αλκοολών και καρβοξυλικών οξέων τα οποία υπάρχουν στο βόειο κρέας. Οι Ercolini et al. (2009), αναφέρουν πως εξαιτίας της δραστηριότητας της μικροβιακής εστεράσης σχηματίζονται αιθυλεστέρες μέσω της εστεροποίησης των αλκοολών και των καρβοξυλικών οξέων. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί των γενών *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella* είναι ικανοί να παράγουν μεθυλ- και αιθυλ- εστέρες (Nychas et al., 2007). Οι εστέρες που ανιχνεύθηκαν στο χοιρινό κιμά παρουσιάζονται παρακάτω. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των εστέρων εξαρτώνται από τη θερμοκρασία συντήρησης και το είδος της συσκευασίας.

Στην Εικόνα 3.3.47 παρουσιάζεται η μεταβολή του ισοαμλικού αιθυλεστέρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αέρα και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

- 1) Οκτώ εστέρες παρουσίασαν κοντινό προφίλ στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Αρχικά καμία από τις ουσίες αυτές δεν ανιχνεύθηκε στο φρέσκο κιμά. Ο (E)-2-μεθυλοβουτενοϊκός αιθυλεστέρας δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στα δείγματα σε MAP, ενώ ο οξικός προπυλεστέρας, 2-μέθυλοβουτυλαιθυλεστέρας, αιθυλ-4-μέθυλοπεντανοϊκός εστέρας ανιχνεύθηκαν μόνο προς το τέλος της συντήρησης σε θερμοκρασία 20°C. Από τους υπόλοιπους 4 εστέρες, οι τρεις (προπιονικός αιθυλεστέρας, ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας και αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας) δεν ανιχνεύονται σε θερμοκρασία 0°C, ενώ ο αιθυλ-3-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας αρχίζει να εμφανίζεται μετά τις πρώτες ώρες της συντήρησης του χοιρινού κιμά. Στην αερόβια συντήρηση, ο αιθυλ-4-μεθυλοπεντανοϊκός εστέρας ανιχνεύεται μόνο προς το τέλος της συντήρησης σε θερμοκρασία 20°C. Ο (E)-2-μεθυλοβουτενοϊκός αιθυλεστέρας εμφανίζεται σε όλες τις θερμοκρασίες στα πολύ αλλοιωμένα δείγματα κιμά και οι υπόλοιποι 6 εστέρες ακολουθούν παρόμοια πορεία με αυτήν που ακολουθούν στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.
- 2) Ο ισοαμλικός αιθυλεστέρας ανευρίσκεται και στις δύο συσκευασίες στα φρέσκα δείγματα. Στην αερόβια αλλοίωση αυξάνεται η συγκέντρωσή του με την πάροδο της συντήρησης, ενώ στην αλλοίωση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας δεν ανιχνεύεται σε θερμοκρασία 0°C.
- 3) Οι βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, εξανοϊκός αιθυλεστέρας και οκτανοϊκός αιθυλεστέρας παρουσίασαν παρόμοια τάση σε όλες τις περιπτώσεις με αύξηση της συγκέντρωσής τους μέχρι το τέλος της συντήρησης του χοιρινού κιμά.
- 4) Οι βουτυλικός αιθυλεστέρας και οξικός αιθυλεστέρας παρουσιάζουν αυξομειώσεις στη συγκέντρωσή τους κατά τη διάρκεια ζωής του χοιρινού κιμά σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.
- 5) Ο οξικός εξυλεστέρας (Hexyl acetate) παρουσίασε αυξομειώσεις στη συγκέντρωση του καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κιμά. Σε θερμοκρασία 20°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και σε θερμοκρασίες 0, 10, 20°C σε αερόβιες συνθήκες δεν ανιχνεύεται στο τέλος της αλλοίωσης του δείγματος.

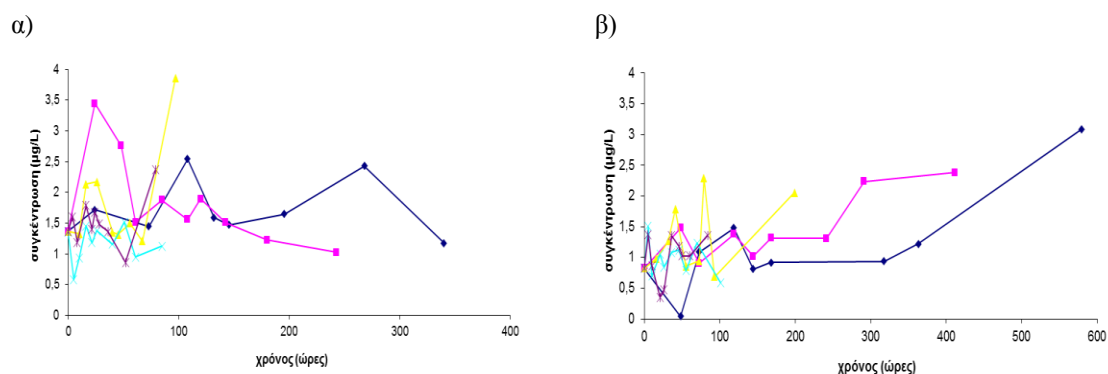


Εικόνα 3.3.47: Μεταβολή του ισοαμλικού αιθυλεστερά σε αέρα α) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα β) κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)

Υδρογονάνθρακες

Η ομάδα των υδρογονανθράκων που ανιχνεύθηκε περιείχε 53 ενώσεις. Σε γενικές γραμμές, κάποιο υδρογονάνθρακες ήταν παρόντες μόνο στα δείγματα που διατηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ενώ στα δείγματα της αερόβιας αλλοίωσης ήταν σε ίχνη ή δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου. Στην Εικόνα 3.3.48 παρουσιάζεται σε γράφημα η μεταβολή του βενζολίου κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αέρα και συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

- 1) Το 1-ενδεκένιο ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα της αερόβιας αλλοίωσης σε όλες τις περιπτώσεις.
- 2) 29 ενώσεις κορεσμένων κανονικών αλκανίων με 7, 8, 9, 10 ή 11 άτομα άνθρακα δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα του αέρα, ενώ στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας είχαν μεικτή τάση δηλαδή η συγκέντρωσή τους παρουσίαζε αυξητική τάση μέχρι κάποιο σημείο και στη συνέχεια μειωνόταν ή το αντίθετο.
- 3) Επτ-1-ένιο, οκτ-2-ένιο, ενδεκάνιο, δωδεκάνιο, βενζόλιο, αιθυλοβενζόλιο, τολουόλιο, ξυλ-1-ένιο, ξυλ-2-ένιο, στυρένιο, ναφθαλίνιο, ισομερή του βενζολίου, κορεσμένα κανονικά αλκάνια με 7, 8, 9, 10, 11, 12 άτομα άνθρακα και ισομερή τους βρίσκονται σε όλες τις περιπτώσεις του χοιρινού κιμά.



Εικόνα 3.3.48.: Μεταβολή του βενζολίου σε α) αέρα και β) τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0°C (♦), 5°C (■), 10°C (▲), 15°C (x) και 20°C (*)

Τερπένια

Όλα τα τερπένια που ανιχνεύθηκαν έδωσαν μεικτό προφίλ για τα δείγματα του κιμά. Εντοπίστηκαν 7 ενώσεις, οι α-πινένιο, μυρκένιο, καρένιο-3, π-κυμένιο, λεμονένιο, γ-τερπινένιο και ισομερές του π-κυμενίου. Πιο συγκεκριμένα, το μυρκένιο παρατηρήθηκε σε ίχνη ή μικρές ποσότητες σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης, ενώ το π-κυμένιο βρέθηκε να έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις.

Διάφορες ενώσεις

16 ενώσεις δεν ομαδοποιήθηκαν ή δεν κατέστη δυνατόν να ταυτοποιηθούν λόγω χαμηλής αξιοπιστίας των ουσιών αυτών με τη μέθοδο ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκε. Οι ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως το δισουλφίδιο, μπορεί να προέρχονται από θειούχα αμινοξέα (κυστεΐνη, μεθειονίνη) (Insausti et al., 2002).

- 1) Η φαινόλη δεν ανιχνεύεται στα δείγματα που συντηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ενώ στις αερόβιες συνθήκες παρουσιάζει μεικτό προφίλ.
- 2) Οι ενώσεις διμέθυλο δισουλφίδιο, διμέθυλο τρισουλφίδιο, μεθανεθειόλη και θειομεθυλο-εστέρας (methyl thiolacetate) ανιχνεύονται σε ίχνη ή δεν ανιχνεύονται καθόλου σε όλες τις περιπτώσεις.
- 3) Οι υπόλοιπες ουσίες εμφανίζουν μεικτό προφίλ (3 άγνωστες, 2-αιθυλοφουράνιο, 2-πεντυλοφουράνιο, διμεθυλοσουλφίδιο, μεθυλενοχλωριδίο κ.λπ.).

3.3.5.2. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες

Τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από την GC/MS υποβλήθηκαν σε ανάλυση με DFA για καθεμία από τις πέντε θερμοκρασίες συντήρησης, ώστε να γίνει κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο) όπως αυτές ορίστηκαν από τη διαδικασία της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Τα ίδια δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν σε μία προσπάθεια για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Γραμμικής Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (βλέπε Κεφ. 2). Για να υπολογιστούν οι λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation) κατά την ανάπτυξη του μοντέλου.

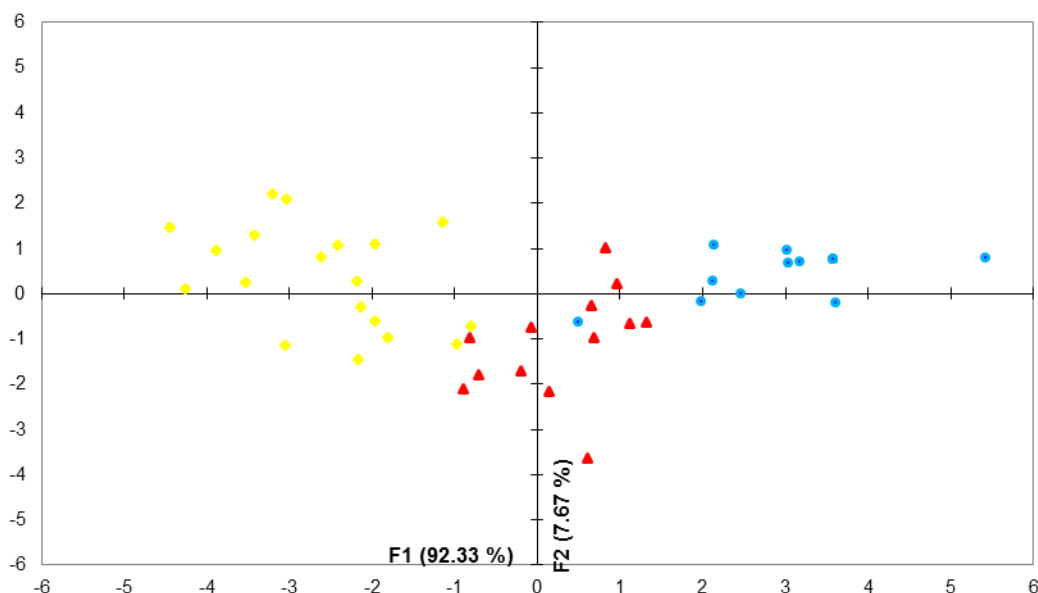
3.3.5.2.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

Για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου επιλέχθηκαν οι ουσίες που έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές (βλ. Πίνακα 3.3.24.), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.49, όπου φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας. Κατά την εκπαίδευση του μοντέλου, η διακριτική ανάλυση παραγόντων έδωσε 100% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως σχετικά φρέσκα, ενώ για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως φρέσκα ή αλλοιωμένα οι προβλέψεις ήταν 93,33% και 89,47% αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε 1 εσφαλμένη ταξινόμηση από τα 15 συνολικά φρέσκα δείγματα κιμά, ενώ για τα δείγματα που έχουν χαρακτηριστεί ως αλλοιωμένα έγιναν 2 λανθασμένες ταξινομήσεις επί συνόλου 19 δειγμάτων. Ωστόσο, κατά την επικύρωση του μοντέλου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν χαμηλότερα. Ειδικότερα, η ευαισθησία για τις τρεις ποιοτικές κατηγορίες (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο) ήταν 93,33, 92,31, και 84,21%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.3.25). Το ποσοστό των λανθασμένων παρατηρήσεων στην «ασφαλή» πλευρά, δηλαδή δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία φρέσκα και ταξινομούνται ως σχετικά φρέσκα καθώς επίσης και δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία σχετικά φρέσκα και ταξινομούνται στην κατηγορία αλλοιωμένα, ήταν

2,12%, ποσοστό το οποίο αντιστοιχούσε σε 1 περίπτωση επί συνόλου 47 δειγμάτων. Επιπρόσθετα, οι λανθασμένες ταξινομήσεις στην «επικίνδυνη» πλευρά, δηλαδή δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία σχετικά φρέσκα και ταξινομούνται ως φρέσκα καθώς επίσης και δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία αλλοιωμένα και ταξινομούνται στις άλλες δύο κατηγορίες, ήταν 8,51%, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 4 περιπτώσεις από τα 47 δείγματα. Πρέπει να τονιστεί πως κανένα φρέσκο δείγμα δεν ταξινομήθηκε ως αλλοιωμένο ή το αντίθετο. Η ακρίβεια της πρόβλεψης για τα δεδομένα εκπαίδευσης και επικύρωσης ήταν 93,62 και 89,36% αντίστοιχα.

Πίνακας 3.3.25: Πίνακας διπλής εισόδου για την ταξινόμηση των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες, όπως προέκυψε έπειτα από ανάλυση με DFA με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Από/Σε	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα	Σύνολο	Ευαισθησία (%)
Δεδομένα εκπαίδευσης (n = 47)					
Φρέσκα	14	1	0	15	93,33
Σχετικά φρέσκα	0	13	0	13	100,0
Αλλοιωμένα	0	2	17	19	89,47
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					93,62
Δεδομένα επικύρωσης (n=47)					
Φρέσκα	14	1	0	15	93, 33
Σχετικά φρέσκα	1	12	0	13	92,31
Αλλοιωμένα	0	3	16	19	84,21
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					89,36



Εικόνα 3.3.49: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και θερμοκρασίες συντήρησης 0, 5, 10, 15 και 20°C (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά Φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα)

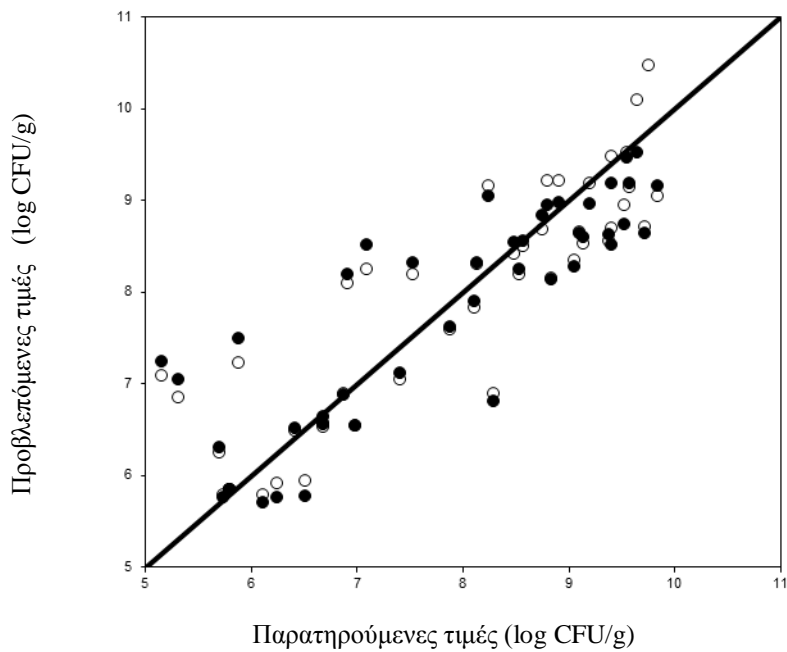
3.3.5.2.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα των διάφορων ομάδων των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στο χοιρινό κιμά. Εφαρμόστηκαν μαθηματικά μοντέλα με τη μέθοδο PLS-R χρησιμοποιώντας ως μεταβλητές εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) τη συγκέντρωση των επιλεγμένων ουσιών (βλέπε Πίνακα 3.3.26) και ως μεταβλητές εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές) το μικροβιακό φορτίο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* και των γαλακτικών βακτηρίων. Πρέπει να τονιστεί πως δεν εφαρμόστηκε μοντέλο παλινδρόμησης για τις περιπτώσεις των *Enterobacteriaceae* και των ζυμών, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 3.2. Συγχρόνως, διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις των πτητικών συστατικών με την αλλοίωση του χοιρινού κιμά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.52. Από την εικόνα φαίνεται πως οι ουσίες πεντ-1-εν-3-όλη, οκτ-1-εν-3-όλη, πενταν-1-όλη, πεντανάλη, εξανάλη, επτανάλη, επταν-2-άλη, τρανς οκτεν-2-άλη, εννεανάλη, οκτανε-2,5-διόνη και οκτ-1-εν-3-όνη σχετίζονται περισσότερο με το φρέσκο κρέας. Οι ουσίες οξικό οξύ, αιθανόλη, προπανόλη, εξανόλη, 3-

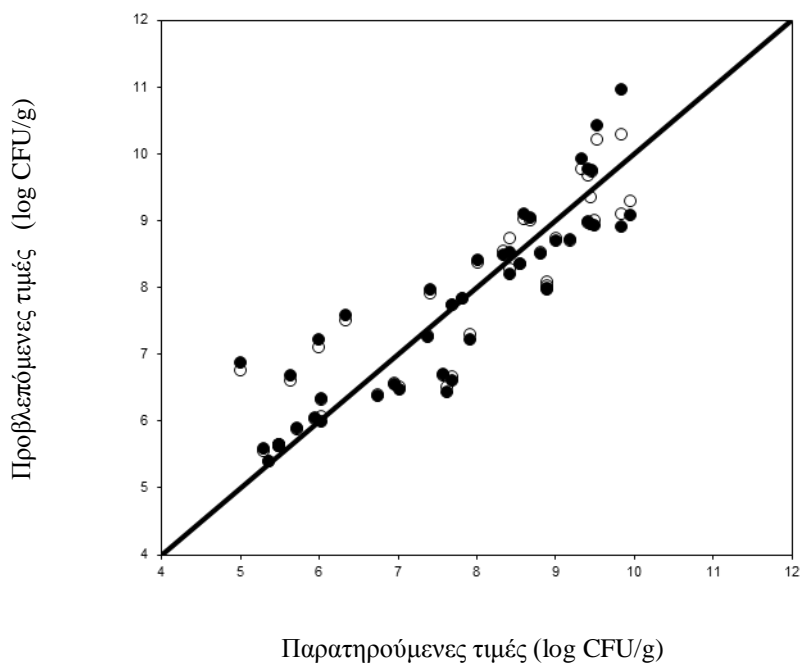
μεθυλοβουταν-1-όλη, 2-μεθυλοβουταν-1-όλη, 2-αιθυλοεξαν-1-όλη, φαινυλακεταλδεΐδη, 2-μέθυλοβουτανάλη, 3-μεθυλοβουτανάλη, ακετοΐνη, βουταν-2-όνη, επταν-2-όνη, εννεαν-2-όνη και κάποιοι εστέρες σχετίζονται με τον αλλοιωμένο χοιρινό κιμά, ενώ στο ενδιάμεσο της αλλοίωσης σχετίζονται περισσότερο οι ουσίες, εξαν-2-όλη, ακετόνη, διακετύλιο και οξικός εξυλεστέρας.

Οι δείκτες επίδοσης κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.26. Ο δείκτης προκατάληψης (B_f) για όλες τις μικροβιακές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στη μονάδα, αποδεικνύοντας ότι δεν υπήρξε κάποια απόκλιση από τα μοντέλα, λόγω χάρη, συστηματική υπό ή υπέρ εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν κοντά στο 7,0% για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και τις *Pseudomonas* spp. αντίστοιχα, ενώ για τα γαλακτικά βακτήρια και το βακτήριο *B. thermosphacta* οι αντίστοιχες τιμές ήταν 9,9% και 11,4%. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στις Εικόνες 3.3.50 και 3.3.51, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών σε log CFU/g για την OMX και τις *Pseudomonas* spp.

Όσον αφορά στο συντελεστή συσχέτισης (r) μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων στο μοντέλο, η τιμή του r βρέθηκε άνω του 0,80 σε όλες τις περιπτώσεις των μικροοργανισμών. Τιμές r μεταξύ 0,66-0,81 είναι αποδεκτές για έλεγχο και πρόβλεψη κατά προσέγγιση (Ait-Kaddour et al., 2011), ενώ τιμές r μεταξύ 0,83-0,90 είναι αποδεκτές για τις περισσότερες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης και της έρευνας. Η καλύτερη συσχέτιση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων βρέθηκε για τις *Pseudomonas* spp.



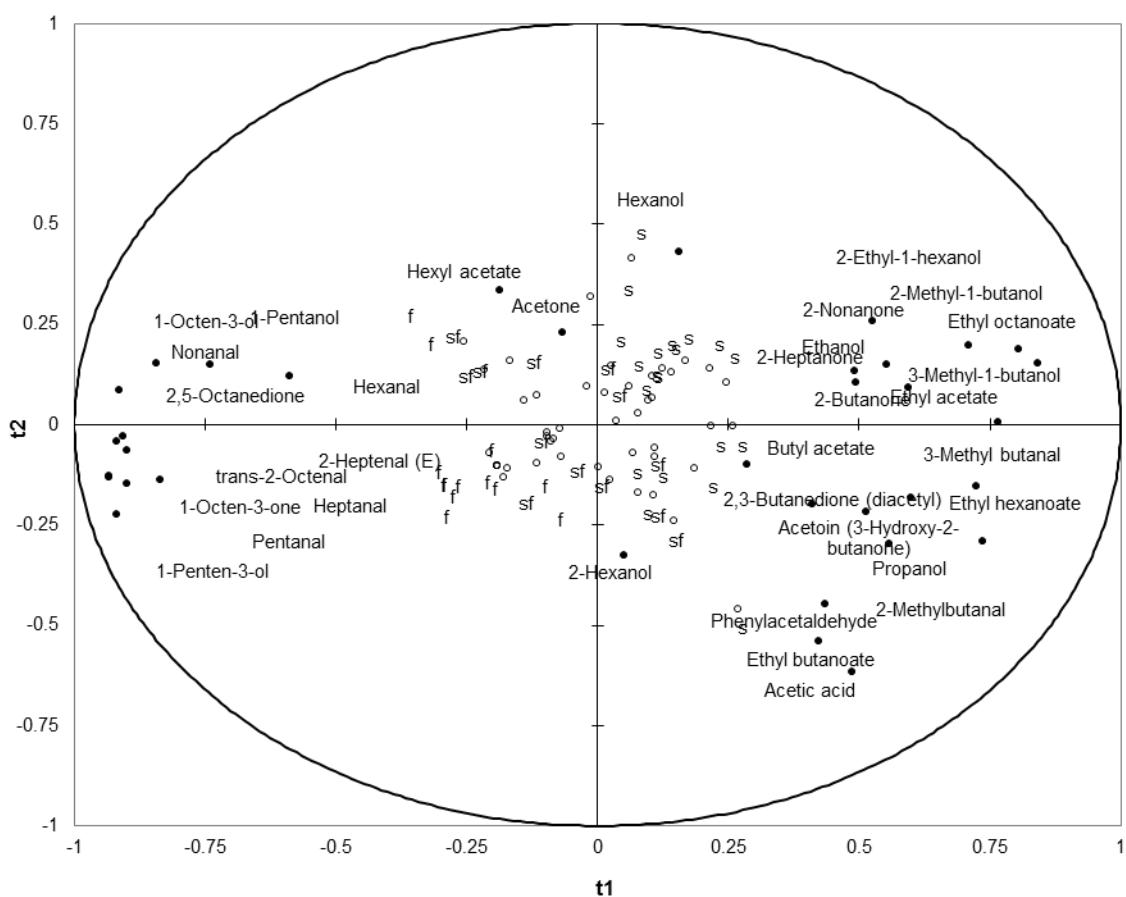
Εικόνα 3.3.50: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)



Εικόνα 3.3.51: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών *Pseudomonas* spp. κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)

Πίνακας 3.3.26.: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα με τα φασματικά δεδομένα σε δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες

Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	Γεκπαίδευσης	Γεπικύρωσης
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	1,004	1,071	0,690	0,743	0,885	0,866
<i>Pseudomonas</i> spp.	1,004	1,070	0,577	0,655	0,927	0,906
<i>B. thermosphacta</i>	1,006	1,099	0,699	0,723	0,877	0,867
Γαλακτικά βακτήρια	1,007	1,114	0,782	0,835	0,823	0,795



Εικόνα 3.3.52: Συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των σημαντικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης σε σχέση με τις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά την αλλοίωση χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες

3.3.5.3. Ανάλυση χοιρινού κιμά σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες

Τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από την GC/MS υποβλήθηκαν σε ανάλυση με DFA για καθεμία από τις πέντε θερμοκρασίες ώστε να γίνει κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο) όπως αυτές ορίστηκαν από τη διαδικασία της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Τα ίδια δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν σε μία προσπάθεια για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PLS-R. Για να υπολογιστούν οι λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables) και να αποφευχθεί η αλληλοεπικάλυψη δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation) κατά την ανάπτυξη του μοντέλου.

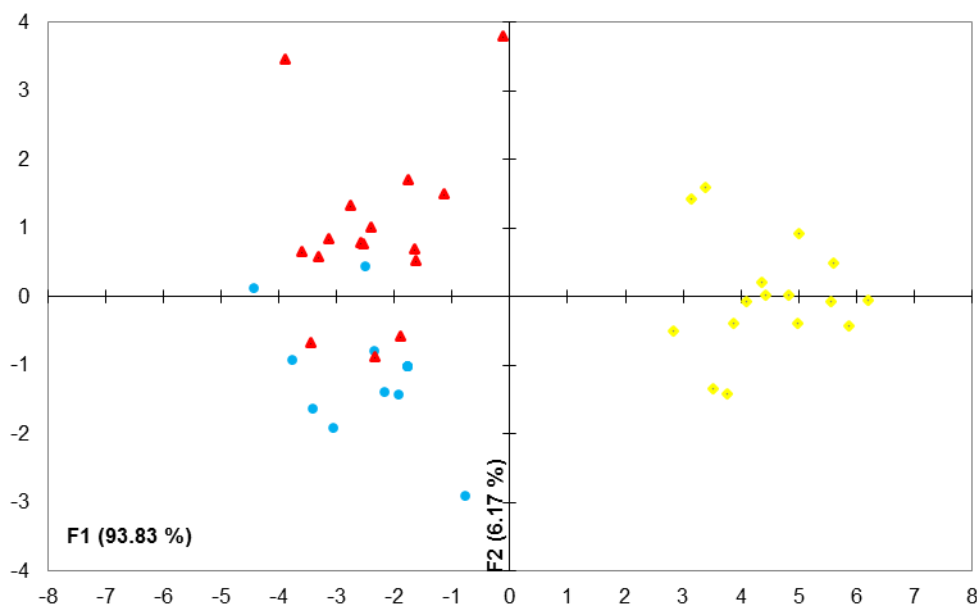
3.3.5.3.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

Για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου επιλέχθηκαν οι ουσίες που έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές (βλ. Πίνακα 3.3.24), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.53, όπου φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων κρέατος στις τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας. Κατά την εκπαίδευση του μοντέλου, η διακριτική ανάλυση παραγόντων έδωσε 100% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί αλλοιωμένα, ενώ για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως φρέσκα ή σχετικά φρέσκα οι προβλέψεις ήταν 85,71% και 81,25% αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε 2 εσφαλμένες ταξινομήσεις επί συνόλου 14 φρέσκων δειγμάτων κιμά, ενώ για τα δείγματα που έχουν χαρακτηριστεί ως σχετικά φρέσκα έγιναν 3 λανθασμένες ταξινομήσεις από τα 16 συνολικά δείγματα. Ωστόσο, κατά την επικύρωση του μοντέλου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν χαμηλότερα. Ειδικότερα, η ευαισθησία για τις τρεις ποιοτικές κατηγορίες (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο) ήταν 85,71, 62,50 και 81,25% αντίστοιχα (Πίνακας 3.3.27.). Το ποσοστό των λανθασμένων παρατηρήσεων στην «ασφαλή» πλευρά δηλαδή δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία φρέσκα και ταξινομούνται ως σχετικά φρέσκα και δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία

σχετικά φρέσκα και ταξινομούνται στην κατηγορία αλλοιωμένα ήταν 6,52%, ποσοστό το οποίο αντιστοιχούσε σε 3 περιπτώσεις επί συνόλου 46 δειγμάτων. Επιπρόσθετα, οι λανθασμένες ταξινομήσεις στην «επικίνδυνη» πλευρά δηλαδή δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία σχετικά φρέσκα και ταξινομούνται ως φρέσκα και δείγματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία αλλοιωμένα και ταξινομούνται στις άλλες δύο κατηγορίες ήταν 17,3%, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 8 περιπτώσεις επί συνόλου 46 δειγμάτων. Πρέπει να τονιστεί πως κανένα φρέσκο δείγμα δεν ταξινομήθηκε ως αλλοιωμένο, ενώ 1 αλλοιωμένο δείγμα ταξινομήθηκε στην κατηγορία φρέσκο. Η αλλοίωση σε τροποποιημένες συνθήκες είναι ηπιότερη σε σύγκριση με την αερόβια και είναι πιθανόν να μη γίνεται εύκολα αντιληπτή από την ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή λάθος κατηγοριοποίηση ενός δείγματος από την ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου, το οποίο οδηγεί σε ελλιπή εκπαίδευση του μοντέλου και κατά συνέπεια χαμηλότερα ποσοστά ορθών προβλέψεων κατά την επικύρωσή του.

Πίνακας 3.3.27: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, όπως προέκυψε έπειτα από ανάλυση με DFA με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης

Από/Σε	Φρέσκα	Σχετικά φρέσκα	Αλλοιωμένα	Σύνολο	Ευαισθησία (%)
Δεδομένα εκπαίδευσης (n = 46)					
Φρέσκα	12	2	0	14	85,71
Σχετικά φρέσκα	3	13	0	16	81,25
Αλλοιωμένα	0	0	16	16	100
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					89,13
Δεδομένα επικύρωσης (n=46)					
Φρέσκα	12	2	0	14	85,71
Σχετικά φρέσκα	5	10	1	16	62,50
Αλλοιωμένα	1	2	13	16	81,25
Ακρίβεια της πρόβλεψης:					76,09



Εικόνα 3.3.53.: Χάρτης διακριτικής ανάλυσης για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων χοιρινού κιμά σε προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας συνθήκες και θερμοκρασίες συντήρησης 0, 5, 10, 15 και 20°C (●- Φρέσκα, ▲- Σχετικά Φρέσκα, ◆- Αλλοιωμένα)

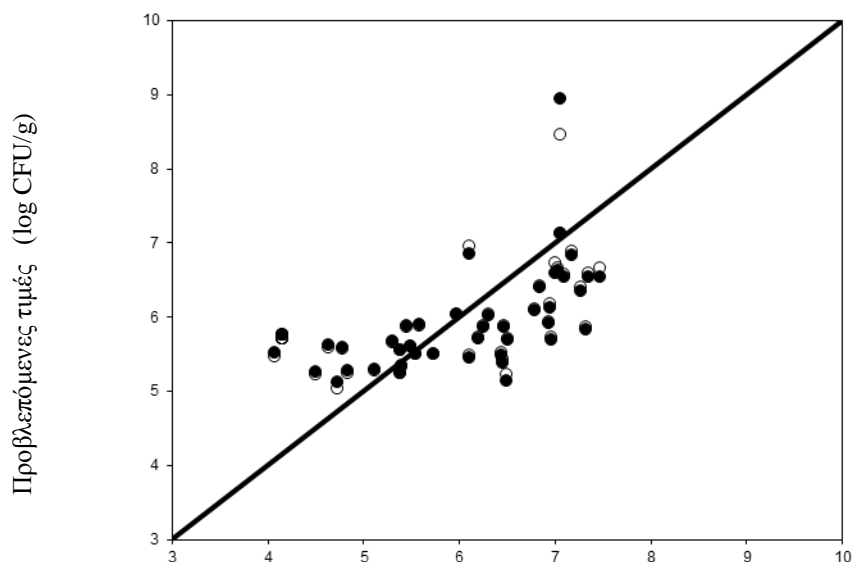
3.3.5.3.2. Συσχέτιση των μικροβιολογικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα των διάφορων ομάδων των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στο χοιρινό κιμά. Εφαρμόστηκαν μαθηματικά μοντέλα με τη μέθοδο PLS-R, όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Συγχρόνως, διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις των πτητικών συστατικών με την αλλοίωση του χοιρινού κιμά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.56. Από την εικόνα φαίνεται πως οι ουσίες πενταν-1-όλη, πεντανάλη, εξανάλη, επτανάλη, επταν-2-άλη, εννεανάλη, οκτ-1-εν-3-ονη σχετίζονται περισσότερο με το φρέσκο κρέας. Οι ουσίες οξικό οξύ, αιθανόλη, 3-μεθυλοβουταν-1-όλη, εξανόλη, εξαν-2-όλη, φαινυλακεταλδεΐδη, ακετόνη, βουταν-2-όνη, διακετύλιο, ακετοΐνη και κάποιοι εστέρες (οξικός, βουτανοϊκός, εξανοϊκός και αιθυλ 3-μεθυλο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας) σχετίζονται με τον αλλοιωμένο χοιρινό κιμά, ενώ στο

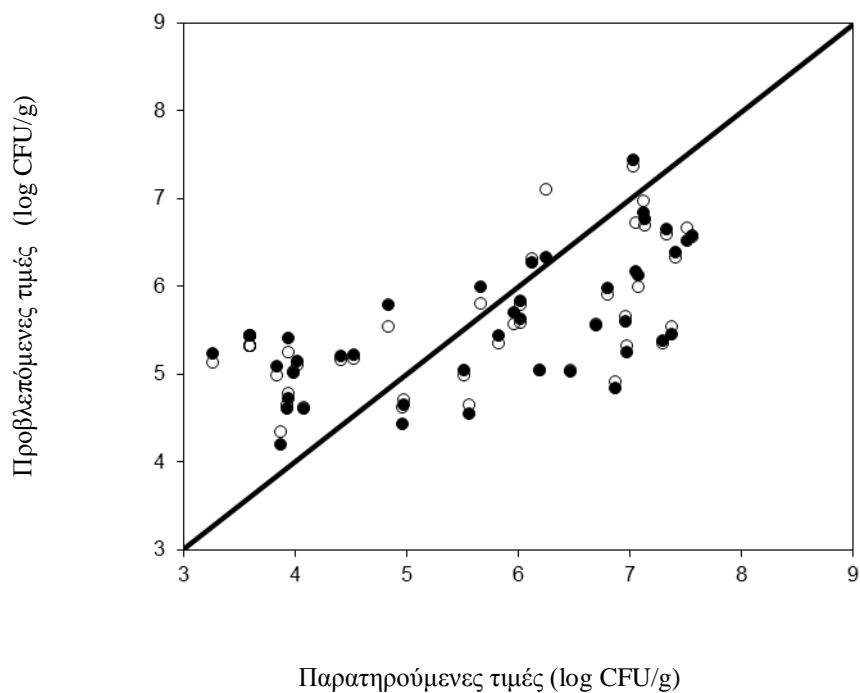
ενδιάμεσο της αλλοίωσης σχετίζονται περισσότερο οι ουσίες οκτ-1-εν-3-όλη, 1-βουτοξυ προπαν-2-όλη, επταν-2-όνη, οκταν-2,5-διόνη και οξικός εξυλεστέρας.

Οι δείκτες επίδοσης κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.28. Ο δείκτης προκατάληψης (B_f) για όλες τις μικροβιακές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στη μονάδα, αποδεικνύοντας πως δεν υπήρξε κάποια συστηματική υπό ή υπέρ εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν 10,0% και 9,3% για την OMX και τις *Pseudomonas* spp. αντίστοιχα, ενώ για το βακτήριο *B. thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια οι αντίστοιχες τιμές ήταν 13,6% και 20,9%. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στις Εικόνες 3.3.54, και 3.3.55,, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων σε log CFU /g για το βακτήριο *B. thermosphacta* και για τα γαλακτικά βακτήρια.

Όσον αφορά το συντελεστή συσχέτισης (r) μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων στο μοντέλο, η τιμή του κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0,50-0,63. Τέτοιες χαμηλές τιμές στον συντελεστή συσχέτισης r δείχνει πως η επιλεγμένη μέθοδος γραμμικής παλινδρόμησης με PLS δεν είναι η κατάλληλη. Μη γραμμικές μέθοδοι όπως SVM ή τεχνητά νευρωνικά δίκτυα είναι καταλληλότερα λόγω της μη γραμμικότητας των δεδομένων (Berrueta et al., 2007).



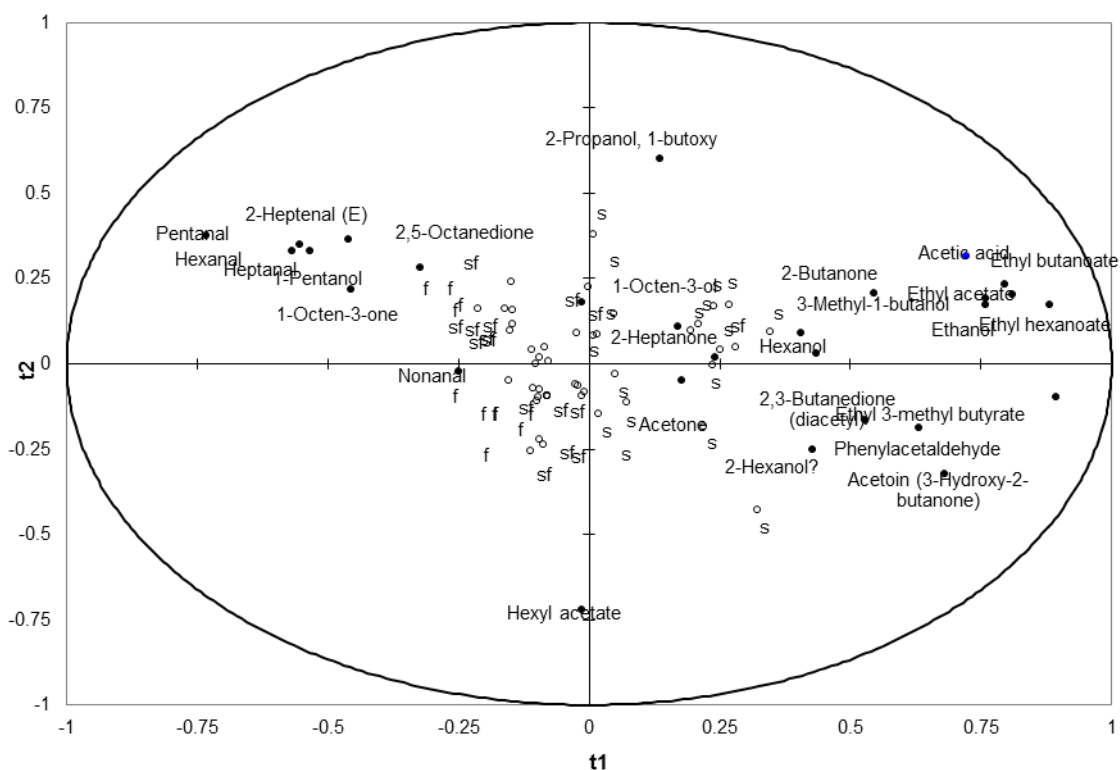
Εικόνα 3.3.54: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών του βακτηρίου *B. thermosphacta* κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)



Εικόνα 3.3.55: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων κατηγοριών των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: τα δεδομένα επικύρωσης)

Πίνακας 3.3.28.: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά δεδομένα με τα φασματικά σε δείγματα κιμά συντηρημένα σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες

Μικροοργανισμός	B_f	A_f	SEC	SEP	Γεκπαίδευσης	Γεπικύρωσης
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	1,006	1,100	0,786	0,814	0,613	0,576
<i>Pseudomonas</i> spp.	1,003	1,093	0,638	0,689	0,599	0,503
<i>B. thermosphacta</i>	1,012	1,136	0,844	0,893	0,598	0,537
Γαλακτικά βακτήρια	1,023	1,209	1,113	1,162	0,630	0,587



Εικόνα 3.3.56: Συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των σημαντικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης σε σχέση με τις τρεις προκαθορισμένες ποιοτικές κατηγορίες κατά την αλλοίωση χοιρινού κιμά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

3.3.5.4. Συζήτηση

Μελέτες που αφορούν στη μικροβιακή αλλοίωση νωπών κρεάτων ή πουλερικών έχουν διαπιστώσει ότι η ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών είναι συνέπεια της αύξησης των αρχικά χαμηλών πληθυσμών σε σημαντικά μεγαλύτερους, που μπορούν να παράγουν διακριτές οσμές αλλοίωσης (Stutz et al., 1991). Η ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της αλλοίωσης, σχετίζεται με την κατανάλωση των συστατικών του κρέατος όπως, υδατάνθρακες και αμινοξέα, από τους μικροοργανισμούς με ταυτόχρονη παραγωγή ανεπιθύμητων πτητικών προϊόντων (Ercolini et al., 2009). Από βιβλιογραφικές αναφορές, φαίνεται πως η ταυτοποίηση και μελέτη των πτητικών ουσιών του νωπού κρέατος έχει εγείρει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ως εκ τούτου, υπάρχουν ποικίλες μελέτες που αφορούν στα πτητικά συστατικά βόειου, χοιρινού κρέατος, όπως και κρέατος πουλερικών (Dainty et al., 1989b, Ercolini et al., 2009, Insausti et al., 2002, Jackson et al., 1992, Soncin et al., 2007, Stutz et al., 1991, Tsigarida and Nychas, 2001). Οι Dainty et al. (1989b) μελέτησαν την παραγωγή πτητικών ουσιών κατά την αλλοίωση στείρου κρέατος είτε με τη φυσική του μικροχλωρίδα είτε αφού είχε εμβολιαστεί με επιλεγμένους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε αερόβιες συνθήκες. Οι εν λόγω ερευνητές ανέφεραν πως ουσίες όπως αλειφατικοί υδρογονάνθρακες με 8-11 άτομα άνθρακα, αλδεΐδες και κετόνες με 6-9 άτομα άνθρακα, αλκοόλες με 4-8 άτομα άνθρακα ευθείας αλυσίδας και λίγοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ήταν παρούσες σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Οι ενώσεις ακετοΐνη, διακετύλιο, 3-μεθυλοβουτανάλη, 2-μεθυλοπροπανόλη και ισοαμυλική αλκοόλη βρέθηκαν στα περισσότερα δείγματα με διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις, ενώ οι ουσίες αυτές βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε κρέας που είχε εμβολιαστεί με το βακτήριο *B. thermosphacta*. Όσον αφορά κρέας που συντηρείται σε MAP ή σε κενό, οι Jackson et al. (1992) μελέτησαν τη μεταβολή των πτητικών ουσιών κατά την αλλοίωση βόειου κρέατος σε θερμοκρασίες ψύξης. Από το πλήθος των πτητικών ενώσεων που ταυτοποίησαν δεν κατάφεραν να συσχετίσουν κάποια συγκεκριμένη ουσία με την επικράτηση συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Πιο πρόσφατες έρευνες (Ercolini et al., 2009, Tsigarida & Nychas, 2001) διερεύνησαν εάν η σύνθεση των πτητικών συστατικών μπορούσε να αποδοθεί σε συγκεκριμένα είδη ή και στελέχη μικροοργανισμών. Οι Ercolini et al. (2009), κατέληξαν

στο συμπέρασμα ότι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί παράγουν συγκεκριμένες πτητικές ουσίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης.

Στην παρούσα εργασία, η ανάλυση δειγμάτων χοιρινού κιμά με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας έδωσε 124 κορυφές, οι οποίες βρέθηκαν να είναι εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία ή/και τη συσκευασία συντήρησης του χοιρινού κιμά. Ουσίες όπως 1-βουτόξυ-προπαν-2-όλη, 1,1-δικυκλοπεντανόνη, αιθυλ-3-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας ανιχνεύθηκαν κυρίως κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ενώ οι ουσίες 2-μεθυλοβουταν-1-όλη, 2-αιθυλοεξαν-1-όλη, 3-μεθυλοβουταν-1-άλη, 2-μεθυλοβουταν-1-άλη, εννεαν-2-όνη, βουτυλικός και οκτανοϊκός αιθυλεστέρας εντοπίστηκαν κυρίως στην περίπτωση της συντήρησης του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες. Με την πάροδο της συντήρησης του κρέατος οι ουσίες αύξησαν ή μείωσαν τη συγκέντρωσή τους διαφορετικά κατά περίπτωση συσκευασίας και θερμοκρασίας. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφέρει και άλλοι ερευνητές μελετώντας τη συντήρηση κρέατος ή προϊόντων κρέατος (Argyri et al., 2014, Leroy et al., 2009, Stutz et al., 1991).

Μετά την επιλογή των κορυφών ακολούθησε πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση και τα αποτελέσματα έδωσαν καλή κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις προκαθορισμένες ποιοτικές κλάσεις του χοιρινού κιμά. Παρόλα αυτά, υπήρξε αδυναμία πλήρους σωστής ομαδοποίησης μεταξύ των διαφορετικών ποιοτικών κατηγοριών. Η αδυναμία αυτή μπορεί να οφείλεται στην ποικιλότητα των δειγμάτων και στην αβεβαιότητα της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Εξαιτίας του ότι η επιστήμη του οργανοληπτικού ελέγχου χρησιμοποιεί τις ανθρώπινες αισθήσεις ως όργανα μέτρησης, η απόδοση του κάθε οργανολήπτη μπορεί να επηρεαστεί από συστηματικά ή τυχαία σφάλματα (π.χ., αβεβαιότητα), τα οποία αντίστοιχα θα επηρεάσουν την τελική απόφαση (Versari, et al., 2011). Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν εντός κάθε κλάσης ποιότητας δεν ήταν ίσος, λόγω του διαφορετικού ρυθμού αλλοίωσης του κιμά σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης, με αποτέλεσμα ένα μεταβλητό αριθμό δειγμάτων σε κάθε κλάση. Κάτι τέτοιο είναι δυνατόν να επηρέασε τη διαδικασία εκπαίδευσης και αυτό προκάλεσε το χαμηλότερο ποσοστό ορθής ταξινόμησης στις συγκεκριμένες ποιοτικές κατηγορίες. Στην περίπτωση της εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου, όπως αυτό απεικονίζεται στις Εικόνες 3.3.50, 3.3.51, 3.3.54.

3.355, ήταν περισσότερο συχνή η υπερεκτίμηση του πληθυσμού ιδιαίτερα για πληθυσμούς με λιγότερο από 7 log CFU/g και μερικές φορές μια υπο- εκτίμηση παρατηρήθηκε σε υψηλότερους πληθυσμούς. Οι Argyri et al. (2014), μελετώντας τη μεταβολή των πτητικών ουσιών κατά την αλλοίωση βόειου κιμά σε αέρα και MAP σε διάφορες θερμοκρασίες, χρησιμοποίησαν πολυμεταβλητές στατιστικές μεθόδους (DFA, AHC, PLS-R) για να συσχετίσουν την ποιοτική κατηγορία του κρέατος και να εκτιμήσουν το μικροβιακό φορτίο των επιλεγμένων μικροοργανισμών. Το κρέας παρουσίασε υψηλό βαθμό ταξινόμησης σε κλάσεις ποιότητας χρησιμοποιώντας ανάλυση με DFA, ενώ παρατηρήθηκε υπό- εκτίμηση του πληθυσμού των βακτηρίων στις περιπτώσεις με πληθυσμό κάτω από 7 log CFU/g για την OMX, ενώ για τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε υπέρ- εκτίμηση του πληθυσμού τους.

Οι ουσίες ακετοΐνη και το διακετύλιο βάση των συσχετίσεων που προέκυψαν έπειτα από ανάλυση PLS-R (Εικόνες 3.3.52 και 3.3.56) φαίνεται να έχουν διαφορετική συμπεριφορά στη συντήρηση στον αέρα σε σχέση με τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Κατά την αερόβια αλλοίωση, οι κετόνες αυτές σχετίζονται περισσότερο με τα ενδιάμεσα στάδια της αλλοίωσης του χοιρινού κιμά, όσο δηλαδή το δείγμα θεωρείται ακόμα αποδεκτό από την ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου, ενώ στη συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σχετίζονται περισσότερο με τα αλλοιωμένα δείγματα. Οι Insausti et al. (2002), αναφέρουν πως το διακετύλιο και η ακετοΐνη προκαλούν οσμή τυριού ή κρέμας και δε σχετίζονται τόσο με τα αλλοιωμένα δείγματα αλλά περισσότερο με αυτά που δε θεωρούνται φρέσκα. Η εξανόλη σχετίζεται περισσότερο με τα δείγματα που έχουν κατηγοριοποιηθεί ως «αλλοιωμένα» και στις 2 συσκευασίες. Η εξανόλη σχετίζεται με την οξείδωση των λιπών και κυρίως με την οξείδωση του ελαϊκού οξέος που υπάρχει στο κρέας. Σε χαμηλή συγκέντρωση συμβάλει θετικά στο άρωμα του κρέατος αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δρα αρνητικά καθώς η συγκέντρωσή της αυξάνεται εξαιτίας οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του χοιρινού κρέατος (Calkins & Hodgen, 2007). Επιπροσθέτως, οι αλδεϋδες πεντανάλη, εξανάλη, επτανάλη, εννεανάλη συσχετίζονται περισσότερο με το φρέσκο κρέας και στις δύο περιπτώσεις ενώ οι περισσότερες αλκοόλες συσχετίζονται με λιγότερο φρέσκο κρέας. Οι αλκοόλες προκύπτουν από την

αναγωγή των αλδεϋδών οι οποίες προέρχονται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων του κρέατος, αποδεικνύοντας την ενεργή λειτουργία των αναγωγικών συστημάτων του κρέατος (Soncin et al., 2007). Επίσης, η κετόνη οκταν-2,5-διόνη σχετίζεται περισσότερο με το φρέσκο κρέας σε αερόβιες συνθήκες, ενώ στην άλλη συσκευασία σχετίζεται περισσότερο με δείγματα που δεν θεωρούνται φρέσκα, αλλά ανήκουν στην ενδιάμεση κατηγορία «σχετικά φρέσκα».

Τέλος, εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη διαθέσιμων δεδομένων για τις πτητικές οργανικές ενώσεις του κρέατος κατά τη διάρκεια της συντήρησης και έτσι είναι σημαντική η μελέτη των πτητικών ουσιών για την αποτελεσματική ανάλυση της δυναμικής της αλλοίωσης με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας και την πιθανή συσχέτισή τους ως δείκτες αλλοίωσης.

Κεφάλαιο 4

Γονοτυπικός χαρακτηρισμός του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά

4.1. Εισαγωγή

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα βακτήρια είναι απόντα, μη ανιχνεύσιμα ή σε εξαιρετικά χαμηλό πληθυσμό στον μυϊκό ιστό των υγιών ζώντων ζώων (Nychas et al., 2008). Κατά τη σφαγή του ζώου τα φυσικά προστατευτικά φράγματα (δέρμα, τρίχωμα) και οι φυσικοί αντιμικροβιακοί μηχανισμοί άμυνας (λυσοζύμη, αντιμικροβιακά πεπτίδια) του ζωντανού ζώου καταστρέφονται. Αυτό έχει ως συνέπεια, το κρέας να εκτίθεται σε πηγές μικροβιακής επιμόλυνσης και ανάλογα με τις διάφορες παραμέτρους (χαρακτηριστικά του ζώου, γεωγραφική καταγωγή και εποχή του χρόνου) υποβάλλεται σε ταχεία αποσύνθεση. Οι πιθανές πηγές μικροβιακής επιμόλυνσης περιλαμβάνουν τη γαστρεντερική οδό του ζώου, το νερό, το δάπεδο και τον αέρα του χώρου επεξεργασίας, το δέρμα, το τρίχωμα, τις επιφάνειες επεξεργασίας (επιφάνειες κοπής, ταινία μεταφοράς) και τα εργαλεία κοπής, με τα οποία το ζώο έρχεται σε επαφή πριν ή κατά τη σφαγή του, κατά τον τεμαχισμό του και κατά την ψύξη των τεμαχίων κρέατος (Antic et al., 2010, Doulgeraki et al., 2011, Koutsoumanis & Sofos, 2004). Βακτήρια τα οποία απαντώνται πιο συχνά στο κρέας και συντελούν στην αλλοίωση του, είναι τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, το είδος *Brochothrix thermosphacta*, το γένος *Pseudomonas* spp., και τα γαλακτικά βακτήρια ανάλογα με τον τύπο του κρέατος και τις συνθήκες αποθήκευσης του (Nychas et al., 2008). Είναι γνωστό ότι το γένος *Pseudomonas* αποτελεί την κυρίαρχη μικροχλωρίδα του κρέατος που συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες, ενώ το βακτήριο *B. thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν τη κυρίαρχη μικροχλωρίδα κατά την συντήρηση του κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Doulgeraki et al., 2010b, Nychas et al., 2008, Pennacchia et al., 2011, Russo et al., 2006, Xu et al., 2010a). Είναι σημαντικό να τονιστεί πως σε σύγκριση με τα γαλακτικά βακτήρια, άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως το βακτήριο *B. thermosphacta*, δεν έχουν μελετηθεί σε βάθος παρόλο που το τελευταίο έχει ήδη αναγνωριστεί ως αλλοιωγόνο βακτήριο του κρέατος το οποίο υποβαθμίζει την ποιότητά του προκαλώντας ανεπιθύμητες οσμές. Ειδικότερα το βακτήριο *B. thermosphacta*, χωρίς πρωτεολυτική δράση, έχει βρεθεί να παράγει έναν αριθμό ενώσεων, λ.χ. ακετοΐνης, οξικού, ισοβουτυρικού, 2-μεθυλοβουτυρικού, ισοβαλερικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες και γαλακτικού οξέος και αιθανόλης σε

συνθήκες με περιορισμένη συγκέντρωση οξυγόνου, αντιστοίχως, προκαλώντας ειδικού τύπου αλλοίωση, όπως έχει αναφερθεί σε μελέτες που έγιναν κατά τη συντήρηση νωπού κρέατος (Dainty 1996, Dainty & Mackey, 1992, Ercolini et al., 2006, Nychas et al., 2008, Russo, et al., 2006). Είναι επίσης γνωστό ότι το βακτήριο *B. thermosphacta* προκαλεί αποχρωματισμό στην επιφάνεια του κρέατος ή παραγωγή αερίου στη συσκευασία. Τέλος, ενώ για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Doulgeraki et al., 2011), *Pseudomonas* spp. (Ercolini et al., 2007, 2010, Doulgeraki & Nychas, 2013), και τα γαλακτικά βακτήρια (Doulgeraki et al., 2010b) υπάρχουν αρκετές πληροφορίες όσον αφορά τις γονοτυπικές διαφορές κατά την αλλοίωση κρέατος, οι διαφορές στον γονότυπο των διάφορων στελεχών του *B. thermosphacta* δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς (Xu et al., 2010a).

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση μοριακών τεχνικών για την ταυτοποίηση αλλοιωγόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών έχει ευρεία εφαρμογή (Wang et al., 2007). Ωστόσο, μόνο λίγες μελέτες έχουν εστιάσει στον τομέα του κρέατος ή/ και των τροφίμων για τον χαρακτηρισμό του *B. thermosphacta*. Οι Pennacchia et al., (2011), χρησιμοποίησαν αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση του βακτηρίου *B. thermosphacta* που προήλθε από δείγματα κρέατος σε μία προσπάθεια να μειώσουν το χρόνο που απαιτείται για την μικροβιολογική ανάλυση. Οι Xu et al. (2010), μελέτησαν στελέχη του βακτηρίου *Brochothrix* spp., που είχαν απομονωθεί από ψάρι, κρέας και πουλερικά χρησιμοποιώντας 16S-23S rDNA ITS-PCR (intergenic transcribed spacer, ITS-PCR), επαναλαμβανόμενων παλίνδρομων αλληλουχιών (Repetitive Extragenic Palindromic, Rep-PCR) και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA και τα ευρήματά τους έδειξαν μικρές γονοτυπικές διαφορές μεταξύ των στελεχών. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα βακτήρια *Brochothrix* spp., χαρακτηρίστηκαν ως *B. thermosphacta*. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Pennacchia et al., (2011) για βόειο κρέας που συντηρήθηκε υπό ψύξη, συσκευασμένο αερόβια ή υπό κενό. Εντούτοις, σε μια πρόσφατη έρευνα (Nowak & Piotrowska, 2012), αναφέρθηκε ότι διάφορα στελέχη του βακτηρίου *B. thermosphacta* παράγουν διαφορετικές υδρολάσες, οι οποίες συμμετέχουν στη διαδικασία της αλλοίωσης του κρέατος και των προϊόντων κρέατος. Αναλυτικότερα, ορισμένα στελέχη είναι ικανά να αποικοδομούν πρωτεΐνες ή να παράγουν πρωτεάσες με διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος. Έτσι, η διερεύνηση των

στελεχών που επικρατούν και συμβάλουν στην αλλοίωση του κρέατος θα διευρύνει τις γνώσεις της μικροβιακής οικολογίας του κρέατος και, κατά συνέπεια, θα βοηθήσει στην κατανόηση της διαδικασίας αλλοίωσης του κρέατος.

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν ο προσδιορισμός της γονοτυπικής ποικιλομορφίας των στελεχών *Brochothrix* spp., τα οποία απομονώθηκαν από χοιρινό κιμά συντηρημένο υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (0, 5, 10 και 15°C) και συσκευασίας (αερόβιες συνθήκες και συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας), καθώς και η μελέτη της εξέλιξης των στελεχών αυτών κατά τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος στις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Για την επίτευξη αυτών των στόχων χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μοριακές μέθοδοι, η Rep-PCR, η Sau-PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) ώστε να γίνει διαφοροποίηση των επιλεγμένων απομονώσεων *Brochothrix* spp. σε επίπεδο στελέχους.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

- i) Απομόνωση των στελεχών από το επιλεκτικό υπόστρωμα για *Brochothrix* spp. (βλ. κεφ. 2.6.1).
- ii) Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (βλ. κεφ. 2.6.2).
- iii) Απομόνωση DNA (βλ. κεφ. 2.6.3)
- iv) Rep-PCR (βλ. κεφ. 2.6.4)
- v) Sau-PCR (βλ. κεφ. 2.6.5)

4.3. Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη, το βακτήριο *Brochothrix* spp., βρέθηκε να είναι η κυρίαρχη αλλοιωγόνος χλωρίδα, από κοινού με τα γαλακτικά βακτήρια στον χοιρινό κιμά που συντηρήθηκε σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Αντίθετα, στα δείγματα του

χοιρινού κιμά που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες, βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, αποτελούσαν την κυρίαρχη αλλοιωγόνο μικροχλωρίδα και δευτερευόντως αυτά του γένους *Brochothrix* (περισσότερες λεπτομέρειες για την αλλοιωγόνο χλωρίδα του χοιρινού κιμά αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.3.). Ο Πίνακας 4.1 συνοψίζει τον πληθυσμό που καταμετρήθηκε στο επιλεκτικό υπόστρωμα STAA σε φρέσκο χοιρινό κιμά και σε δύο φάσεις της αλλοίωσης (μέση και τέλος διάρκειας ζωής) του χοιρινού κιμά κατά τη συντήρησή του σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Από τον Πίνακα 4.1, φαίνεται πως σε θερμοκρασίες ψύξης (0 και 5°C), ο πληθυσμός των βακτηρίων ήταν χαμηλότερος στα τελικά στάδια της συντήρησης όταν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ενώ στις υψηλές θερμοκρασίες (10 και 15°C), ο πληθυσμός ήταν παρόμοιος και για τις δύο συσκευασίες (αέρα και MAP).

Πίνακας 4.1: Πληθυσμός εκφρασμένος σε log CFU/g του χοιρινού κιμά κατά την συντήρησή του (αρχή, μέση και τέλος) σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στο επιλεκτικό υπόστρωμα STAA

Θερμοκρασία °C	Χρόνος αποθήκευσης	Πληθυσμός στο STAA (log CFU/g) ^a	
		Αέρας	MAP
	Αρχή	4,03±0,70	4,15±0,48
0	Μέση	6,77±0,01	5,90±0,32
	Τέλος	8,12±0,11	6,10±0,04
5	Μέση	7,64±0,15	6,64±0,06
	Τέλος	8,07±0,31	7,00±0,05
10	Μέση	6,64±0,13	6,51±0,72
	Τέλος	7,66±0,11	7,17±0,42
15	Μέση	7,45±0,64	6,79±0,05
	Τέλος	7,96±0,16	7,46±0,17

^a Οι τιμές του πληθυσμού παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων

Είναι επίσης σαφές ότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται είτε για την απαρίθμηση είτε για τη μελέτη της εξέλιξης της μικροχλωρίδας επηρεάζει το τελικό

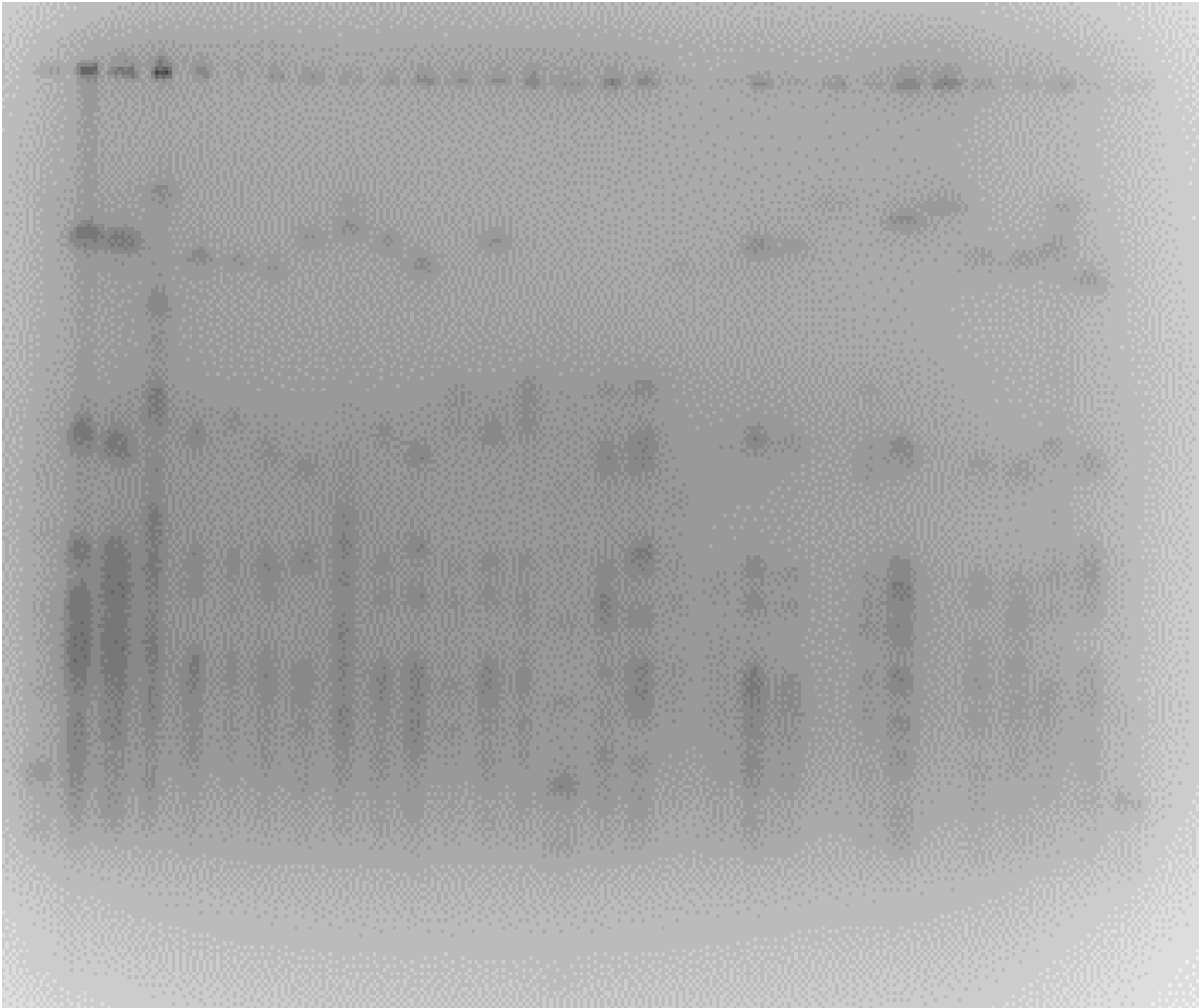
αποτελέσμα. Έτσι, ένα σύνολο από 306 αποικίες του βακτηρίου *Brochothrix* ανακτήθηκαν από φρέσκο χοιρινό κιμά σε δύο χρονικά διαστήματα (μεσαίο και τελικό στάδιο) από όλες τις συνθήκες συντήρησής του (155 στελέχη από αερόβιες συνθήκες και 151 από συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας), διαφοροποιήθηκαν σύμφωνα με το γονοτυπικό προφίλ τους από 3 μεθόδους (PFGE, Rep-PCR και Sau-PCR) και ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση της περιοχής V1-V3 του γονιδίου 16S rRNA. Η ικανότητα αυτών των μεθόδων, για χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών σε υποείδος ή σε επίπεδο στελέχους, βασίζεται σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος. Έτσι, η τεχνική PFGE βασίζεται σε γονοτυπικά πρότυπα που σχετίζονται με τα τμήματα του DNA που προκύπτουν μετά από πέψη του συνολικού γονιδιώματος από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η Rep-PCR βασίζεται στο διαχωρισμό των προτύπων προφίλ που σχετίζονται με την επαναλαμβανόμενη (συντηρημένη) αλληλουχία εντός του γονιδιώματος, ενώ η Sau-PCR στα γονοτυπικά αποτυπώματα με βάση τις θέσεις δράσης του ενζύμου περιορισμού *Sau3A*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι προέκυψαν διαφορετικά αποτελέσματα από τις διαφορετικές μεθόδους το οποίο αποδίδεται στον διαφορετικό βαθμό διακριτικής ικανότητας της κάθε μοριακής μεθόδου. Το δενδρόγραμμα που προέκυψε μετά από την ανάλυση εικόνας των διαφορετικών προτύπων της PFGE και την χρήση του περιοριστικού ενζύμου *ApaI* (Εικόνα 4.1) και οι 306 απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν σε 4 ομάδες. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η διαφοροποίηση των στελεχών βασίστηκε κυρίως στην θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, η μία ομάδα αποτελούταν μόνο από τις απομονώσεις που είχαν προέλθει από την αερόβια αλλοίωση του κιμά σε θερμοκρασία 0°C. Η δεύτερη ομάδα αποτελούταν από απομονώσεις που είχαν προέλθει από τη θερμοκρασία των 10 και 15°C από τις δύο συσκευασίες, ενώ το τρίτο προφίλ αποτελούταν από απομονώσεις σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από δείγματα που είχαν συντηρηθεί σε θερμοκρασία 0°C. Τέλος το τελευταίο προφίλ αποτελούταν από όλα τα υπόλοιπα στελέχη. Η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου για διάκριση των στελεχών βάση των ειδικών συνθηκών αποθήκευσης έχει αναφερθεί στο παρελθόν για δείγματα βόειου κιμά (Doulgeraki, et al., 2010b, 2011, Doulgeraki & Nychas 2013).

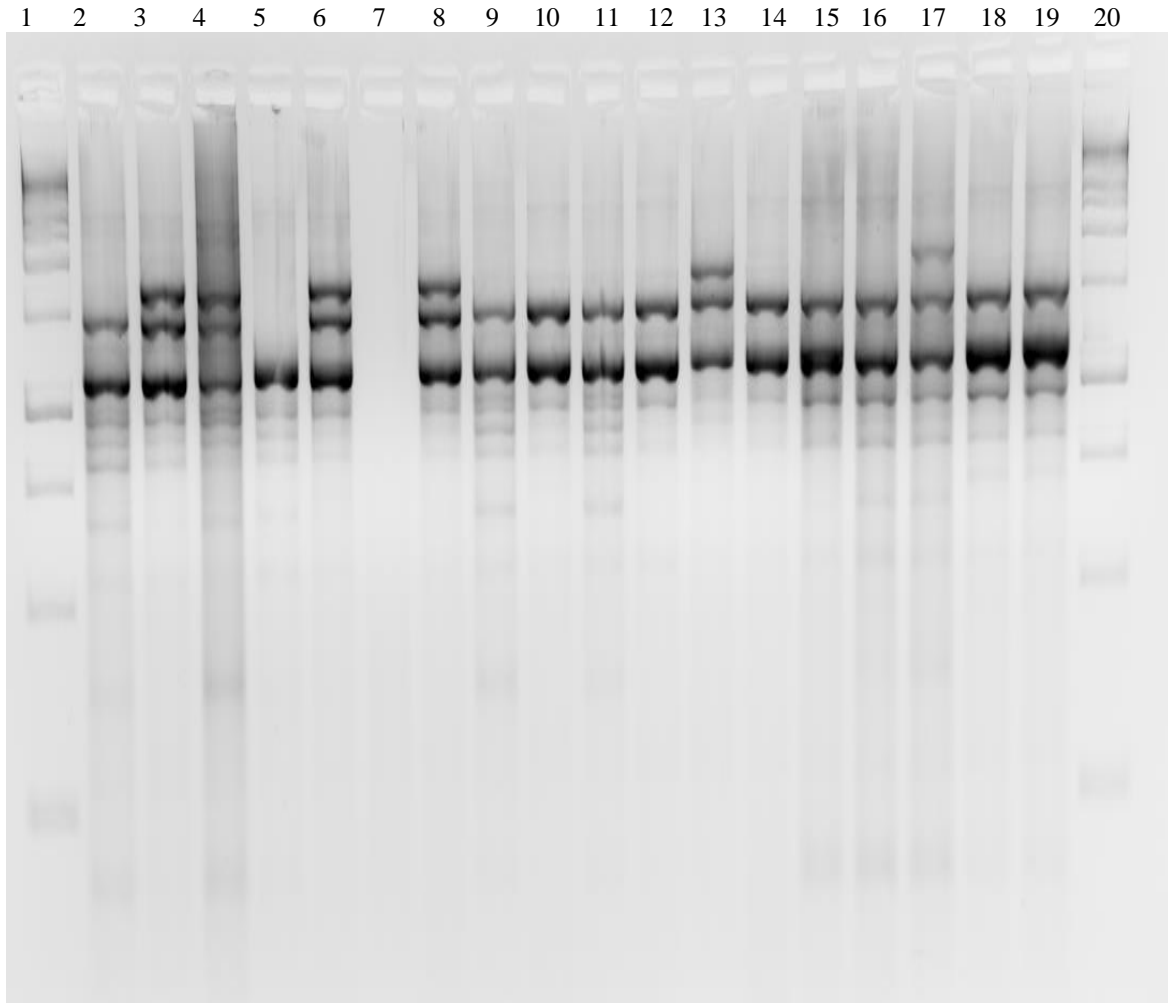
Στην τεχνική Rep-PCR χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής (primer) GTG₅ (5'GTG GTG GTG GTG GTG 3') ώστε να γίνει αναδιάταξη των επαναλαμβανόμενων

αλληλουχιών του DNA μέσα σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Η Εικόνα 4.2 δείχνει τα γονοτυπικά αποτυπώματα των προϊόντων της Rep-PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά από την ανάλυση εικόνας έδωσαν 8 διαφορετικά πρότυπα. Συγκεκριμένα, δύο ομάδες αποτελούνταν μόνο από απομονώσεις σε αερόβιες συνθήκες, μία ομάδα περιείχε μόνο απομονώσεις από τους 0°C κατά την αερόβια αλλοίωση, η τέταρτη ομάδα περιλάμβανε 2 στελέχη, 1 από αερόβιες συνθήκες στους 10°C και ένα από συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από τους 15°C, ενώ οι υπόλοιπες 4 ομάδες περιλάμβαναν στελέχη από όλες τις θερμοκρασίες, τις συσκευασίες και τα χρονικά σημεία της αλλοίωσης. Η Rep-PCR έχει βρεθεί ότι είναι ικανή να ομαδοποιεί στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από διαφορετικές μονάδες επεξεργασίας τροφίμων και από διαφορετικά τρόφιμα (Iacumin, et al., 2006).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

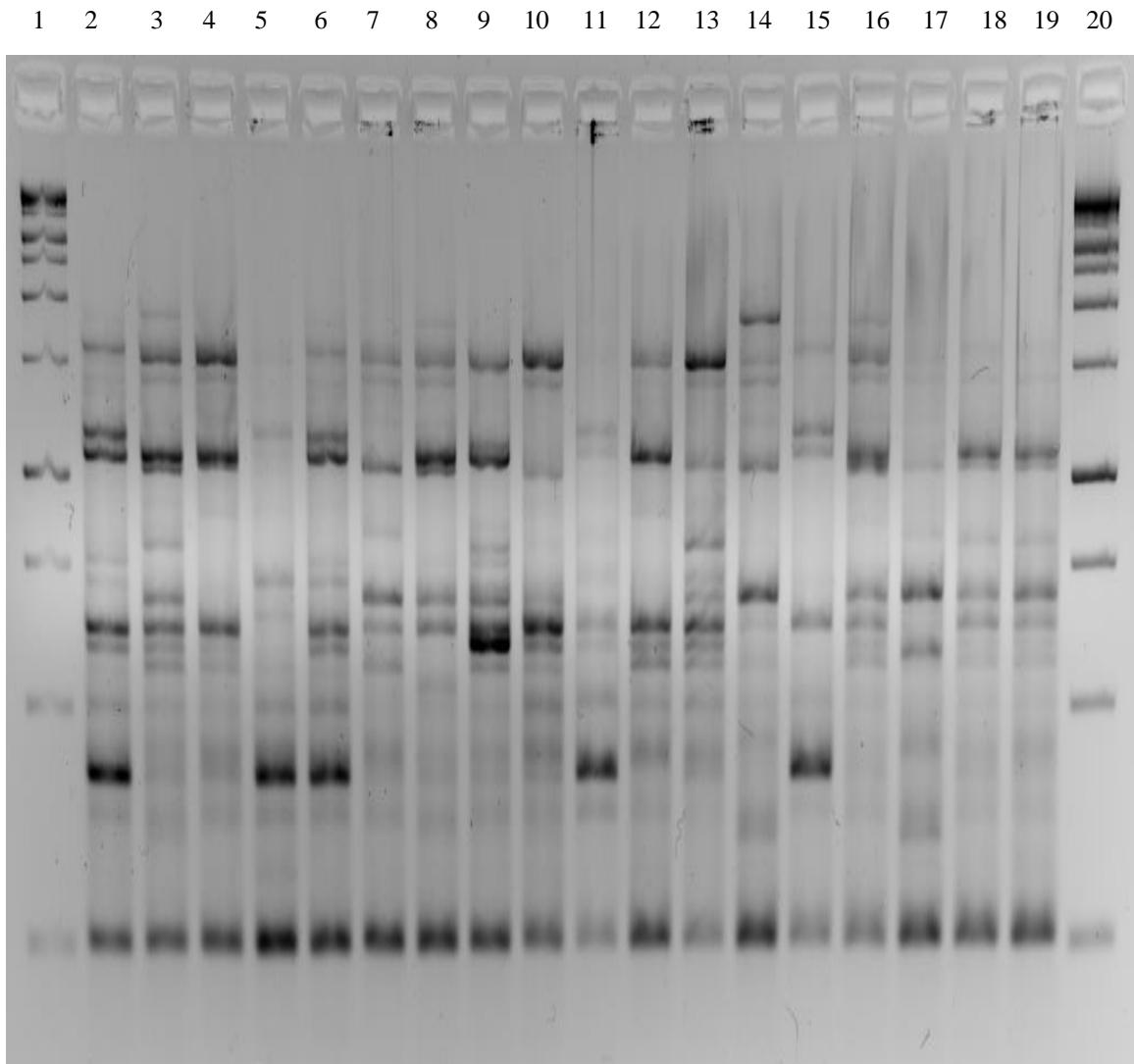


Εικόνα 4.1: Πρότυπα του γονιδιακού DNA από τα στελέχη του βακτηρίου *Brochothrix* spp., που έχουν απομονωθεί από χοιρινό κιμά συντηρημένο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *AraI* (σειρές 2-14 και 16-29) και δείκτης PFG (σειρές 1, 15 και 30)



Εικόνα 4.2: Προϊόντα της Rep-PCR από τα στελέχη του βακτηρίου *Brochothrix* spp., (σειρές 2-6, 8-19) που έχουν απομονωθεί από χοιρινό κιμά συντηρημένο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας. Σειρές 1 και 20: δείκτης με κλίμακα 100bp, σειρά 7: τυφλό δείγμα

Από την άλλη μεριά, η Sau-PCR δεν έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τις δύο προαναφερθείσες τεχνικές. Μετά από ανάλυση εικόνας (Εικόνα 4.3.) των προϊόντων που λήφθηκαν με την τεχνική Sau-PCR το δενδρόγραμμα που προέκυψε ομαδοποίησε τις απομονώσεις σε 33 διαφορετικές ομάδες (Εικόνα 4.4.).

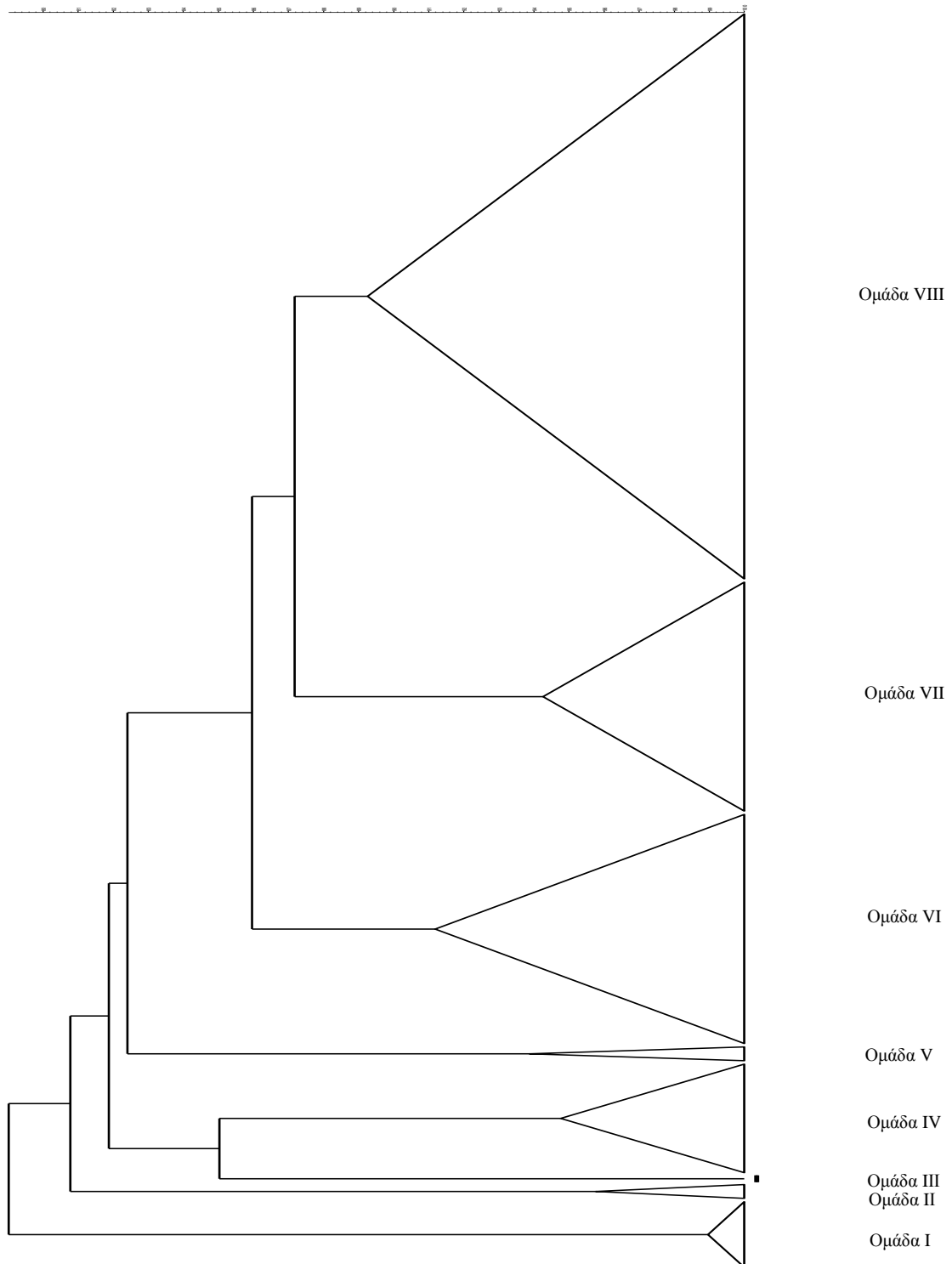


Εικόνα 4.3: Προϊόντα της Sau-PCR από τα στελέχη του βακτηρίου *Brochothrix* spp., (σειρές 2-19) που έχουν απομονωθεί από χοιρινό κιμά συντηρημένο σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας. Σειρές 1 και 20: δείκτης με κλίμακα 100bp

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα από τις τρεις μοριακές τεχνικές αναλύθηκαν από κοινού και το δενδρόγραμμα που προέκυψε μετά από συγκεντρωτική ανάλυση εικόνας των προτύπων των τεχνικών PFGE, Rep-PCR και Sau-PCR χρησιμοποιώντας συντελεστή ομοιότητας (coefficient of similarity) 86% παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.5. Τα 306 στελέχη που εξετάστηκαν, χωρίστηκαν σε 8 ομάδες. Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζεται αναλυτικά η κατανομή και επικράτηση των διαφορετικών ομάδων του γένους *Brochothrix* spp., στην αρχή, τη μέση και τέλος του χρόνου συντήρησης του χοιρινού κιμά.



Εικόνα 4.4: Δενδρόγραμμα των γονοτυπικών προτύπων των απομονώσεων *Brochothrix* spp., όπως προέκυψαν από την τεχνική Sau-PCR



Εικόνα 4.5: Ανάλυση διασποράς των γονοτυπικών προτύπων των απομονώσεων του βακτηρίου *Brochothrix* spp., που ανακτήθηκαν κατά την αλλοίωση του χοιρινού κινά σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με ανάλυση με τις τεχνικές PFGE, Rep-PCR και Sau-PCR. Ο συντελεστής ομοιότητας ήταν 86%. Οι ομάδες υποδεικνύονται με λατινικούς αριθμούς και αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Κατανομή των διαφορετικών ομάδων του βακτηρίου *Brochothrix thermosphacta* κατά την αλλοίωση του χοιρινού κιμά σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C σε αερόβιες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Συσκευασία	Θ (°C)	Συνολικές απομονώσεις στελεχών	Ομάδα ^α							
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Αέρας	Φρέσκο κρέας	39	9	1	-	-	-	1	8	20
	0	29	7 ^β /0 ^γ	-	0/1	-	3/0	0/10	-	4/4
	5	30	-	-	-	-	-	1/1	-	14/14
	10	27	-	0/3	-	-	1/0	7/9	-	6/1
	15	30	-	-	-	-	-	-	15/4	0/11
MAP	Φρέσκο κρέας	38	-	-	-	3	-	12	4	19
	0	30	-	-	-	8/15	-	1/0	-	6/0
	5	25	-	-	-	-	-	2/0	8/15	-
	10	28	-	-	-	-	-	15/4	-	0/9
	15	30	-	-	-	-	-	-	-	15/15
Συνολικές απομονώσεις		306	16	4	1	26	4	63	54	138

^α σύμφωνα με τα πρότυπα των PFGE, Sau-PCR και Rep-PCR

^β μέσος χρόνος αποθήκευσης

^γ τελικός χρόνος αποθήκευσης

Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα I αποτελούνταν από απομονώσεις που ανακτήθηκαν από φρέσκο κρέας και στο μέσο του χρόνου συντήρησης σε θερμοκρασία 0°C σε αερόβιες συνθήκες. Η ομάδα II αποτελούταν από 3 στελέχη τα οποία είχαν ανακτηθεί από το τέλος του χρόνου της συντήρησης στη θερμοκρασία των 10°C σε αερόβια συντήρηση και από 1 στέλεχος που είχε ανακτηθεί από το φρέσκο κρέας που κατόπιν συντηρήθηκε σε αερόβια ατμόσφαιρα. Η ομάδα III αποτελούνταν μόνο από ένα στέλεχος το οποίο είχε ανακτηθεί από το μέσο του χρόνου της συντήρησης σε θερμοκρασία 0°C σε αερόβιες συνθήκες. Στην ομάδα IV, περιλαμβάνονται απομονώσεις από τη μέση και το τελικό στάδιο του χρόνου της συντήρησης σε θερμοκρασία 0°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και 3 απομονώσεις οι οποίες ανακτήθηκαν από το φρέσκο κρέας το οποίο κατόπιν

συσκευάστηκε σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η ομάδα V αποτελείτο από 3 απομονώσεις που απομονώθηκαν από το μέσο του χρόνου της συντήρησης του χοιρινού κιμά σε θερμοκρασία 0°C και από 1 στέλεχος από την θερμοκρασία των 10°C σε αερόβιες συνθήκες. Η επόμενη ομάδα (VI) περιείχε 63 απομονώσεις. 29 προήλθαν από την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και 34 από την συντήρηση του κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Πιο συγκεκριμένα, από τα δείγματα της αερόβιας συντήρησης, οι απομονώσεις που ανακτήθηκαν προήλθαν από το φρέσκο κρέας, από τις θερμοκρασίες 5 και 10°C από το μέσο του χρόνου της συντήρησης και από τις θερμοκρασίες 0, 5, και 10°C από το τέλος του χρόνου της συντήρησης του χοιρινού κιμά. Στην περίπτωση του κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, η ομάδα VI περιλάμβανε απομονώσεις από φρέσκο κρέας, από τις θερμοκρασίες των 0, 5 και 10°C από το μέσο του χρόνου της συντήρησης και από τη θερμοκρασία 10 °C από το τέλος του χρόνου της συντήρησης του χοιρινού κιμά. Από την άλλη πλευρά, στην ομάδα VII ομαδοποιήθηκαν απομονώσεις από τις αερόβιες συνθήκες και από τις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από το φρέσκο κρέας και από τη θερμοκρασία 15 και 5°C αντίστοιχα. Τέλος, στην ομάδα VIII συγκεντρώθηκαν απομονώσεις από όλες τις περιπτώσεις εκτός από τη θερμοκρασία 5°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Επιπλέον, η ομάδα αυτή ήταν η πλέον κοινή για τις απομονώσεις που προέκυψαν από το φρέσκο κρέας και στις 2 συνθήκες συσκευασίας, σε θερμοκρασία 5°C υπό αερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 10°C υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας για το τέλος του χρόνου της συντήρησης του χοιρινού κιμά και σε θερμοκρασία 15°C για τις αερόβιες συνθήκες (τέλος του χρόνου της συντήρησης) και τις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Στην τελευταία περίπτωση (15°C, MAP) όλες οι απομονώσεις που ανακτήθηκαν από την θερμοκρασία 15°C ομαδοποιήθηκαν μόνο σε αυτήν την ομάδα. Ένας αντιπροσωπευτικός αριθμός στελεχών από τις παραπάνω 8 ομάδες υποβλήθηκε σε αλληλούχιση του 16S rRNA και τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα στελέχη ανήκουν στο είδος *Brochothrix thermosphacta*.

4.4. Συζήτηση

Η αλλοίωση του κρέατος είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει αναλυθεί εκτενώς από πολλούς ερευνητές (Dainty, 1996, Dainty & MacKey, 1992, Nychas et al., 2008). Σε αυτές τις μελέτες, όπως και σε άλλες, η ποικιλομορφία του μικροβιακού πληθυσμού σε κρέας ή προϊόντα κρέατος τα οποία συντηρούνται υπό διάφορες συνθήκες αποθήκευσης έχει περιγραφεί λεπτομερώς (Cocolin et al., 2004, Doulgeraki et al., 2010b, 2011, Ercolini et al., 2006, 2009, 2010, Stanbridge & Davies, 1998, Vasilopoulos et al., 2008, 2010). Ωστόσο, η συστηματική μελέτη της διαδοχής των μελών της μικροβιακής χλωρίδας καθώς και οι αλλαγές που συμβαίνουν σε επίπεδο στελέχους, που αναφέρεται ως εφήμερη αλλοιωγόνος χλωρίδα, μόλις πρόσφατα λήφθηκε υπόψη (Doulgeraki, et al., 2010b, 2012, Nychas, et al., 2008). Το είδος *B. thermosphacta* έχει ήδη αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό τμήμα της αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας του κρέατος (Enfors et al., 1979, Lambropoulou et al., 1996, Newton & Gill, 1978, Nychas & Skandamis, 2005, Pennacchia et al., 2011, Russo et al., 2006, Xu et al., 2010a), ωστόσο λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες. Σε αυτήν την μελέτη, παρατηρήθηκε μια σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ των απομονώσεων που ανακτήθηκαν από την αερόβια συντήρηση του χοιρινού κιμά, ενώ για τα στελέχη που ανακτήθηκαν από τα δείγματα που συντηρήθηκαν υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας η ετερογένεια ήταν χαμηλότερη. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν βρέθηκαν να συμβαδίζουν με τα αντίστοιχα άλλων μελετών όπου η διαφοροποίηση τόσο σε είδη όσο και σε στελέχη αυξανόταν στις περιπτώσεις της συντήρησης κρέατος υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Doulgeraki et al., 2010b, 2011). Ωστόσο, οι συνθήκες συντήρησης επηρέασαν την ποικιλομορφία των στελεχών παρόλο που οι πληθυσμοί του *B. thermosphacta* ήταν παρόμοιοι. Επιπλέον, οι απομονώσεις που ανακτήθηκαν στα αρχικά στάδια της συντήρησης του κρέατος ήταν αισθητά διαφορετικές από τις αντίστοιχες κατά το τελικό στάδιο της συντήρησης του κρέατος στις θερμοκρασίες ψύξης. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν ληφθεί για το βόειο κρέας (Doulgeraki et al., 2010b, 2011, Doulgeraki & Nychas 2013, Ercolini et al., 2006), όπως και για χοιρινό κρέας (Li et al., 2006). Συνολικά, η ποικιλομορφία του *B. thermosphacta* και η αλλαγές στη βακτηριακή σύνθεση μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι η μικροβιακή

ποικιλομορφία ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Dainty & MacKey, 1992, Li et al., 2006). Πράγματι, η ομάδα VIII περιλάμβανε τις περισσότερες απομονώσεις από όλες τις περιπτώσεις κυρίως από φρέσκο κρέας και από υψηλές θερμοκρασίες (10 και 15°C) ενώ δεν βρέθηκε καμία περίπτωση από τους 5°C για κρέας που είχε συντηρηθεί υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Πρέπει να τονιστεί πως όλες οι απομονώσεις που ανακτήθηκαν από την θερμοκρασία των 15°C από κρέας συντηρημένο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ανήκαν σε μία μόνο ομάδα (ομάδα VIII). Τέλος, όσον αφορά τις απομονώσεις που ανακτήθηκαν από τη θερμοκρασία 0°C, οι συνθήκες συσκευασίας επηρέασαν την ποικιλομορφία τους, καθώς οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν σε διαφορετικές ομάδες. Όντως, στην αερόβια συσκευασία, τα στελέχη μοιράστηκαν ανάμεσα στις ομάδες I, III, V, VI και VIII, ενώ υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας τα στελέχη βρέθηκαν ανάμεσα στις ομάδες IV, VI και VIII. Αυτή η διαφορά στην βακτηριακή σύνθεση μπορεί να οφείλεται στον διαφορετικό χρόνο συντήρησης του κρέατος, στο διαφορετικό περιβάλλον συντήρησης (αερόβιο ή MAP) καθώς και σε διαφορετικές πηγές επιμόλυνσης του κρέατος (Li et al., 2006).

Σε αντίθεση με άλλα οικοσυστήματα, το οικοσύστημα του κρέατος δεν έχει μελετηθεί ενδελεχώς σε επίπεδο στελέχους και επομένως είναι συχνά άγνωστο πόσο ομοιογενή ή ετερογενή είναι τα διάφορα στελέχη του ίδιου είδους. Τέτοιες πληροφορίες είναι σημαντικές για την εκτίμηση του πληθυσμού που προκαλεί την αλλοίωση του κρέατος και την εις βάθος μελέτη των διαφορετικών ειδών προκειμένου να εμποδιστεί η αύξηση τους και να περιοριστεί η αλλοιωγόνος δράση τους, χρησιμοποιώντας τις πιο κατάλληλες συνθήκες συντήρησης (Ercolini et al., 2010). Ως εκ τούτου, φαίνεται πως η παρούσα μελέτη παρέχει μια πρώτη εικόνα για την ποικιλομορφία των στελεχών του *B. thermosphacta* σε σχέση με τις συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία και συσκευασία) καθώς τα στελέχη του βακτηρίου *B. thermosphacta* διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με τις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά δεδομένου ότι διευρύνουν την υπάρχουσα γνώση όσον αφορά την μικροβιακή οικολογία του κρέατος και πιο συγκεκριμένα συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης. Τα διάφορα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν, θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω, π.χ. μελέτη των βιοχημικών χαρακτηριστικών (σακχαρολυτική, λιπολυτική δράση, παραγωγή πτητικών συστατικών κ.τ.λ.) που επικρατούν σε διαφορετικές συνθήκες.

Αντίστοιχες παρατηρήσεις και συμπεράσματα έχουν αναφερθεί για άλλα είδη ή/ και στελέχη όπως για γαλακτικά βακτήρια, *Enterobacteriaceae* και ψευδομονάδες (Doulgeraki et al., 2010b, 2011, Doulgeraki & Nychas 2013, Ercolini et al., 2006, 2009, 2010, Pennacchia et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, οι Ercolini et al., (2010) μελέτησαν στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas fragi* τα οποία είχαν απομονωθεί από φρέσκο και αλλοιωμένο βόειο και χοιρινό κρέας και από κρέας πουλερικών, προκειμένου να εξεταστεί η ετερογένεια των διαφορετικών στελεχών καθώς ο μικροοργανισμός αυτός έχει αναγνωριστεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος (Ercolini et al., 2007, 2009). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως διαφορετικά στελέχη μπορούν να εμφανιστούν πριν ή μετά την αλλοίωση του κρέατος αλλά δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση στελέχους με το είδος κρέατος που έγινε η απομόνωση του μικροοργανισμού. Αντίθετα, υπάρχει άμεση συσχέτιση των παραγόμενων πτητικών συστατικών και του οργανοληπτικού προφίλ του κρέατος με το κάθε στέλεχος (Ercolini et al., 2010). Μια πρόσφατη έρευνα (Nowak & Czyzowska, 2011) σε απομονωμένα στελέχη του *B. thermosphacta* από κρέας και προϊόντα του, μελέτησε την δυνατότητα παραγωγής αμινών καθώς και την ικανότητα των στελεχών του *B. thermosphacta* στη συμβολή της αύξησης της ικανότητας αλλοίωσης της συνυπάρχουσας μικροχλωρίδας. Η μικροβιακή αποικοδόμηση των αμινοξέων που υπάρχουν στο κρέας σε αμίνες είναι σημαντική διότι δημιουργεί ενώσεις που προσδίδουν μη αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στελέχη του βακτηρίου *B. thermosphacta* είναι ικανά να παράγουν μικρές ποσότητες από 2 αμίνες (ισταμίνη και τυραμίνη) ενώ η παρουσία του μικροοργανισμού αυτού είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης από κατά Gram αρνητικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Escherichia*. Αντίστοιχη έρευνα (Nowak & Piotrowska, 2012) μελέτησε την ικανότητα πρωτεολυτικής και λιπολυτικής δράσης στελεχών του *B. thermosphacta* τα οποία είχαν απομονωθεί από κρέας και προϊόντα του. Τα στελέχη που μελετήθηκαν ήταν ικανά να παράγουν πρωτεάσες και λιπάσες αλλά δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των στελεχών και της λιπολυτικής ή πρωτεολυτικής δράσης τους. Τέτοιες πληροφορίες είναι σημαντικές καθώς ένας σημαντικός αριθμός στελεχών του ίδιου είδους που αναπτύσσονται στο κρέας μπορούν να επηρεάσουν το είδος και τον τύπο της αλλοίωσης (Doulgeraki & Nychas, 2013, Ercolini et al., 2010).

Κεφάλαιο 5

Εκτίμηση της αλλοίωσης στείρου χοιρινού φιλέτου εμβολιασμένου με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς με μικροβιολογικές και φυσικοχημικές μεθόδους

5.1. Εισαγωγή

Η μικροχλωρίδα που είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση των τροφίμων έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών μέχρι σήμερα. Κάποιες από αυτές επικεντρώνονται στο κρέας και στα προϊόντα κρέατος και ασχολήθηκαν με την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό της κυρίαρχης μικροχλωρίδας σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης καθώς είναι γνωστό πως η αλλοίωση προκαλείται μόνο από ένα κλάσμα της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας του κρέατος, η οποία κυριαρχεί κατά την αποθήκευση. Η κυρίαρχη αυτή μικροχλωρίδα που ονομάζεται εφήμερη/ ειδική αλλοιωγόνος χλωρίδα, αποτελείται από τους μικροοργανισμούς αυτούς που μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε όλες τις διαθέσιμες βιοθέσεις (Nychas et al., 2008). Οι διάφορες μικροβιακές ομάδες που ενδεχομένως θα κυριαρχήσουν και θα συμβάλουν στην διαδικασία της αλλοίωσης εξαρτώνται από δύο κυρίως παράγοντες: α) τις συνθήκες αποθήκευσης και β) τον ανταγωνισμό. Η έννοια της διαδοχής των μικροοργανισμών που σχετίζονται με την αλλοίωση, δηλαδή η εφήμερη/ ειδική αλλοιωγόνος χλωρίδα η οποία είναι υπεύθυνη για το είδος της αλλοίωσης που θα επικρατήσει, μόλις πρόσφατα άρχισε να λαμβάνεται υπόψιν (Chenoll et al., 2007, Doulgeraki et al., 2012, Ercolini et al., 2006, Nychas et al., 2008). Για παράδειγμα, δύο διαφορετικές περιπτώσεις αλλοίωσης είναι πιθανές. Η πρώτη περίπτωση αφορά στην κυριαρχία αεροβίων ή προαιρετικά αναεροβίων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (λ.χ. κρέας που συντηρείται αερόβια ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με υψηλό ποσοστό οξυγόνου) ενώ η δεύτερη συμβαίνει όταν επικρατούν προαιρετικά αναερόβια ή αναερόβια θετικά κατά Gram βακτήρια (λ.χ. σε κρέας που συντηρείται με χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου με ή χωρίς την παρουσία αντιμικροβιακών αερίων).

Είναι διαπιστωμένο, ότι οι *Pseudomonas* spp., οι οποίες είναι αερόβια αρνητικά κατά Gram βακτηρία, αποτελούν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα του κρέατος όταν αυτό συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες ενώ κατά την συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με ή χωρίς την προσθήκη φυσικών συντηρητικών ο πληθυσμός τους καταστέλλεται (Doulgeraki & Nychas, 2013). Παρόμοια αποτελέσματα για το ρόλο των *Pseudomonas* spp., ως ειδική αλλοιωγόνος χλωρίδα συλλέχθηκαν από μελέτες που

αφορούσαν χοιρινό κρέας το οποίο συντηρούνταν σε διάφορες συνθήκες συσκευασίας και θερμοκρασίας (Drosinos & Board, 1994, 1995, Newton & Gill, 1977, 1978, Li et al., 2006, 2013, Mano et al., 2000). Τα είδη του γένους *Pseudomonas* spp., που αναγνωρίζονται πιο συχνά ως αιτιολογικοί παράγοντες της αλλοίωσης των φρέσκων τροφίμων που συντηρούνται αερόβια ανήκουν σε μέλη της ομάδας της *Pseudomonas fluorescens*, μαζί με τις ψυχρότροφες ψευδομονάδες *P. fragi*, *P. ludensis* και *P. putida* καθώς συμμετέχουν στην αλλοίωση γάλακτος, κρέατος και ψαριών ακόμα και σε θερμοκρασίες ψύξης (Ercolini et al., 2007). Εκτός από την ψυχρότροφη φύση τους, ο γρήγορος ρυθμός αύξησης και οι μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο είναι οι κύριοι λόγοι που τα είδη αυτά αποτελούν την κυρίαρχη χλωρίδα κρέατος που αποθηκεύεται αερόβια ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με υψηλό ποσοστό οξυγόνου καθώς έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν γρήγορα τη γλυκόζη του υποστρώματος (Doulgeraki & Nychas, 2013). Οι μικροοργανισμοί αυτοί καταναλώνουν τη γλυκόζη, η οποία είναι παρούσα στο κρέας και μόλις η γλυκόζη καταναλωθεί εντελώς από τα βακτήρια, αυτά ξεκινούν να καταναλώνουν αμινοξέα και αρχίζουν να παράγονται υποπροϊόντα του μεταβολισμού τους όπως σουλφίδια, εστέρες, οξέα και άλλες δύσοσμες ενώσεις (Nychas et al., 1988). Δεδομένου ότι ένα υψηλό ποσοστό των ψευδομονάδων (π.χ. *P. fluorescens*, *P. fragi* και *P. ludensis*) είναι ικανές να παράγουν εξωκυτταρικές πρωτεάσες και λιπάσες, η γλοιώδης εμφάνιση, η χυλώδης υφή, η παραγωγή δυσάρεστων οσμών και η μερική ή πλήρης αποσύνθεση ζωικών ιστών οφείλεται κυρίως σε αυτές (Doulgeraki & Nychas, 2013).

Από την άλλη μεριά, τα γαλακτικά βακτήρια μαζί με τον *Brochothrix thermosphacta* αποτελούν την ειδική αλλοιωγόνο χλωρίδα του κρέατος όταν αυτό αποθηκεύεται σε συνθήκες όπου η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα αυξάνεται (Axelsson, 1998, Doulgeraki et al., 2010b, Holzapfel, 1998, Nychas & Skandamis, 2005). Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, και *Carnobacterium* ανευρίσκονται πιο συχνά σε κρέας που συντηρείται υπό κενό ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση κρεάτων υπό συνθήκες ψύξης και πιο συγκεκριμένα, οι *Lactobacillus sakei* και *Leuconostoc* spp., έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση κρέατος συσκευασμένου υπό κενό ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες ψύξης (Doulgeraki et al., 2010b). Σε περιβάλλον με μειωμένο οξυγόνο (συσκευασία κενού ή MAP) τα τελικά προϊόντα καταβολισμού της

γλυκόζης του υποστρώματος από τα γαλακτικά βακτήρια είναι γαλακτικό και οξικό οξύ. Ωστόσο, ίχνη οξυγόνου, το οποίο περνάει με διάχυση τη μεμβράνη συσκευασίας προκαλεί σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επίσης, το οξυγόνο διεγείρει την παραγωγή ακετοΐνης, διακετυλίου και 3-μεθυλοβουτανόλης από τα βακτήρια *Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., και *B. thermosphacta* προκαλώντας οσμές τυριού (Leroy et al., 2009).

Είναι πλέον γεγονός, ότι κατά την αλλοίωση του κρέατος κυρίως λόγω της δραστηριότητας των μικροοργανισμών στο προϊόν, παράγονται μεταβολικά προϊόντα τα οποία μπορεί να είναι ενδεικτικά του είδους και του βαθμού της αλλοίωσης (Ellis & Goodacre, 2001, Nychas et al., 2008). Πρέπει να τονιστεί όμως, ότι είναι εξαιρετικά δύσκολο να προσδιοριστούν ποια από τα βακτήρια που παράγουν μεταβολικά προϊόντα σε ένα τρόφιμο είναι αυτά που προκαλέσει την αλλοίωση. Για τον σκοπό αυτό απαιτούνται εκτεταμένες αναλύσεις των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και φυσικοχημικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στο προϊόν κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Διάφοροι τύποι μικροοργανισμών που αποτελούν την αλλοιωγόνο χλωρίδα θα πρέπει να απομονωθούν από το αλλοιωμένο τρόφιμο και να εμβολιαστούν σε στείρο ιστό για τον προσδιορισμό της αλλοιωγόνου δυναμικής τους, δηλαδή της ικανότητάς τους να παράγουν ουσίες που οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη. Η παραπάνω διαδικασία αν και είναι αρκετά πολύπλοκη είναι η μόνη που μπορεί να δώσει συγκριτικά αποτελέσματα με το πραγματικό προϊόν. Η χρήση αυτών των μικροβιακών μεταβολιτών καθώς και η ποσοτικοποίηση των δακτυλικών αποτυπωμάτων τους, π.χ. με φασματοσκοπικές ή οπτικές μεθόδους θα ήταν ένα δυναμικό μέσο για την εκτίμηση της ποιότητας του κρέατος (Nychas et al., 2008).

Στη παρούσα μελέτη, στείρο χοιρινό φιλέτο συντηρήθηκε σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες (4 και 10°C) σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (20%CO₂/ 80%O₂) μετά από τον εμβολιασμό του με επιλεγμένους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (*Pseudomonas fragi*, *P. putida*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* και συνδυασμοί τους). Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του διαφορετικού είδους αλλοίωσης του κρέατος και ο προσδιορισμός των μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, με βιοχημικές μεθόδους, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί ενδεικτικοί δείκτες αλλοίωσης του κρέατος. Σε αυτό το κεφάλαιο, έγινε εκτίμηση της

ποιότητας χρησιμοποιώντας αναλυτικές μεθόδους, όπως αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.

5.2. Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

Κατά την πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκαν τα εξής στάδια:

Στάδιο 1: Μελετήθηκαν οι μικροβιολογικές, οργανοληπτικές και φυσικοχημικές μεταβολές στείρου χοιρινού φιλέτου κατά την αερόβια συντήρηση του σε θερμοκρασίες 4 και 10°C.

Στάδιο 2: Μελετήθηκαν οι μικροβιολογικές, οργανοληπτικές και φυσικοχημικές μεταβολές στείρου χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρηση του σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 4 και 10°C.

Στάδιο 3: Τα δεδομένα από το στάδιο 1 και 2 χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων ώστε να γίνει διάκριση των μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται κατά την αλλοίωση στείρου χοιρινού φιλέτου.

Μικροβιολογικές αναλύσεις και καταμέτρηση

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.1

Φυσικοχημικές αναλύσεις

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.2.

Οργανοληπτική αξιολόγηση

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.3.

Ανάλυση δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα

βλέπε Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.4.

5.3. Αποτελέσματα

5.3.1. Εκτίμηση της αλλοίωσης στείρου χοιρινού φιλέτου εμβολιασμένου με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 4 και 10°C

5.3.1.1. Εξέλιξη της μικροβιακής χλωρίδας

Στην παρούσα μελέτη, τα φιλέτα στείρου κρέατος εμβολιάστηκαν με περίπου το ίδιο αρχικό φορτίο των επιλεγμένων μικροοργανισμών (*Pseudomonas fragi*, *P. putida*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* και συνδυασμοί τους) και συσκευάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η δυναμική των πληθυσμών αυτών καθώς και η συμβολή τους στη τελική μικροβιακή χλωρίδα επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία συντήρησης και από το είδος συσκευασίας, έτσι το αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών μπορεί να εκφραστεί ως διαφορετικός ρυθμός ανάπτυξης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Τα δεδομένα αύξησης των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια συντήρησης του σε δύο συσκευασίες και δύο θερμοκρασίες που παραλήφθηκαν παρουσιάζονται στις Εικόνες 5.3.1 και 5.3.2, μαζί με τις προσαρμοσμένες καμπύλες που λήφθηκαν μετά την προσαρμογή των δεδομένων στο λογιστικό μοντέλο ανάπτυξης των Baranyi & Roberts (Εικόνες 5.3.3, 5.3.4). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.3.1, κατά την αερόβια αλλοίωση του χοιρινού φιλέτου στους 4°C η *P. fragi* είχε την υψηλότερη αύξηση (9,46 log CFU/cm²) και ακολουθούσε ο *Ln. mesenteroides* με πληθυσμό 5,2 log CFU/cm² ενώ ο τελικός πληθυσμός των *P. putida* και *L. sakei* ήταν μικρότερος κατά ένα λογάριθμο. Όσον αφορά τις συγκαλλιέργειες, οι ψευδομονάδες έφτασαν τους 9 log CFU/cm² και στις δύο περιπτώσεις ενώ ο πληθυσμός

των γαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε κοντά στους $5,5 \log \text{CFU/cm}^2$. Σε θερμοκρασία 10°C ο πληθυσμός των ψευδομονάδων ξεπέρασε τους $9 \log \text{CFU/cm}^2$ σε όλες τις περιπτώσεις, ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων παρέμεινε κοντά στους $8 \log \text{CFU/cm}^2$, σε αντίθεση με τον *L. sakei* που παρουσίασε την χαμηλότερη αύξηση ($7,2 \log \text{CFU/cm}^2$). Στη συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Εικόνα 5.3.2), οι ψευδομονάδες παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με την θερμοκρασία συντήρησης. Πιο συγκεκριμένα, σε θερμοκρασία 4°C η συγκαλλιέργεια των ψευδομονάδων στο δείγμα χοιρινού κρέατος είχε τον υψηλότερο τελικό πληθυσμό ($8,2 \log \text{CFU/cm}^2$) τουναντίον, η *P. putida* παρέμεινε σε πληθυσμό κοντά στον αρχικό εμβολιασμό ($2,8 \log \text{CFU/cm}^2$). Η ανάπτυξη της *P. fragi* καθυστέρησε και ο τελικός πληθυσμός ήταν κοντά στους 5 λογαρίθμους σε αντίθεση με τις ψευδομονάδες στην συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών, οι οποίες έφτασαν παρόμοιους πληθυσμούς με τα γαλακτικά βακτήρια της ίδιας περίπτωσης ($6,6 \log \text{CFU/cm}^2$). Οι μονοκαλλιέργειες των γαλακτικών βακτηρίων παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά. Ειδικότερα, ο *Ln. mesenteroides* έφτασε σε πολύ υψηλό τελικό πληθυσμό ενώ ο πληθυσμός των *L. sakei* κυμάνθηκε στους $6-7 \log \text{CFU/cm}^2$ όπως και στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας των γαλακτικών βακτηρίων. Στους 10°C η *P. fragi* παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση από όλες τις περιπτώσεις με τελικό πληθυσμό τους $8,9 \log \text{CFU/cm}^2$. Ακολουθούσαν όλες οι περιπτώσεις με τα γαλακτικά βακτήρια που έφτασαν σε τελικό πληθυσμό κοντά στους $7,5 \log \text{CFU/cm}^2$, ενώ η συγκαλλιέργεια των ψευδομονάδων σε δείγμα κρέατος μαζί με τα γαλακτικά βακτήρια παρουσίασε τον χαμηλότερο τελικό πληθυσμό ($4,2 \log \text{CFU/cm}^2$). Οι Πίνακες 5.3.1 και 5.3.2, συνοψίζουν την κινητική αύξησης των μικροοργανισμών, την φάση προσαρμογής, τον τελικό πληθυσμό όπως και τον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης μετά από την προσαρμογή των μικροβιολογικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi & Roberts. Από τους πίνακες φαίνεται πως η διάρκεια της φάσης προσαρμογής της *P. putida* ήταν πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της *P. fragi* σε όλες τις περιπτώσεις του πειράματος. Παράλληλα, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{max}) μεταβλήθηκε αντίστοιχα με την αύξηση της θερμοκρασίας για όλες τις περιπτώσεις. Συγχρόνως, στο αερόβιο περιβάλλον, το μ_{max} ήταν μεγαλύτερο από ότι στη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας όσον αφορά τις περιπτώσεις εμβολιασμού με τα στελέχη των ψευδομονάδων ενώ για τα γαλακτικά βακτήρια το μ_{max} ήταν μεγαλύτερο μόνο στην περίπτωση των 10°C σε συνθήκες τροποποιημένης

ατμόσφαιρας στις μονοκαλλιέργειες και στην συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηριών. Όσον αφορά τα δείγματα κρέατος που εμβολιάστηκαν με τα γαλακτικά βακτήρια, η μεγαλύτερη διάρκεια φάσης προσαρμογής παρατηρήθηκε στους 4°C στα δείγματα που είχαν συσκευαστεί σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Αντιθέτως, στους 10°C και στις δύο συσκευασίες, τα γαλακτικά βακτήρια εμφάνισαν μικρότερη φάση προσαρμογής ενώ στο κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών στην αερόβια συσκευασία, δεν παρατηρήθηκε καθόλου. Όσον αφορά στο στείρο μη εμβολιασμένο φιλέτο κρέατος, δεν απαριθμήθηκαν καθόλου μικροοργανισμοί καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης του σε όλες τις περιπτώσεις θερμοκρασίας και συσκευασίας.

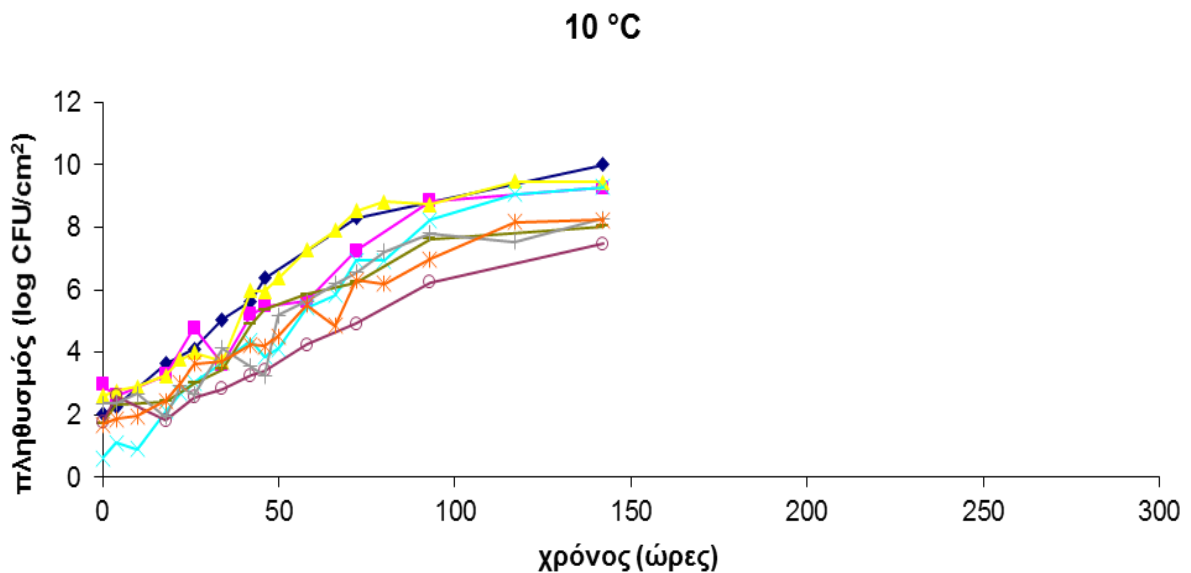
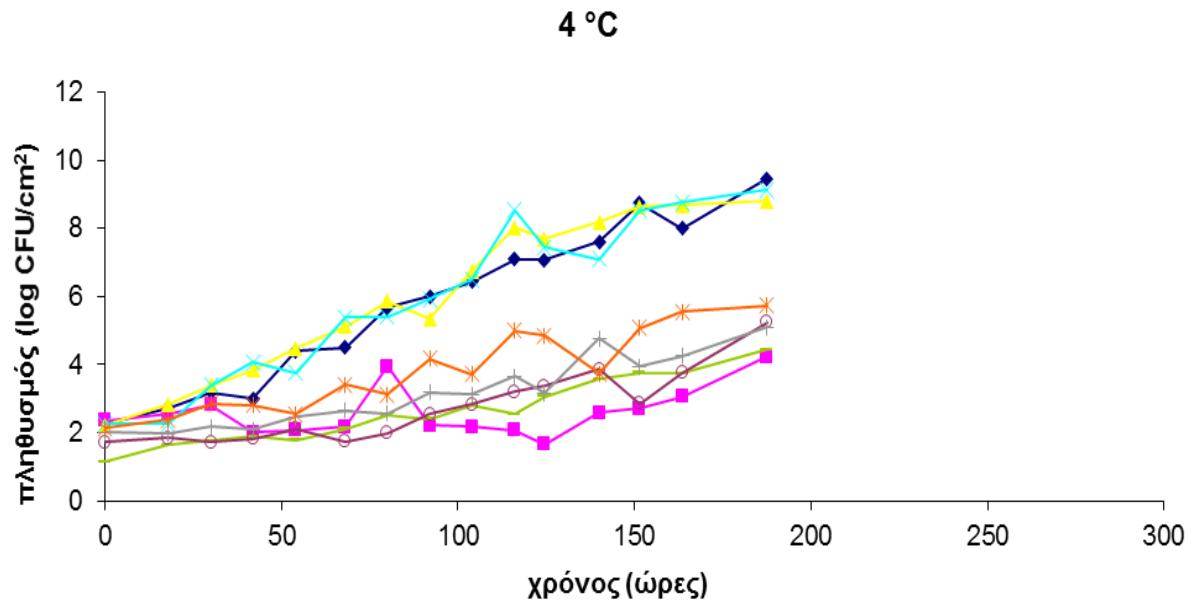
Αντίθετα αποτελέσματα πήραν οι Jackson et al., (1992) μελετώντας τη συμπεριφορά της μικροχλωρίδας σε βόειο κρέας που είχε συσκευαστεί με αντίστοιχη σύσταση αερίων, όπου βρήκαν πως η *P. putida* ήταν η κυρίαρχη μικροχλωρίδα στους 4°C. Στα δείγματα που είχαν συσκευαστεί υπό κενό ή με διαφορετικές αναλογίες αερίων στην ίδια θερμοκρασία επικρατούσαν τα γαλακτικά βακτήρια και ιδιαίτερα οι *L. plantarum* και *Ln. mesenteroides*. Οι Ercolini et al. (2009), μελετώντας τη συμπεριφορά 3 αλλοιογόνων μικροοργανισμών (*Pseudomonas fragi*, *Serratia proteamaculans*, *Carnobacterium maltaromaticum*) σε τεχνητά επιμολυσμένο βόειο κρέας το οποίο είχε συσκευαστεί υπό κενό στους 7°C αναφέρουν πως ο μικροοργανισμός *P. fragi* αυξήθηκε κατά 1 λογάριθμο στη μονοκαλλιέργεια και στην μικτή καλλιέργεια των 3 μικροοργανισμών ενώ ο μικροοργανισμός *C. maltaromaticum* ήταν ο κυρίαρχος παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη αύξηση. Μία αντίστοιχη μελέτη σε στείρο φιλέτο βόειου κρέατος (Tsigarida & Nychas, 2001) μελέτησε ξεχωριστά την εξέλιξη δύο αλλοιογόνων μικροοργανισμών (*Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp.) σε δυο συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (100% CO₂ με υψηλή και χαμηλή διαπερατότητα στο O₂) και αερόβια σε θερμοκρασία 0 και 10°C. Ο πληθυσμός για το βακτήριο *Pseudomonas* sp., βρέθηκε να είναι από 9,5 έως 10 log CFU/g, ενώ για το βακτήριο *Lactobacillus* sp., ο πληθυσμός ήταν περίπου 7,5 log CFU/g κατά την συσκευασία με την υψηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο και την αερόβια συσκευασία αντίστοιχα στις δύο θερμοκρασίες που εξετάστηκαν αποτελέσματα που έρχονται σε συμφωνία με της παρούσας μελέτης όσον αφορά τις μονοκαλλιέργειες των εξεταζόμενων μικροοργανισμών. Στην συσκευασία με χαμηλή διαπερατότητα στο

οξυγόνο ο πληθυσμός του *Lactobacillus* sp. βρέθηκε 7 log CFU/g ενώ η ψευδομονάδα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

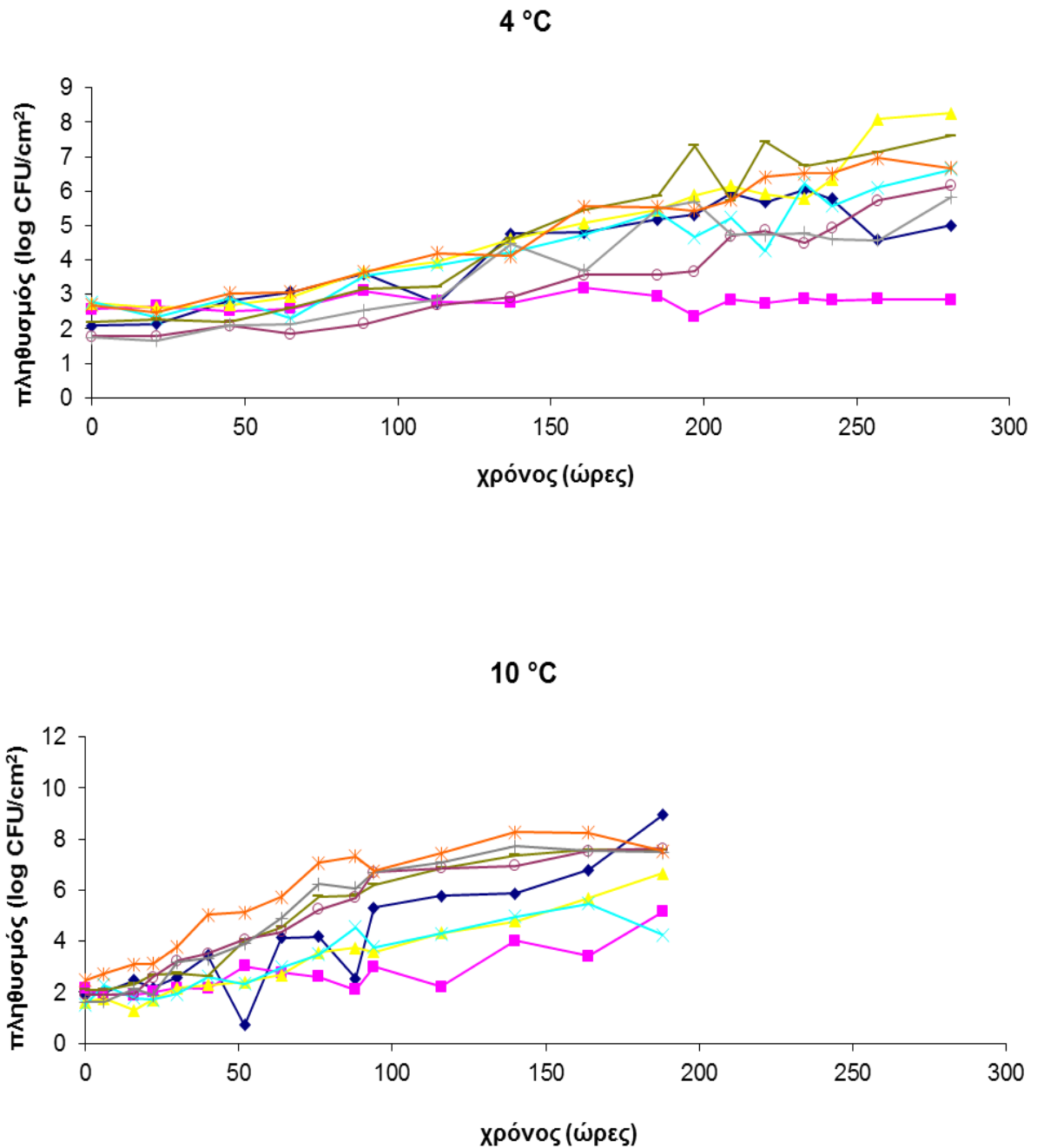
5.3.1.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση του στείρου μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου χοιρινού φιλέτου

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το τέλος της διάρκειας ζωής του κρέατος οφείλεται στην παραγωγή οσμών και γεύσεων αλλοίωσης ως συνέπεια της μεταβολικής δραστηριότητας των βακτηρίων, έγινε οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων κρέατος ώστε να υπολογιστεί ποιοτικά ο χρόνος μέχρι την αλλοίωση του κρέατος στις διάφορες περιπτώσεις του στείρου και εμβολιασμένου κρέατος που εξετάστηκαν. Ο χρόνος που προσδιορίστηκε από την ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης για να χαρακτηρίσει ένα δείγμα κρέατος ως αλλοιωμένο διέφερε για κάθε θερμοκρασία, συσκευασία και μικροοργανισμό. Ειδικότερα, η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε ένα δείγμα ως αλλοιωμένο για την αερόβια συντήρηση στους 4°C γρηγορότερα για τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με την *P. fragi* από ότι με την *P. putida*. Αναλυτικότερα, το κρέας που είχε εμβολιαστεί με τη μονοκαλλιέργεια της *P. fragi* και με την συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών χαρακτηρίστηκε ως σχετικά φρέσκο μετά από 54 ώρες, ενώ για την συγκαλλιέργεια των δύο ψευδομονάδων και την περίπτωση της *P. putida*, ο αντίστοιχος χρόνος ήταν 68 ώρες (Πίνακας 5.3.3). Οι αντίστοιχες χρονικές περιόδους για τον χαρακτηρισμό του κρέατος ως αλλοιωμένο ήταν 104 ώρες για τις δύο περιπτώσεις της συγκαλλιέργειας (*P. fragi* με *P. putida* και *P. fragi*, *P. putida* μαζί με τα γαλακτικά βακτήρια), 116 ώρες για την *P. fragi* και 140 ώρες για την *P. putida*. Οι αντίστοιχοι χρόνοι αλλοίωσης για τα γαλακτικά βακτήρια ήταν 124,5 ώρες για τον *L. sakei*, και 140 ώρες για τον *Ln. mesenteroides* και την συγκαλλιέργεια αντίστοιχα. Το στείρο μη εμβολιασμένο κρέας απορρίφθηκε οργανοληπτικά μετά από 140 ώρες συντήρησης. Στους 10°C, ο χρόνος για να κατηγοριοποιηθεί ένα δείγμα ως αλλοιωμένο ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο των 4°C, ενώ ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ήταν υψηλότερος. Ειδικότερα, για τις περιπτώσεις της *P. fragi* και της συγκαλλιέργειας των ψευδομονάδων, ο πληθυσμός τους κυμαινόταν στους 8,3 log CFU/cm² όταν τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως αλλοιωμένα,

μετά από 72 ώρες συντήρησης. Στα εμβολιασμένα δείγματα με *P. putida*, με τη συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων και με τη συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών, χαρακτηρίστηκαν ως αλλοιωμένα μετά από 80 ώρες συντήρησης ενώ οι αντίστοιχοι πληθυσμοί ήταν $8,40 \log \text{CFU/cm}^2$, $7,23 \log \text{CFU/cm}^2$ και στην συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών ήταν 6,94 για τις ψευδομονάδες και $6,19 \log \text{CFU/cm}^2$ για τα γαλακτικά βακτήρια. Κατά την συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Πίνακας 5.3.4) το στείρο κρέας χαρακτηρίστηκε ως αλλοιωμένο μετά από 242 και 140 ώρες στις θερμοκρασίες 4 και 10°C αντίστοιχα. Τα δείγματα κρέατος με τους μικροοργανισμούς *P. fragi*, *P. fragi* μαζί με *P. putida*, *Ln. mesenteroides*, *P. fragi*, *P. putida*, *L. sakei* και *Ln. mesenteroides*, χαρακτηρίστηκαν ως αλλοιωμένα μετά από 209 ώρες συντήρησης στους 4°C και με πληθυσμούς που κυμαίνονταν από $5,70 - 6,15 \log \text{CFU/cm}^2$. Το εμβολιασμένο κρέας με *L. sakei* χαρακτηρίστηκε ως αλλοιωμένο μετά από 220 ώρες ενώ στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας των γαλακτικών βακτηρίων η αντίστοιχη τιμή ήταν 233 ώρες. Στη περίπτωση της *P. putida* ο χρόνος που χαρακτηρίστηκε το δείγμα ως αλλοιωμένο ήταν 197 ώρες. Στις αυτές τις περιπτώσεις, ο πληθυσμός των βακτηρίων κυμάνθηκε σε χαμηλότερη τιμή ($2,73 \log \text{CFU/cm}^2$ για την *P. putida*, $4,78 \log \text{CFU/cm}^2$ για τον *L. sakei* και $4,85 \log \text{CFU/cm}^2$ για την συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων). Τέλος, σε θερμοκρασία 10°C τη μικρότερη διάρκεια ζωής εμφάνισε το δείγμα που ήταν εμβολιασμένο με το κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών μετά από 88 ώρες συντήρησης. Στη προκειμένη περίπτωση, ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων ήταν $7,33 \log \text{CFU/cm}^2$ και των ψευδομονάδων $4,32 \log \text{CFU/cm}^2$.



Εικόνα 5.3.1: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης γλωρίδας σε στείρο ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10°C σε αερόβιες συνθήκες. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, ×: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες



Εικόνα 5.3.2: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης χλωρίδας σε στείρο ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, ×: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες

Πίνακας 5.3.1: Κινητικοί παράμετροι της αύξησης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες 4 και 10°C όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο των Baranyi & Roberts

Μικροοργανισμοί	Θ (°C)	Lag phase ^δ (h)	y_0^a (log ₁₀ CFU/cm ²)	y_{end}^b (log ₁₀ CFU/cm ²)	μ_{max} (h ⁻¹) ^γ	R ²	
<i>P. fragi</i>	4	5,54	2,07	9,66	0,100	0,971	
<i>P. putida</i>		148,25	2,38	- ^ε	0,108	-	
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>		12,52	2,42	8,44	0,108	0,970	
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών		-	2,03	-	0,095	0,908	
<i>Ln mesenteroides</i>		67,85	1,75	-	0,057	0,848	
<i>L. sakei</i>		41,29	1,47	-	0,045	0,951	
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>		51,82	2,12	-	0,049	0,949	
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών		77,86	2,74	5,13	0,137	0,811	
<i>P. fragi</i>		10	0,56	1,97	10,19	0,210	0,996
<i>P. putida</i>			16,11	2,87	9,33	0,181	0,945
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>	17,03		2,69	9,22	0,254	0,982	
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών	0,14		0,61	9,35	0,190	0,984	
<i>Ln mesenteroides</i>	5,63		1,78	7,97	0,171	0,963	
<i>L. sakei</i>	23,40		2,00	7,50	0,142	0,974	
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	26,78		2,36	7,91	0,221	0,951	
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών	-		1,63	8,37	0,137	0,976	

^a: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός

^b: Τελικός μικροβιακός πληθυσμός

^γ: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

^δ: Διάρκεια φάσης προσαρμογής

^ε: δεν υπολογίστηκε

Πίνακας 5.3.2: Κινητικοί παράμετροι της αύξησης των διάφορων ομάδων μικροοργανισμών του χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε θερμοκρασίες 4 και 10°C όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο των Baranyi & Roberts.

Μικροοργανισμοί	Θ (°C)	Lag phase ^δ (h)	y_0^a (log ₁₀ CFU/cm ²)	y_{end}^b (log ₁₀ CFU/cm ²)	μ_{max} (h ⁻¹) ^γ	R ²	
<i>P. fragi</i>	4	49,27	2,25	5,41	0,055	0,827	
<i>P. putida</i>		-ε	2,52	2,83	0,008	-	
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>		82,35	2,64	-	0,065	0,961	
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών		32,72	2,51	-	0,036	0,932	
<i>Ln mesenteroides</i>		73,72	2,22	7,18	0,082	0,947	
<i>L. sakei</i>		96,99	1,88	-	0,051	0,962	
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>		93,38	2,00	5,35	0,095	0,827	
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών		54,20	2,68	6,58	0,052	0,942	
<i>P. fragi</i>		10	47,37	2,11	-	0,104	0,782
<i>P. putida</i>			109,44	2,35	-	0,074	0,674
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>			4,54	1,11	-	0,064	0,915
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών			24,78	1,68	5,39	0,082	0,850
<i>Ln mesenteroides</i>			22,36	2,09	7,46	0,136	0,982
<i>L. sakei</i>			7,46	1,73	7,40	0,119	0,979
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	9,64		1,34	7,73	0,155	0,981	
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών	6,25		2,51	7,85	0,139	0,960	

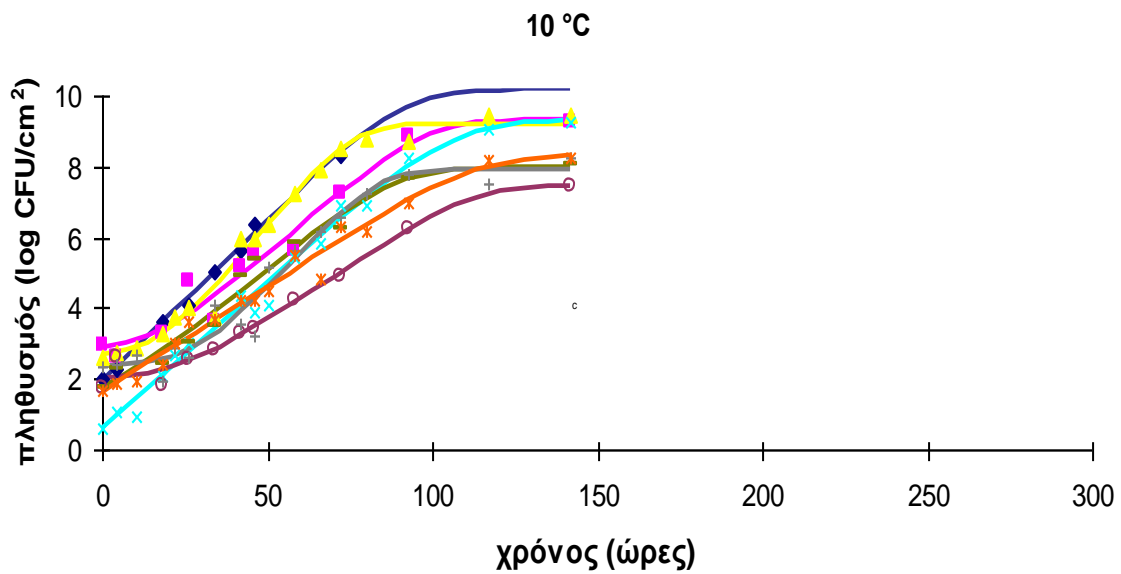
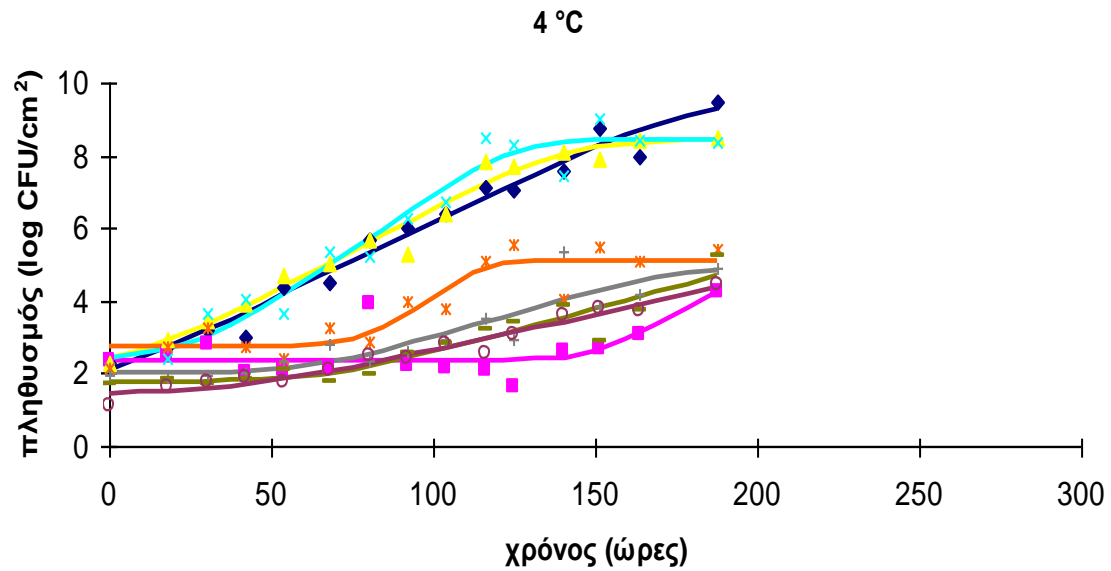
^a: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός

^b: Τελικός μικροβιακός πληθυσμός

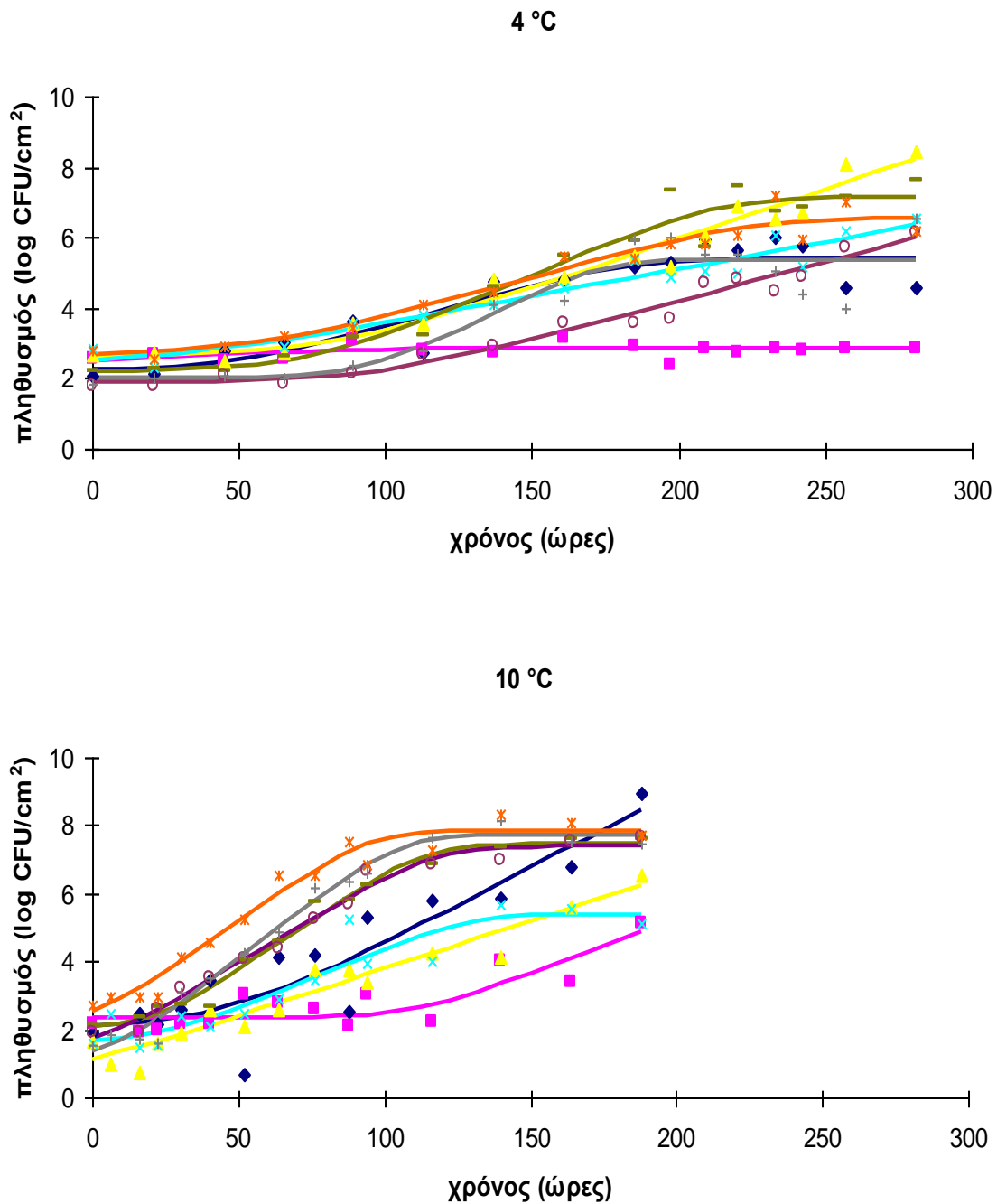
^γ: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

^δ: Διάρκεια φάσης προσαρμογής

^ε: δεν υπολογίστηκε



Εικόνα 5.3.3: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης γλωρίδας σε στείρο ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10°C σε αερόβιες συνθήκες. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης μετά από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, ×: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες



Εικόνα 5.3.4: Ανάπτυξη της εμβολιασμένης γλωρίδας σε στειρό ιστό χοιρινού φιλέτου κατά την συντήρησή στους 4 και 10°C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τιμές από δύο επαναλήψεις. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ανάπτυξης μετά από προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi & Roberts. ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, ×: πληθυσμός των *P. fragi* και *P. putida* στο ίδιο δείγμα με τα γαλακτικά βακτήρια, - *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, +: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ★: πληθυσμός των *L. sakei* και *Ln mesenteroides* στο ίδιο δείγμα με τις ψευδομονάδες

Πίνακας 5.3.3: Οργανοληπτική αξιολόγηση του μη εμβολιασμένου και του εμβολιασμένου στείρου κρέατος με επιλεγμένους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες

Αέρας	Εμβόλιο (log CFU/cm ²)	4°C		10°C		
		Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Εμβόλιο (log CFU/cm ²)	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο
Στείρο μη εμβολιασμένο φiléτο	- ^α	-	-	-	-	-
Χρόνος (ώρες)	0	80 ^β	140 ^γ	0	58	117
<i>P. fragi</i>	2,28	4,40	7,09	2,03	5,63	8,31
Χρόνος (ώρες)	0	54	116	0	42	72
<i>P. putida</i>	2,35	2,16	2,58	2,97	5,20	8,40
Χρόνος (ώρες)	0	68	140	0	42	80
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>	2,22	5,11	6,74	2,61	4,00	8,52
Χρόνος (ώρες)	0	68	104	0	26	72
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών	2,25	3,76	6,49	0,61	2,70	6,94
Χρόνος (ώρες)	0	54	104	0	22	80
<i>Ln mesenteroides</i>	1,72	2,54	3,36	1,73	5,36	7,62
Χρόνος (ώρες)	0	92	124,5	0	46	93
<i>L. sakei</i>	1,14	2,40	3,57	1,74	3,26	6,23
Χρόνος (ώρες)	0	92	140	0	42	93
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	2,02	2,46	4,76	2,36	4,12	7,23
Χρόνος (ώρες)	0	54	140	0	34	80
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών	2,13	2,54	3,73	1,69	3,01	6,19
Χρόνος (ώρες)	0	54	104	0	22	80

^α δεν υπήρχε μικροβιακή χλωρίδα^β ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως σχετικά φρέσκο^γ ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως απορριπτέο

Πίνακας 5.3.4: Οργανοληπτική αξιολόγηση του μη εμβολιασμένου και του εμβολιασμένου στείρου κρέατος με επιλεγμένους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα

MAP	4°C			10°C		
	Εμβόλιο (log CFU/cm ²)	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο	Εμβόλιο (log CFU/cm ²)	Σχετικά φρέσκο	Αλλοιωμένο
Στείρο μη εμβολιασμένο φιλέτο	- ^α	-	-	-	-	-
Χρόνος (ώρες)	0	161 ^β	242 ^γ	0	76	140
<i>P. fragi</i>	2,08	4,08	5,93	1,89	4,14	5,78
Χρόνος (ώρες)	0	161	209	0	64	116
<i>P. putida</i>	2,56	2,94	2,73	2,14	2,61	4,00
Χρόνος (ώρες)	0	185	197	0	76	140
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>	2,74	4,61	6,15	1,61	2,68	4,32
Χρόνος (ώρες)	0	137	209	0	64	116
<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών	2,78	3,85	5,23	1,48	2,32	4,55
Χρόνος (ώρες)	0	113	209	0	52	88
<i>Ln mesenteroides</i>	2,19	4,67	5,72	2,09	4,54	6,86
Χρόνος (ώρες)	0	137	209	0	64	116
<i>L. sakei</i>	1,78	3,56	4,85	1,90	4,06	6,69
Χρόνος (ώρες)	0	161	220	0	52	94
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	1,73	3,69	4,78	1,62	4,91	6,76
Χρόνος (ώρες)	0	161	233	0	64	94
<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i> στο cocktail των 4 μικροοργανισμών	2,68	4,20	5,74	2,46	5,12	7,33
Χρόνος (ώρες)	0	113	209	0	52	88

^α δεν υπήρχε μικροβιακή χλωρίδα

^β ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως σχετικά φρέσκο

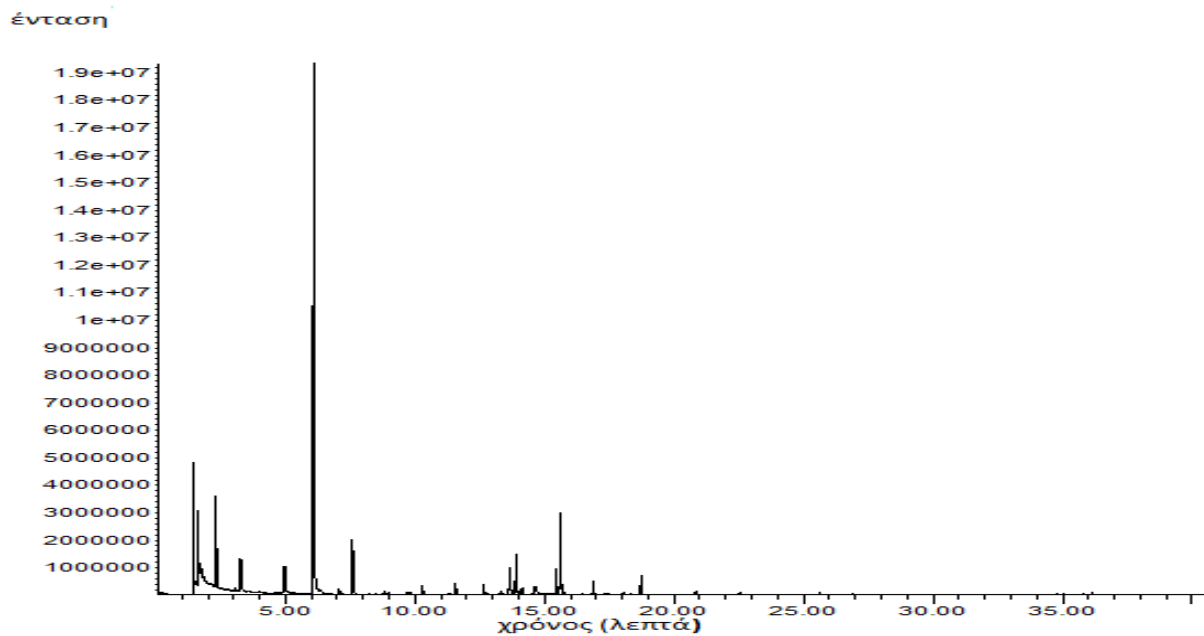
^γ ο χρόνος κατά τον οποίο η ομάδα οργανοληπτικής αξιολόγησης έκρινε το δείγμα ως απορριπτέο

5.3.2. Ανάλυση στείρου χοιρινού φιλέτου με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης HS/SPME

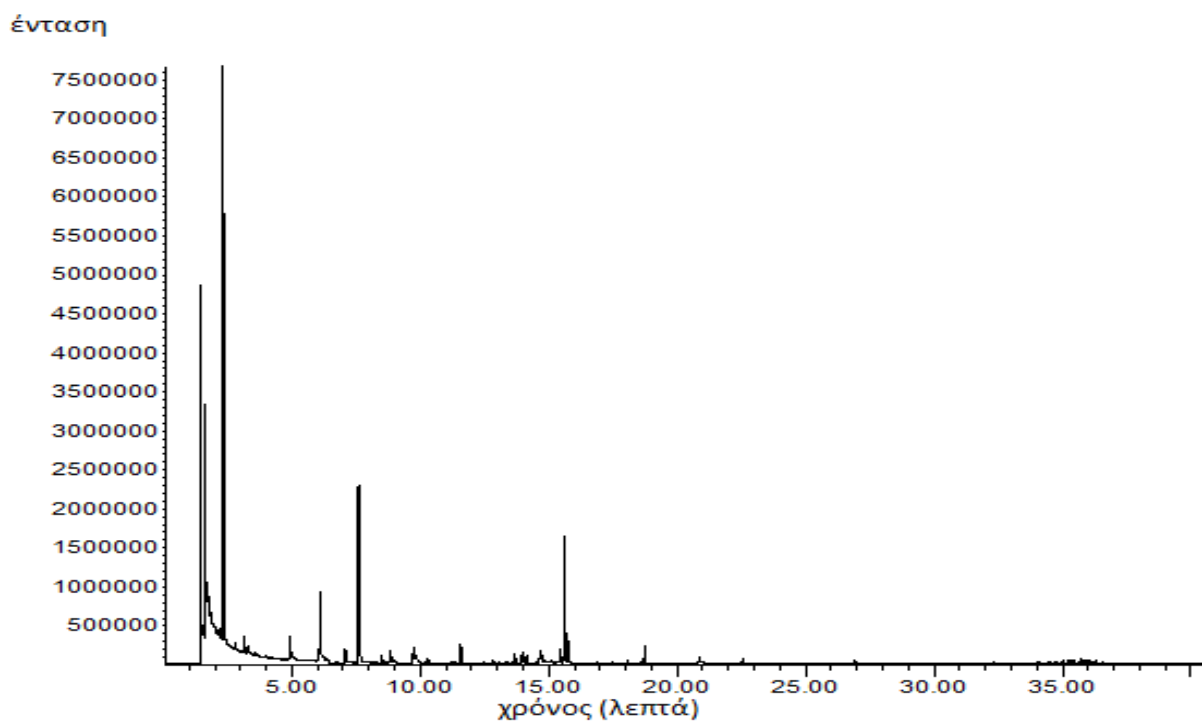
Τα δείγματα που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία φασματοσκοπία μάζας συμπεριλάμβαναν 101 δείγματα μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου με επιλεγμένους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες και 116 δείγματα μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κατά τη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

5.3.2.1. Ανάλυση πτητικών ενώσεων

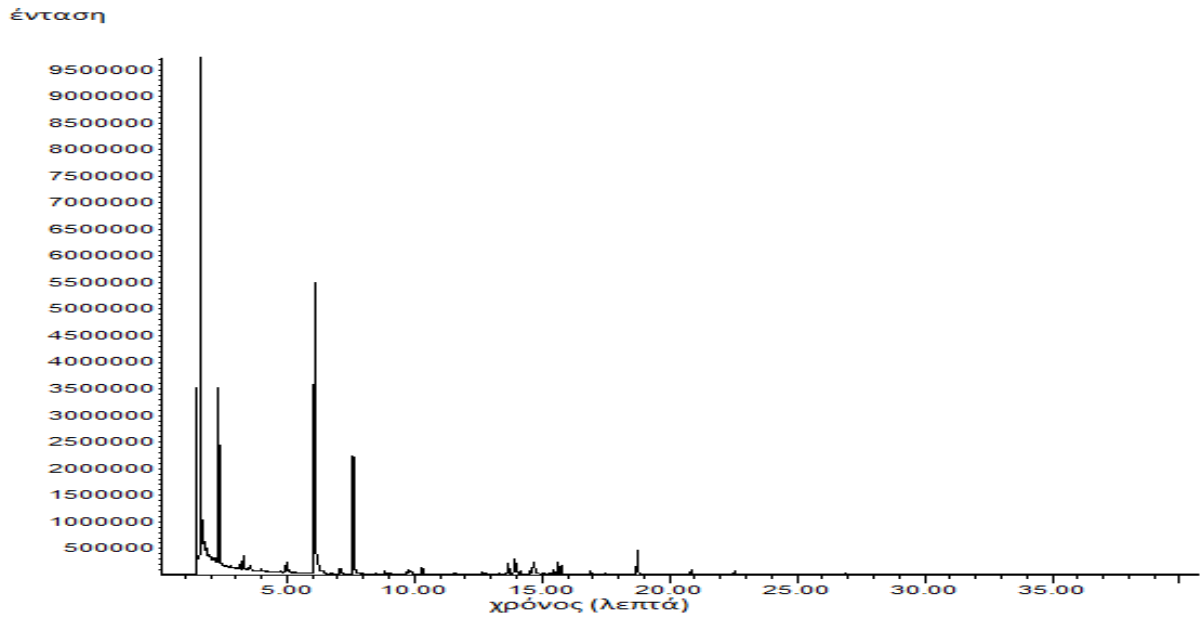
Η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας, διευκόλυνε την διερεύνηση των πτητικών ενώσεων που είναι παρούσες κατά την συντήρηση του μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας. Οι Πίνακες 5.3.5 έως 5.3.8. δείχνουν τις ουσίες (192 ουσίες) που ανιχνεύθηκαν στο μη εμβολιασμένο και στο εμβολιασμένο με επιλεγμένους μικροοργανισμούς φιλέτο στις δύο θερμοκρασίες και στις δύο συσκευασίες. Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, βρέθηκαν να είναι εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία ή/και τη συσκευασία. Οι Εικόνες 5.3.5 έως 5.3.8 αντιπροσωπεύουν τυπικά φασματογραφήματα. Μερικές από τις αναγνωρισμένες ενώσεις έχουν αναφερθεί στο παρελθόν να είναι παρούσες κατά την αποθήκευση του κρέατος και προϊόντων κρέατος σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας (Dainty et al., 1989, Calkins & Hodgen., 2007, Edwards et al., 1987, Ercolini et al., 2009, Insausti et al., 2002, Jackson et al., 1992, Leroy et al., 2009; Stutz et al., 1991, Tsigarida & Nychas, 2001). Οι κύριες ομάδες των πτητικών ενώσεων που έχουν βρεθεί κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης του κρέατος είναι οι αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες, εστέρες και οι ενώσεις του θείου (Ercolini et al., 2009, Leroy et al., 2009, Nychas et al., 2007).



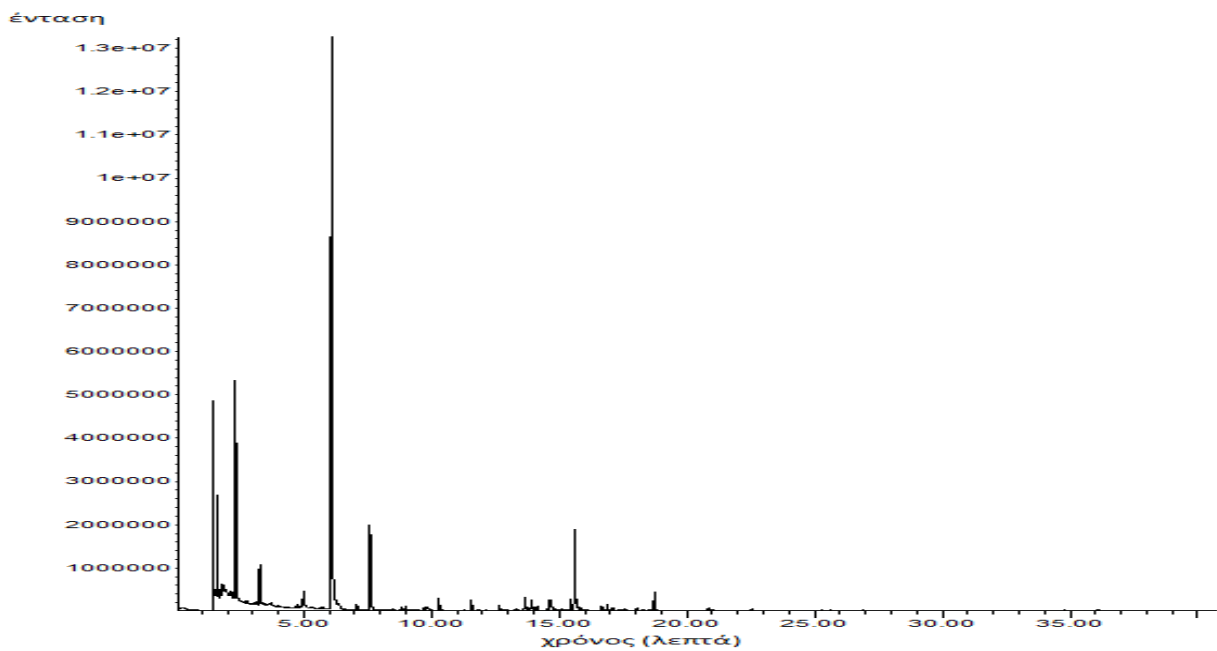
Εικόνα 5.3.5: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση στείρου φιλέτου εμβολιασμένου με *L. sakei* και *Ln mesenteroides* σε θερμοκρασία 10°C την αρχή της αλλοίωσης



Εικόνα 5.3.6: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση στείρου φιλέτου εμβολιασμένου με *P. fragi* σε θερμοκρασία 4°C μετά από 116 ώρες συντήρησης



Εικόνα 5.3.7: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αερόβια αλλοίωση στείρου φιλέτου σε θερμοκρασία 4°C μετά από 80 ώρες συντήρησης



Εικόνα 5.3.8: Τυπικό χρωματογράφημα του μεταβολικού προφίλ των πτητικών ουσιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά την αλλοίωση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στείρου φιλέτου εμβολιασμένου με *P. fragi*, *P. putida*, *L. sakei* και *Ln mesenteroides* σε θερμοκρασία 10°C μετά από 6 ώρες συντήρησης

Πίνακας 5.3.5: Πηητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος

Αέρας 4°C	Ιόν στόχος (m/z) ^a	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	LRI ^b	Στείρο κρέας	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>	<i>Ln mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	coctail των 4 μικροοργανισμών
Οξέα											
Οξικό οξύ	60	2.321	624	-	-	-	-	-	-	-	-
Εξαδεκανοϊκό οξύ	73	35.09	1930	-	-	+	-	-	-	-	-
Αλκοόλες											
Βουταν-1-όλη	56	2.698	658	+	+	+	+	+	+	+	+
Εννεαν-1-όλη	56	20.438	1172	-	-	-	-	+	-	-	+
Οκταν-1-όλη	56	16.771	1073	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-1-εν-3-όλη	57	13.141	980	+	+	+	+	+	+	+	+
Πενταν-1-όλη	42	4.777	759	+	+	+	+	+	+	+	+
Πεντ-1-εν-3-όλη	57	2.907	675	+	+	+	+	+	+	+	+
2,3-βουτανεν-2-διόλη	45	5.745	794	-	-	-	-	-	-	-	-
2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	59	16.8	1074	+	+	+	+	+	+	+	+
Βουταν-2-όλη	45	2.093	603	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοεξαν-1-όλη	57	15.108	1030	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξαν-2-όλη	45	4.532	753	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοβουταν-1-όλη	56	3.974	729	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-2-εν-1-όλη	57	16.65	1070	+	+	+	+	+	+	+	+
2-φαινυλαιθανόλη	91	18.267	1112	-	-	-	-	-	+	-	-
1-βουτοξυπροπαν-2-όλη	57	11.549	943	-	+	+	+	-	+	-	+
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	56	3.82	725	+	+	+	+	+	+	+	+
Επταν-3-όλη	59	9.698	898	-	+	+	+	+	+	-	+
3-μεθυλοβουταν-1-όλη	55	3.886	725	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκταν-3-όλη	59	13.801	996	-	-	-	-	-	-	-	-
4-μεθυλοπενταν-1-όλη	56	7.289	837	+	+	+	+	+	+	+	+

Αιθανόλη	45	1.554	477	+	+	+	+	+	+	+	+
Επτανόλη	70	12.809	973	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξανόλη	56	8.614	870	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισοβουτανόλη	31	2.295	622	+	+	+	+	+	+	+	+
Λαυρική αλκοόλη	55	30.253	1476	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπανόλη	31	1.859	555	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρβονυλικές ενώσεις											
<i>Αλδεΐδες</i>											
ακεταλδεΐδη	29	1.451	457	+	+	+	+	+	+	+	+
βενζαλδεΐδη	106	12.188	955	+	+	+	+	+	+	+	+
φαινυλακεταλδεΐδη	91	15.605	1043	-	-	-	-	+	-	-	-
2-μεθυλοβουτανάλη	57	2.691	657	+	+	+	+	+	+	+	+
3-μεθυλοβουτανάλη	58	2.57	647	+	+	+	+	+	+	+	+
πεντανάλη	58	3.127	697	+	+	+	+	+	+	+	+
εξανάλη	56	5.873	802	+	+	+	+	+	+	+	+
τρανς-εξαν-2-άλη	69	7.934	854	-	-	-	-	-	-	-	-
τρανς-οκτεν-2-άλη	70	16.258	1060	+	+	+	+	+	+	+	+
επτανάλη	70	9.86	902	+	+	+	+	+	+	+	+
επτεν-2-άλη (E)	83	12.125	954	+	+	+	+	+	+	+	+
επταν-2,4-διενάλη	81	13.841	998	-	-	-	-	+	-	+	-
οκτανάλη	43	14.091	1003	+	+	+	+	+	+	+	+
εννεαν-2,4,διάλη E,E	81	21.908	1214	+	+	-	+	+	+	+	-
εννεανάλη	57	17.981	1105	+	+	+	+	+	+	+	+
εντεκανάλη	57	25.105	1309	-	-	-	-	-	+	-	+
δεκανάλη	57	21.648	1206	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκαν-2,4-διενάλη	81	25.344	1315	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκεν-2-άλη E	55	23.543	1262	-	-	-	-	+	+	-	-
Ισομερές της δεκαν-2,4-διενάλης	81	24.614	1293	+	+	-	-	+	-	+	+

δωδεκανάλη	57	28.31	1411	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Κετόνες</i>											
Βουταν-2-όνη	43	2.074	601	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετόνη	58	1.628	498	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετοφαινόνη	105	16.452	1065	+	+	+	+	+	+	+	+
1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη	84	24.313	1285	-	-	-	+	-	-	-	-
ακετοΐνη (3-υδροξυβουταν-2-όνη)	45	3.43	715	+	+	+	+	+	+	+	+
διακετύλιο (βουτανο-2,3-διόνη)	43	2.03	594	+	+	+	+	+	+	+	+
πενταν-2-όνη	43	3.002	686	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη	84	11.359	938	-	-	-	-	-	-	-	-
πενταν-2,3-διόνη	100	3.117	691	+	+	+	+	+	+	+	+
εξαν-2-όνη	43	5.532	792	+	+	+	+	+	+	+	-
επταν-2-όνη	43	9.43	888	+	+	+	+	+	+	+	+
οκταν-2-όνη	58	13.625	993	+	+	+	+	+	+	+	+
οκταν-3-όνη	57	13.412	988	+	+	-	+	-	-	+	-
οκταν-2,5-διόνη	43	13.371	987	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτ-1-εν-3-όνη	70	13.097	980	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτ-3-εν-2-όνη	55	15.487	1040	+	+	+	-	+	+	+	-
εννεαν-2-όνη	58	17.566	1094	+	+	+	+	+	+	+	+
5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη	43	8.887	878	-	-	-	-	-	-	-	-
6-μεθυλοεπταν-2-όνη	43	11.047	931	+	+	+	+	+	-	+	+
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	108	13.474	989	+	+	+	+	+	+	+	+
Ακετόνη του γερανυλεστέρα	43	29.637	1455	+	+	+	+	+	+	+	+
Εστέρες											
οξικός βουτυλεστέρας	43	6.49	818	+	+	+	+	+	+	+	+
επτανοϊκός αλλυλεστέρας	99	17.215	1085	-	-	-	-	-	-	-	-
άγνωστος εστέρας	99	17.666	1096	-	-	-	-	-	-	-	-
αιθυλ-2-βουτυλαιθέρας	69	7.641	847	-	-	-	-	+	-	-	-

αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	57	7.821	852	+	+	-	+	+	-	-	+
αιθυλ-3-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	88	7.956	855	+	-	+	+	+	-	-	+
οξικός αιθυλεστέρας	61	2.203	613	+	+	+	+	+	+	+	+
βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	5.949	805	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	88	27.874	1396	-	+	-	-	-	-	-	-
επτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	17.812	1100	-	-	-	-	-	-	-	-
εξανοϊκός αιθυλεστέρας	88	14.01	1001	+	+	+	+	+	+	+	+
ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας	71	4.576	754	+	+	+	+	+	+	+	+
γαλακτικός αιθυλεστέρας	45	6.405	815	+	+	+	+	+	+	+	-
οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	21.38	1198	+	+	+	+	+	+	+	+
πεντανοϊκός αιθυλεστέρας	88	9.951	904	+	+	-	+	+	+	+	-
προπανοϊκός αιθυλεστέρας	57	3.416	710	+	+	+	+	+	+	+	+
οξικός εξυλεστέρας	43	14.545	1016	-	+	+	-	-	-	-	-
οξικός ισοαμυλεστέρας	70	8.939	879	+	+	+	+	+	+	+	+
οξικός μεθυλεστέρας	74	1.752	527	+	+	+	+	+	+	+	+
βουτανοϊκός μεθυλεστέρας	74	3.652	719	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοπεντανοϊκός αιθυλεστέρας	102	11.528	942	-	+	+	-	-	-	-	-
οξικός αμυλεστέρας	43	10.519	918	-	-	-	-	-	-	-	-
οξικός τερπινυλεστέρας	93	26.462	1352	-	-	-	-	-	-	-	-
Εξανοϊκός μεθυλεστέρας	74	10.897	927	+	+	+	+	+	+	+	+
Υδρογονάνθρακες											
Βενζόλιο	78	2.67	655	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του τριμεθυλοβενζολίου	105	14.732	1021	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπυλοβενζόλιο	91	11.982	953	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του τριμεθυλοβενζολίου	105	13.588	992	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθυλοβενζόλιο	91	8.125	858	+	+	+	+	+	+	+	+
Ναφθαλένιο	128	20.731	1180	+	+	+	+	+	+	+	+
Στυρένιο	104	9.356	888	+	+	+	+	+	+	+	+

Τολουόλιο	91	4.712	757	+	+	+	+	+	+	+	+
Ξυλ-2-ένιο	91	9.438	891	+	+	+	+	+	+	+	+
Ξυλ-1-ένιο	91	8.448	864	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκ-1,4 διένιο	67	17.358	1088	-	-	-	-	-	-	-	+
Επτ-1-ένιο	56	3.04	689	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο	55	17.505	1092	-	+	+	+	+	+	-	+
Οκτ-2-ένιο, (Z)	112	6.365	815	-	-	-	-	-	-	-	-
3a,4,5,6,7,7a-εξαϋδρο-4,7- μεθανοινδένιο	66	16.419	1064	+	+	+	+	+	+	+	+
4,7-μεθανο-1H- τετραϋδροινδένιο	95	17.383	1089	+	+	+	+	+	+	+	-
Οκτ-4-ένιο, (E)	112	6.086	808	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	+	+	+	+	+	+	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	14.897	1025	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	15.257	1034	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	15.851	1050	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.027	1054	+	+	-	+	+	-	+	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.104	1056	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.441	1065	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	13.464	989	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.254	1060	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	16.888	1076	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.961	1078	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	85	17.578	1094	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	85	2.691	657	-	-	-	-	-	-	+	-
Ισομερές αλκανίου	71	2.732	661	-	-	-	-	-	-	+	-
Ισομερές αλκανίου	55	4.524	753	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	85	4.92	768	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	55	9.042	882	-	-	-	-	-	-	-	-

Ισομερές αλκανίου	70	9.298	888	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	70	5.466	789	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	70	5.731	791	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	57	13.948	1000	+	+	+	+	+	+	+	+
C13	57	24.846	1300	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	57	27.984	1400	+	+	+	+	+	+	+	+
C15	57	30.965	1500	+	+	+	+	+	+	+	+
C16	57	32.747	1600	+	+	+	+	+	+	+	+
C17	57	33.638	1700	+	+	+	+	+	+	+	+
C18	57	34.268	1800	+	+	+	+	+	+	+	+
C5	72	1.65	500	+	+	+	+	+	+	+	+
C6	56	2.06	600	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	71	3.164	700	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	85	5.823	800	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	57	9.797	900	+	+	+	+	+	+	+	+
Μεθυλοκυκλοεξάνιο	83	3.6	717	+	+	+	+	+	+	+	+
Κυκλοεξάνιο	84	2.647	654	+	-	-	-	-	-	-	+
1,2, διμεθυλοκυκλοπεντάνιο	98	3.018	687	-	-	-	-	-	-	-	-
Αιθυλοκυκλοπεντάνιο	69	3.839	726	-	-	-	-	-	-	-	-
Δωδεκένιο	57	21.472	1200	+	+	+	+	+	+	+	+
3μεθυλοεξάνιο	71	2.787	666	-	-	-	-	-	-	+	-
Τετραχλωροαιθυλένιο	166	6.134	810	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο (C11)	57	17.849	1100	+	+	+	+	+	+	+	+
Ινδάνιο	117	15.198	1033	+	+	+	+	+	+	+	+
Διάφορες ουσίες											
Διθειάνθρακας	76	1.785	538	+	+	+	+	+	+	+	+
Διμέθυλο σουλφίδιο	62	1.712	520	+	+	+	+	+	+	+	+
1,2-διαιθόξυαιθάνιο	74	1.661	507	+	+	+	+	+	+	+	+
2-n- βουτυλοφουράνιο	81	9.456	888	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοφουράνιο	81	3.212	702	+	+	+	+	+	+	+	+

2-μεθυλοφουράνιο	82	2.115	605	+	+	+	+	+	+	+	+
2-πεντυλοφουράνιο	81	13.603	991	+	+	+	+	+	+	+	+
2,2,5,5,τετραμεθυλοφουράνιο	113	4.594	755	-	-	-	-	-	-	-	-
Διχλωρομεθάνιο	84	1.76	531	+	+	+	+	+	+	+	+
Τριχλωρομεθάνιο	83	2.236	616	+	+	+	+	+	+	+	+
Βενζοθειαιζόλη	135	22.23	1223	-	+	+	+	-	+	-	-
Άγνωστη	81	15.646	1044	-	-	-	-	-	-	-	-
Άγνωστη	69	18.571	1121	-	+	+	-	+	+	-	+
Άγνωστη	82	24.654	1295	+	+	+	+	+	+	-	+
Άγνωστη	82	25.329	1316	-	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	57	9.17	885	-	-	-	-	-	-	-	-
Τερπένια											
3-καρένιο	93	14.249	1009	+	+	+	+	+	+	+	+
α-φαιλανδρένιο	93	14.025	1003	-	-	-	-	-	-	-	-
α-πινένιο	93	11.091	930	+	+	+	+	+	+	+	+
α-τερπινένιο	121	14.505	1014	+	+	+	+	+	+	+	+
α-θουσένιο	93	10.89	926	+	+	+	+	+	+	+	+
β-πινένιο	93	12.877	975	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφένιο	93	11.671	944	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφορά	95	19.408	1144	+	+	+	+	+	+	+	+
Κυμένιο	105	10.776	924	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευκαλυπτόλη	81	15.088	1030	+	+	+	+	+	+	+	+
γ-τερπινένιο	93	16.232	1059	+	+	+	+	+	+	+	+
Λεμονένιο	93	15.022	1028	+	+	+	+	+	+	+	+
Μυρκένιο	93	13.559	991	+	+	+	+	+	+	+	+
β-cis-οκιμένιο	93	15.462	1040	-	-	-	-	-	-	-	-
π-κυμένιο	119	14.865	1024	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του π-κυμενίου	119	17.222	1085	+	+	+	+	+	+	+	+
Σαβινένιο	93	12.796	973	+	+	+	+	+	+	+	+

Τερπινολένιο	93	17.365	1088	-	+	+	-	-	+	+	+
Λινανόλη	71	17.805	1099	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρβακρόλη	135	24.87	1302	+	+	+	+	+	+	-	+
L- μενθόλη	81	20.448	1173	+	+	+	+	-	+	-	+

^α: ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση

^β: γραμμικοί δείκτες κατακράτησης

*: αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της οργανοληπτικής ποιότητας και του μικροβιακού φορτίου

Πίνακας 5.3.6: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε αερόβιες συνθήκες στους 10°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος

Αέρας 10°C	Ιόν στόχος (m/z) ^α	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	LRI ^β	Στείρο κρέας	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>	<i>Ln mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	cocktail των 4 μικροοργανισμών
Οξέα											
Οξικό οξύ	60	2.321	624	-	-	-	-	-	-	-	-
Εξαδεκανοϊκό οξύ	73	35.09	1930	-	+	+	-	-	-	-	-
Αλκοόλες											
Βουταν-1-όλη	56	2.698	658	+	+	+	+	+	+	+	+
Εννεαν-1-όλη	56	20.438	1172	-	+	-	+	+	-	+	+
Οκταν-1-όλη	56	16.771	1073	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-1-εν-3-όλη	57	13.141	980	+	+	+	+	+	+	+	+
Πενταν-1-όλη	42	4.777	759	+	+	+	+	+	+	+	+
Πεντ-1-εν-3-όλη	57	2.907	675	+	+	+	+	+	+	+	+
2,3-βουτανεν-2-διόλη	45	5.745	794	-	-	-	-	-	-	-	-
2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	59	16.8	1074	+	+	+	+	+	+	+	+
Βουταν-2-όλη	45	2.093	603	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοεξαν-1-όλη	57	15.108	1030	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξαν-2-όλη	45	4.532	753	+	+	+	+	+	+	+	+

2-μεθυλοβουταν-1-όλη	56	3.974	729	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-2-εν-1-όλη	57	16.65	1070	+	+	+	+	+	+	+	+
2-φαινυλαιθανόλη	91	18.267	1112	-	-	-	-	-	-	-	-
1-βουτοξυπροπαν-2-όλη	57	11.549	943	-	-	-	-	-	-	+	-
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	56	3.82	725	+	+	+	+	+	+	+	+
Επταν-3-όλη	59	9.698	898	-	-	-	-	-	-	-	-
3-μεθυλοβουταν-1-όλη	55	3.886	725	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκταν-3-όλη	59	13.801	996	-	-	-	-	-	-	-	-
4-μεθυλοπενταν-1-όλη	56	7.289	837	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθανόλη	45	1.554	477	+	+	+	+	+	+	+	+
Επτανόλη	70	12.809	973	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξανόλη	56	8.614	870	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισοβουτανόλη	31	2.295	622	+	-	+	+	+	+	+	+
Λαυρική αλκοόλη	55	30.253	1476	+	+	+	+	-	+	+	+
Προπανόλη	31	1.859	555	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρβονλικές ενώσεις											
<i>Αλδεΐδες</i>											
ακεταλδεΐδη	29	1.451	457	+	+	+	+	+	+	+	+
βενζαλδεΐδη	106	12.188	955	+	+	+	+	+	+	+	+
φαινυλακεταλδεΐδη	91	15.605	1043	-	+	+	+	+	+	+	-
2-μεθυλοβουτανάλη	57	2.691	657	+	+	+	+	+	+	+	+
3-μεθυλοβουτανάλη	58	2.57	647	+	+	+	+	+	+	+	+
πεντανάλη	58	3.127	697	+	+	+	+	+	+	+	+
εξανάλη	56	5.873	802	+	+	+	+	+	+	+	+
τρανς-εξαν-2-άλη	69	7.934	854	-	+	-	-	+	-	+	-
τρανς-οκτεν-2-άλη	70	16.258	1060	+	+	+	+	+	+	+	+
επτανάλη	70	9.86	902	+	+	+	+	+	+	+	+
επτεν-2-άλη (E)	83	12.125	954	+	+	+	+	+	+	+	+
επταν-2,4-διενάλη	81	13.841	998	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτανάλη	43	14.091	1003	+	+	+	+	+	+	+	+

εννεαν-2,4,διάλη E,E	81	21.908	1214	+	+	+	+	+	+	+	+
εννεανάλη	57	17.981	1105	+	+	+	+	+	+	+	+
εντεκανάλη	57	25.105	1309	-	-	-	+	-	+	-	-
δεκανάλη	57	21.648	1206	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκαν-2,4-διενάλη	81	25.344	1315	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκεν-2-άλη E	55	23.543	1262	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές της δεκαν-2,4- διενάλης	81	24.614	1293	+	+	+	+	+	+	+	+
δωδεκανάλη	57	28.31	1411	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Κετόνες</i>											
Βουταν-2-όνη	43	2.074	601	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετόνη	58	1.628	498	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετοφαινόνη	105	16.452	1065	+	+	+	+	+	+	+	+
1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη	84	24.313	1285	-	-	-	-	-	-	-	-
ακετοΐνη (3-υδρόξυβουταν-2- όνη)	45	3.43	715	+	+	+	+	+	+	+	+
διακετύλιο (βουτανο-2,3-διόνη)	43	2.03	594	+	+	+	+	+	+	+	+
πενταν-2-όνη	43	3.002	686	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη	84	11.359	938	-	-	-	-	-	-	-	-
πενταν-2,3-διόνη	100	3.117	691	+	+	+	+	+	+	+	+
εξαν-2-όνη	43	5.532	792	-	-	-	-	-	+	-	-
επταν-2-όνη	43	9.43	888	+	+	+	+	+	+	+	+
οκταν-2-όνη	58	13.625	993	+	-	-	+	+	+	+	+
οκταν-3-όνη	57	13.412	988	-	-	-	+	-	-	-	-
οκταν-2,5-διόνη	43	13.371	987	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτ-1-εν-3-όνη	70	13.097	980	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτ-3-εν-2-όνη	55	15.487	1040	+	+	+	+	+	+	+	+
εννεαν-2-όνη	58	17.566	1094	+	+	+	+	+	+	+	+
5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη	43	8.887	878	-	-	-	-	-	-	-	-
6-μεθυλοεπταν-2-όνη	43	11.047	931	+	-	-	+	+	+	+	+
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	108	13.474	989	+	+	+	+	+	+	+	+

Ακετόνη του γερανυλεστέρα	43	29.637	1455	+	-	+	+	+	+	+	+	
Εστέρες												
οξικός βουτυλεστέρας	43	6.49	818	+	+	+	+	+	+	+	+	
επτανοϊκός αλλυλεστέρας	99	17.215	1085	-	+	+	-	+	-	-	-	
άγνωστος εστέρας	99	17.666	1096	-	-	+	+	-	+	+	-	
αιθυλ-2-βουτυλαιθέρας	69	7.641	847	-	+	-	-	+	-	-	-	
αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	57	7.821	852	-	-	+	-	-	-	+	-	
αιθυλ-3-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	88	7.956	855	+	-	+	+	+	+	+	-	
οξικός αιθυλεστέρας	61	2.203	613	+	+	+	+	+	+	+	+	
βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	5.949	805	+	+	+	+	+	+	+	+	
δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	88	27.874	1396	-	+	-	+	-	-	-	-	
επτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	17.812	1100	+	+	+	-	-	-	+	-	
εξανοϊκός αιθυλεστέρας	88	14.01	1001	+	+	+	+	+	+	+	+	
ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας	71	4.576	754	-	-	+	-	-	+	+	-	
γαλακτικός αιθυλεστέρας	45	6.405	815	+	+	+	+	+	+	+	+	
οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	21.38	1198	+	+	+	+	+	+	+	+	
πεντανοϊκός αιθυλεστέρας	88	9.951	904	+	-	+	+	+	+	+	+	
προπανοϊκός αιθυλεστέρας	57	3.416	710	+	+	+	+	+	+	+	+	
οξικός εξυλεστέρας	43	14.545	1016	-	-	+	-	-	-	+	-	
οξικός ισοαμυλεστέρας	70	8.939	879	+	+	+	+	+	+	+	+	
οξικός μεθυλεστέρας	74	1.752	527	+	+	+	+	+	+	+	+	
βουτανοϊκός μεθυλεστέρας	74	3.652	719	+	+	+	+	+	+	+	+	
2-μεθυλοπεντανοϊκός αιθυλεστέρας	102	11.528	942	-	-	+	-	-	-	+	-	
οξικός αμυλεστέρας	43	10.519	918	-	-	-	-	-	-	-	-	
οξικός τερπινυλεστέρας	93	26.462	1352	-	-	+	-	+	+	-	+	
Εξανοϊκός μεθυλεστέρας	74	10.897	927	+	+	+	+	+	+	+	+	
Υδρογονάνθρακες												
Βενζόλιο	78	2.67	655	+	+	+	+	+	+	+	+	

Ισομερές του τριμεθυλοβενζολίου	105	14.732	1021	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπυλοβενζόλιο	91	11.982	953	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του τριμεθυλοβενζολίου	105	13.588	992	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθυλοβενζόλιο	91	8.125	858	+	+	+	+	+	+	+	+
Ναφθαλένιο	128	20.731	1180	+	+	+	+	+	+	+	+
Στυρένιο	104	9.356	888	+	+	+	+	+	+	+	+
Τολουόλιο	91	4.712	757	+	+	+	+	+	+	+	+
Ξυλ-2-ένιο	91	9.438	891	+	+	+	+	+	+	+	+
Ξυλ-1-ένιο	91	8.448	864	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκ-1,4 διένιο	67	17.358	1088	-	-	-	-	-	-	-	-
Επτ-1-ένιο	56	3.04	689	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο	55	17.505	1092	+	+	-	-	-	+	-	-
Οκτ-2-ένιο, (Z)	112	6.365	815	-	-	+	-	-	-	+	-
3α,4,5,6,7,7α-εξαϋδρο-4,7- μεθανοινδένιο	66	16.419	1064	+	+	+	+	+	+	+	+
4,7-μεθανο-1Η- τετραϋδροινδένιο	95	17.383	1089	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-4-ένιο, (E)	112	6.086	808	-	-	+	+	-	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	+	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	+	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	14.897	1025	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	15.257	1034	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	15.851	1050	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.027	1054	+	-	+	-	+	-	+	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.104	1056	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.441	1065	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	13.464	989	-	+	+	-	-	-	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.254	1060	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	16.888	1076	-	-	-	-	-	-	-	-

Ισομερές αλκανίου	57	16.961	1078	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	85	17.578	1094	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	85	2.691	657	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	2.732	661	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	55	4.524	753	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	85	4.92	768	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	55	9.042	882	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	70	9.298	888	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	70	5.466	789	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	70	5.731	791	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	57	13.948	1000	+	+	+	+	+	+	+	+
C13	57	24.846	1300	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	57	27.984	1400	+	+	+	+	+	+	+	+
C15	57	30.965	1500	+	+	+	+	+	+	+	+
C16	57	32.747	1600	+	+	+	+	+	+	+	+
C17	57	33.638	1700	+	+	+	+	+	+	+	+
C18	57	34.268	1800	+	-	-	+	-	+	-	+
C5	72	1.65	500	+	+	+	+	+	+	+	+
C6	56	2.06	600	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	71	3.164	700	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	85	5.823	800	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	57	9.797	900	+	+	+	+	+	+	+	+
Μεθυλοκυκλοεξάνιο	83	3.6	717	+	+	+	+	-	+	-	+
Κυκλοεξάνιο	84	2.647	654	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2, διμεθυλοκυκλοπεντάνιο	98	3.018	687	-	-	+	-	-	-	-	-
Αιθυλοκυκλοπεντάνιο	69	3.839	726	-	-	-	-	-	-	-	-
Δωδεκένιο	57	21.472	1200	+	+	+	+	+	+	+	+
3μεθυλοεξάνιο	71	2.787	666	+	+	+	+	-	-	-	+
Τετραχλωροαιθυλένιο	166	6.134	810	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο (C11)	57	17.849	1100	+	+	+	+	+	+	+	+
Ινδάνιο	117	15.198	1033	+	+	+	+	+	+	+	+

Διάφορες ουσίες												
Διθειάνθρακας	76	1.785	538	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Διμέθυλο σουλφίδιο	62	1.712	520	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,2-διαιθόξυαιθάνιο	74	1.661	507	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-n- βουτυλοφουράνιο	81	9.456	888	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοφουράνιο	81	3.212	702	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοφουράνιο	82	2.115	605	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-πεντυλοφουράνιο	81	13.603	991	+	+	+	+	+	+	+	+	+
τετραϋδρο- 2,2,5,5,τετραμεθυλοφουράνιο	113	4.594	755	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Διγλωρομεθάνιο	84	1.76	531	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Τριγλωρομεθάνιο	83	2.236	616	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Βενζοθειαζόλη	135	22.23	1223	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Άγνωστη	81	15.646	1044	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Άγνωστη	69	18.571	1121	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Άγνωστη	82	24.654	1295	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	82	25.329	1316	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	57	9.17	885	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Τερπένια												
3-καρένιο	93	14.249	1009	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-φαιλανδρένιο	93	14.025	1003	-	+	+	-	+	+	+	+	+
α-πινένιο	93	11.091	930	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-τερπινένιο	121	14.505	1014	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-θουσένιο	93	10.89	926	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-πινένιο	93	12.877	975	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφένιο	93	11.671	944	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφορά	95	19.408	1144	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Κυμένιο	105	10.776	924	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευκαλυπτόλη	81	15.088	1030	+	+	+	+	+	+	+	+	+
γ-τερπινένιο	93	16.232	1059	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Λεμονένιο	93	15.022	1028	+	+	+	+	+	+	+	+
Μυρκένιο	93	13.559	991	+	+	+	+	+	+	+	+
β-cis-οκιμένιο	93	15.462	1040	+	+	+	+	+	-	+	-
π-κυμένιο	119	14.865	1024	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του π-κυμενίου	119	17.222	1085	+	+	+	+	+	+	+	+
Σαβινένιο	93	12.796	973	+	+	+	+	+	+	+	+
Τερπινολένιο	93	17.365	1088	+	-	-	+	-	+	+	+
Λινανοόλη	71	17.805	1099	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρβακρόλη	135	24.87	1302	+	+	+	+	+	+	+	+
L- μενθόλη	81	20.448	1173	-	-	-	-	+	+	-	-

^α: ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση

^β: γραμμικοί δείκτες κατακράτησης

*: αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της οργανοληπτικής ποιότητας και του μικροβιακού φορτίου

Πίνακας 5.3.7: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) στους 4°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος

MAP 4°C	Ιόν στόχος (m/z) ^α	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	LRI ^β	Στείρο κρέας	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>	<i>Ln mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	coctail των 4 μικροοργανισμών
Οξέα											
Οξικό οξύ	60	2.321	624	-	-	-	-	-	-	-	-
Εξαδεκανοϊκό οξύ	73	35.09	1930	-	-	-	-	-	-	-	-
Αλκοόλες											
Βουταν-1-όλη	56	2.698	658	+	+	+	+	+	+	+	+
Εννεαν-1-όλη	56	20.438	1172	-	-	-	-	-	+	-	-
Οκταν-1-όλη	56	16.771	1073	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-1-εν-3-όλη	57	13.141	980	+	+	+	+	+	+	+	+
Πενταν-1-όλη	42	4.777	759	+	+	+	+	+	+	+	+

Πεντ-1-εν-3-όλη	57	2.907	675	+	+	+	+	+	+	+	+
2,3-βουτανεν-2-διόλη	45	5.745	794	-	-	-	-	-	-	-	-
2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	59	16.8	1074	+	+	+	+	+	+	+	+
Βουταν-2-όλη	45	2.093	603	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοεξαν-1-όλη	57	15.108	1030	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξαν-2-όλη	45	4.532	753	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοβουταν-1-όλη	56	3.974	729	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-2-εν-1-όλη	57	16.65	1070	+	+	+	+	+	+	+	-
2-φαινυλαιθανόλη	91	18.267	1112	-	-	-	-	-	-	-	-
1-βουτοξυπροπαν-2-όλη	57	11.549	943	-	-	-	-	-	+	-	-
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	56	3.82	725	+	+	+	+	+	+	+	+
Επταν-3-όλη	59	9.698	898	+	+	+	+	+	+	+	+
3-μεθυλοβουταν-1-όλη	55	3.886	725	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκταν-3-όλη	59	13.801	996	-	-	-	+	-	+	-	-
4-μεθυλοπενταν-1-όλη	56	7.289	837	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθανόλη	45	1.554	477	+	+	+	+	+	+	+	+
Επτανόλη	70	12.809	973	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξανόλη	56	8.614	870	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισοβουτανόλη	31	2.295	622	+	+	+	+	+	+	+	+
Λαυρική αλκοόλη	55	30.253	1476	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπανόλη	31	1.859	555	+	-	+	+	+	+	+	+
Καρβονλικές ενώσεις											
<i>Αλδεΐδες</i>											
ακεταλδεΐδη	29	1.451	457	+	+	+	+	+	+	+	+
βενζαλδεΐδη	106	12.188	955	+	+	+	+	+	+	+	+
φαινυλακεταλδεΐδη	91	15.605	1043	-	-	-	-	-	-	-	-
2-μεθυλοβουτανάλη	57	2.691	657	+	+	+	+	+	+	+	+
3-μεθυλοβουτανάλη	58	2.57	647	+	+	+	+	+	+	+	+
πεντανάλη	58	3.127	697	+	+	+	+	+	+	+	+

εξανάλη	56	5.873	802	+	+	+	+	+	+	+	+
τρανς-εξαν-2-άλη	69	7.934	854	-	-	-	-	-	-	-	-
τρανς-οκτεν-2-άλη	70	16.258	1060	+	+	+	+	+	+	+	+
επτανάλη	70	9.86	902	+	+	+	+	+	+	+	+
επτεν-2-άλη (E)	83	12.125	954	+	+	+	+	+	+	+	+
επταν-2,4-διενάλη	81	13.841	998	-	-	-	-	-	-	-	-
οκτανάλη	43	14.091	1003	+	+	+	+	+	+	+	+
εννεαν-2,4,διάλη E,E	81	21.908	1214	+	+	+	+	+	+	+	+
εννεανάλη	57	17.981	1105	+	+	+	+	+	+	+	+
εντεκανάλη	57	25.105	1309	-	-	-	-	-	-	-	-
δεκανάλη	57	21.648	1206	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκαν-2,4-διενάλη	81	25.344	1315	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκεν-2-άλη E	55	23.543	1262	-	+	+	-	+	+	+	-
Ισομερές της δεκαν-2,4-διενάλης	81	24.614	1293	+	+	+	+	+	+	+	+
δωδεκανάλη	57	28.31	1411	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Κετόνες</i>											
Βουταν-2-όνη	43	2.074	601	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετόνη	58	1.628	498	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετοφαινόνη	105	16.452	1065	+	+	+	+	+	+	+	+
1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη	84	24.313	1285	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετοΐνη (3-υδροξυβουταν-2-όνη)	45	3.43	715	+	+	+	+	+	+	+	+
διακετύλιο (βουταν-2,3-διόνη)	43	2.03	594	+	+	+	+	+	+	+	+
πενταν-2-όνη	43	3.002	686	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη	84	11.359	938	+	+	+	+	+	+	+	+
πενταν-2,3-διόνη	100	3.117	691	+	+	+	+	+	+	+	+
εξαν-2-όνη	43	5.532	792	+	+	+	+	+	+	+	+
επταν-2-όνη	43	9.43	888	+	+	+	+	+	+	+	+
οκταν-2-όνη	58	13.625	993	+	+	+	+	+	+	+	+
οκταν-3-όνη	57	13.412	988	-	+	+	+	+	-	-	-
οκταν-2,5-διόνη	43	13.371	987	+	+	+	+	+	+	+	+

οκτ-1-εν-3-όνη	70	13.097	980	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτ-3-εν-2-όνη	55	15.487	1040	-	-	-	-	-	-	-	-
εννεαν-2-όνη	58	17.566	1094	+	+	+	+	+	+	+	+
5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη	43	8.887	878	-	+	+	+	+	+	+	+
6-μεθυλοεπταν-2-όνη	43	11.047	931	+	+	+	+	+	+	+	+
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	108	13.474	989	+	+	+	+	+	+	+	+
Ακετόνη του γερανυλεστέρα	43	29.637	1455	+	+	+	+	+	+	+	+
Εστέρες											
οξικός βουτυλεστέρας	43	6.49	818	+	+	+	+	+	+	+	+
επτανοϊκός αλλυλεστέρας	99	17.215	1085	-	-	-	-	-	-	+	-
άγνωστος εστέρας	99	17.666	1096	-	-	-	-	-	-	-	-
αιθυλ-2-βουτυλαιθέρας	69	7.641	847	-	-	-	-	+	-	-	-
αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	57	7.821	852	+	+	-	-	-	-	+	-
αιθυλ-3-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	88	7.956	855	+	-	-	+	-	-	+	+
οξικός αιθυλεστέρας	61	2.203	613	+	+	+	+	+	+	+	+
βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	5.949	805	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	88	27.874	1396	-	-	-	-	-	-	-	-
επτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	17.812	1100	-	-	-	-	-	-	-	-
εξανοϊκός αιθυλεστέρας	88	14.01	1001	+	+	+	+	+	+	+	+
ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας	71	4.576	754	-	-	-	-	-	-	-	-
γαλακτικός αιθυλεστέρας	45	6.405	815	+	-	+	-	+	+	-	+
οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	21.38	1198	-	+	+	+	+	+	+	+
πεντανοϊκός αιθυλεστέρας	88	9.951	904	-	-	-	-	-	-	-	-
προπανοϊκός αιθυλεστέρας	57	3.416	710	+	+	+	+	+	+	+	+
οξικός εξυλεστέρας	43	14.545	1016	-	+	+	-	+	+	+	+
οξικός ισοαμυλεστέρας	70	8.939	879	+	+	+	+	+	+	+	+
οξικός μεθυλεστέρας	74	1.752	527	+	+	+	+	+	+	+	+
βουτανοϊκός μεθυλεστέρας	74	3.652	719	-	-	-	-	-	-	-	-

2-μεθυλοπεντανοϊκός αιθυλεστέρας	102	11.528	942	-	-	+	-	-	-	+	-
οξικός αμυλεστέρας	43	10.519	918	+	+	-	-	+	-	-	-
οξικός τερπινυλεστέρας	93	26.462	1352	-	+	-	-	+	+	-	-
Εξανοϊκός μεθυλεστέρας	74	10.897	927	-	-	-	-	-	-	-	-
Υδρογονάνθρακες											
Βενζόλιο	78	2.67	655	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του τριμεθυλοβενζενίου	105	14.732	1021	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπυλοβενζόλιο	91	11.982	953	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του τριμεθυλοβενζολίου	105	13.588	992	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθυλοβενζόλιο	91	8.125	858	+	+	+	+	+	+	+	+
Ναφθαλένιο	128	20.731	1180	+	+	+	+	+	+	+	+
Στυρένιο	104	9.356	888	+	+	+	+	+	+	+	+
Τολουόλιο	91	4.712	757	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευλ-2-ένιο	91	9.438	891	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευλ-1-ένιο	91	8.448	864	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκ-1,4 διένιο	67	17.358	1088	-	-	-	-	-	-	-	-
Επτ-1-ένιο	56	3.04	689	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο	55	17.505	1092	-	-	-	-	-	-	-	-
Οκτ-2-ένιο, (Z)	112	6.365	815	-	+	+	-	+	+	+	-
3a,4,5,6,7,7a-εξαϋδρο-4,7- μεθανοινδένιο	66	16.419	1064	-	-	-	-	-	-	-	-
4,7-μεθανο-1H- τετραϋδροινδένιο	95	17.383	1089	-	-	-	-	-	-	-	-
Οκτ-4-ένιο, (E)	112	6.086	808	-	+	+	-	+	+	+	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	14.897	1025	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	15.257	1034	+	+	+	+	+	+	+	+

Ισομερές αλκανίου	57	15.851	1050	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.027	1054	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.104	1056	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.441	1065	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	13.464	989	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.254	1060	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	16.888	1076	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.961	1078	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	17.578	1094	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	2.691	657	-	+	+	-	-	+	-	+
Ισομερές αλκανίου	71	2.732	661	+	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	55	4.524	753	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	4.92	768	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	55	9.042	882	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	9.298	888	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	5.466	789	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	5.731	791	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	57	13.948	1000	+	+	+	+	+	+	+	+
C13	57	24.846	1300	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	57	27.984	1400	+	+	+	+	+	+	+	+
C15	57	30.965	1500	+	+	+	+	+	+	+	+
C16	57	32.747	1600	+	+	+	+	+	+	+	+
C17	57	33.638	1700	+	+	+	+	+	+	+	+
C18	57	34.268	1800	-	+	-	+	+	+	+	+
C5	72	1.65	500	+	+	+	+	+	+	+	+
C6	56	2.06	600	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	71	3.164	700	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	85	5.823	800	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	57	9.797	900	+	+	+	+	+	+	+	+
Μεθυλοκυκλοεξάνιο	83	3.6	717	+	+	+	+	+	+	+	+
Κυκλοεξάνιο	84	2.647	654	+	+	+	+	+	+	+	+

1,2, διμεθυλοκυκλοπεντάνιο	98	3.018	687	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθυλοκυκλοπεντάνιο	69	3.839	726	-	-	-	-	-	-	-	-
Δωδεκένιο	57	21.472	1200	+	+	+	+	+	+	+	+
3μεθυλοεξάνιο	71	2.787	666	+	+	+	+	+	+	+	+
Τετραχλωροαιθυλένιο	166	6.134	810	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο (C11)	57	17.849	1100	+	+	+	+	+	+	+	+
Ινδάνιο	117	15.198	1033	+	+	+	+	+	+	+	+
Διάφορες ουσίες											
Διθειάνθρακας	76	1.785	538	+	+	+	+	+	+	+	+
Διμέθυλο σουλφίδιο	62	1.712	520	+	+	+	+	+	+	+	+
1,2-διαιθόξυαιθάνιο	74	1.661	507	+	-	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοφουράνιο	81	3.212	702	+	+	+	+	+	+	+	+
2-n- βουτυλοφουράνιο	81	9.456	888	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοφουράνιο	82	2.115	605	+	+	+	+	+	+	+	+
2-πεντυλοφουράνιο	81	13.603	991	+	+	+	+	+	+	+	+
τετραϋδρο- 2,2,5,5,τετραμεθυλοφουράνιο	113	4.594	755	+	+	+	+	+	+	+	+
Διχλωρομεθάνιο	84	1.76	531	+	+	+	+	+	+	+	+
Τριχλωρομεθάνιο	83	2.236	616	+	+	+	+	+	+	+	+
Βενζοθειαζόλη	135	22.23	1223	-	-	-	-	-	-	-	-
Άγνωστη	81	15.646	1044	+	+	+	+	+	+	-	+
Άγνωστη	69	18.571	1121	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	82	24.654	1295	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	82	25.329	1316	-	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	57	9.17	885	+	+	+	+	+	+	+	+
Τερπένια											
3-καρένιο	93	14.249	1009	+	+	+	+	+	+	+	+
α-φαιλανδρένιο	93	14.025	1003	-	-	+	-	-	+	+	-
α-πινένιο	93	11.091	930	+	+	+	+	+	+	+	+
α-τερπινένιο	121	14.505	1014	+	+	+	+	+	+	+	+

α-θουσένιο	93	10.89	926	+	+	+	+	+	+	+	+
β-πινένιο	93	12.877	975	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφένιο	93	11.671	944	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφορά	95	19.408	1144	+	+	+	+	+	+	+	+
Κυμένιο	105	10.776	924	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευκαλυπτόλη	81	15.088	1030	+	+	+	+	+	+	+	+
γ-τερπινένιο	93	16.232	1059	+	+	+	+	+	+	+	+
Λεμονένιο	93	15.022	1028	+	+	+	+	+	+	+	+
Μυρκένιο	93	13.559	991	+	+	+	+	+	+	+	+
β-cis-οκιμένιο	93	15.462	1040	-	-	-	-	-	-	-	-
π-κυμένιο	119	14.865	1024	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του π-κυμενίου	119	17.222	1085	+	+	+	+	+	+	+	+
Σαβινένιο	93	12.796	973	+	+	+	+	+	+	+	+
Τερπινολένιο	93	17.365	1088	+	+	+	+	+	+	+	+
Λιτανοόλη	71	17.805	1099	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρβακρόλη	135	24.87	1302	-	-	-	-	-	-	+	-
L- μενθόλη	81	20.448	1173	-	-	-	-	+	+	-	-

^a: ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση

^b: γραμμικοί δείκτες κατακράτησης

*: αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της οργανοληπτικής ποιότητας και του μικροβιακού φορτίου

Πίνακας 5.3.8: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) στους 10°C κατά την συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος

MAP 10°C	Ιόν στόχος (m/z) ^a	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	LRI ^b	Στείρο κρέας	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fragi</i> και <i>P. putida</i>	<i>Ln mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. sakei</i> και <i>Ln mesenteroides</i>	coctail των 4 μικροοργανισμών
Οξέα											
Οξικό οξύ	60	2.321	624	-	+	-	-	-	+	-	-
Εξαδεκανοϊκό οξύ	73	35.09	1930	-	-	-	-	-	-	-	-

Αλκοόλες												
Βουταν-1-όλη	56	2.698	658	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Εννεαν-1-όλη	56	20.438	1172	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Οκταν-1-όλη	56	16.771	1073	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-1-εν-3-όλη	57	13.141	980	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Πενταν-1-όλη	42	4.777	759	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Πεντ-1-εν-3-όλη	57	2.907	675	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,3-βουτανεν-2-διόλη	45	5.745	794	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	59	16.8	1074	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Βουταν-2-όλη	45	2.093	603	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοεξαν-1-όλη	57	15.108	1030	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξαν-2-όλη	45	4.532	753	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοβουταν-1-όλη	56	3.974	729	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκτ-2-εν-1-όλη	57	16.65	1070	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2-φαινυλαιθανόλη	91	18.267	1112	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-βουτοξυπροπαν-2-όλη	57	11.549	943	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	56	3.82	725	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Επταν-3-όλη	59	9.698	898	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-μεθυλοβουταν-1-όλη	55	3.886	725	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οκταν-3-όλη	59	13.801	996	-	+	+	-	-	-	+	-	-
4-μεθυλοπενταν-1-όλη	56	7.289	837	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθανόλη	45	1.554	477	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Επτανόλη	70	12.809	973	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Εξανόλη	56	8.614	870	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισοβουτανόλη	31	2.295	622	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Λαυρική αλκοόλη	55	30.253	1476	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπανόλη	31	1.859	555	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρβονυλικές ενώσεις												
<i>Αλδεΐδες</i>												
ακεταλδεΐδη	29	1.451	457	+	+	+	+	+	+	+	+	+

βενζαλδεϋδη	106	12.188	955	+	+	+	+	+	+	+	+
φαινυλακεταλδεϋδη	91	15.605	1043	-	-	-	-	-	-	-	-
2-μεθυλοβουτανάλη	57	2.691	657	+	+	+	+	+	+	+	+
3-μεθυλοβουτανάλη	58	2.57	647	+	+	+	+	+	+	+	+
πεντανάλη	58	3.127	697	+	+	+	+	+	+	+	+
εξανάλη	56	5.873	802	+	+	+	+	+	+	+	+
τρανς-εξαν-2-άλη	69	7.934	854	-	-	-	-	-	-	-	-
τρανς-οκτεν-2-άλη	70	16.258	1060	+	+	+	+	+	+	+	+
επτανάλη	70	9.86	902	+	+	+	+	+	+	+	+
επτεν-2-άλη (E)	83	12.125	954	+	+	+	+	+	+	+	+
επταν-2,4-διενάλη	81	13.841	998	-	-	+	+	+	-	-	+
οκτανάλη	43	14.091	1003	+	+	+	+	+	+	+	+
εννεαν-2,4,διάλη E,E	81	21.908	1214	+	+	+	+	+	+	+	+
εννεανάλη	57	17.981	1105	+	+	+	+	+	+	+	+
εντεκανάλη	57	25.105	1309	-	-	-	-	-	-	-	-
δεκανάλη	57	21.648	1206	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκαν-2,4-διενάλη	81	25.344	1315	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκεν-2-άλη E	55	23.543	1262	+	+	+	-	+	+	+	-
Ισομερές της δεκαν-2,4-διενάλης	81	24.614	1293	+	+	+	+	+	+	+	+
δωδεκανάλη	57	28.31	1411	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Κετόνες</i>											
Βουταν-2-όνη	43	2.074	601	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετόνη	58	1.628	498	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετοφαινόνη	105	16.452	1065	+	+	+	+	+	+	+	+
1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη	84	24.313	1285	+	+	+	+	+	+	+	+
ακετοΐνη (3-υδρόξυβουταν-2-όνη)	45	3.43	715	+	+	+	+	+	+	+	+
διακετύλιο (βουτανο-2,3-διόνη)	43	2.03	594	+	+	+	+	+	+	+	+
πενταν-2-όνη	43	3.002	686	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη	84	11.359	938	+	+	+	+	+	+	+	+
πενταν-2,3-διόνη	100	3.117	691	+	+	+	+	+	+	+	+

εξαν-2-όνη	43	5.532	792	+	+	+	+	+	+	+	+
επτan-2-όνη	43	9.43	888	+	+	+	+	+	+	+	+
οκταν-2-όνη	58	13.625	993	+	+	+	+	+	+	+	+
οκταν-3-όνη	57	13.412	988	+	+	+	-	+	+	+	-
οκταν-2,5-διόνη	43	13.371	987	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτ-1-εν-3-όνη	70	13.097	980	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτ-3-εν-2-όνη	55	15.487	1040	-	-	-	-	-	-	-	-
εννεαν-2-όνη	58	17.566	1094	+	+	+	+	+	+	+	+
5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη	43	8.887	878	+	+	+	+	+	+	+	+
6-μεθυλοεπτan-2-όνη	43	11.047	931	+	+	+	+	+	+	+	+
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	108	13.474	989	+	+	+	+	+	+	+	+
Ακετόνη του γερανυλεστέρα	43	29.637	1455	+	+	+	+	+	+	+	+
Εστέρες											
οξικός βουτυλεστέρας	43	6.49	818	+	+	+	+	+	+	+	+
επτανοϊκός αλλυλεστέρας	99	17.215	1085	-	-	-	-	-	-	-	-
άγνωστος εστέρας	99	17.666	1096	-	-	-	-	-	-	-	-
αιθυλ-2-βουτυλαιθέρας	69	7.641	847	+	-	-	-	-	-	-	-
αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	57	7.821	852	+	+	+	-	+	+	+	+
αιθυλ-3-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας	88	7.956	855	+	+	+	+	+	+	+	+
οξικός αιθυλεστέρας	61	2.203	613	+	+	+	+	+	+	+	+
βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	5.949	805	+	+	+	+	+	+	+	+
δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	88	27.874	1396	-	+	-	-	-	-	-	-
επτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	17.812	1100	-	+	-	-	-	-	-	+
εξανοϊκός αιθυλεστέρας	88	14.01	1001	+	+	+	+	+	+	+	+
ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας	71	4.576	754	-	-	+	-	-	-	+	-
γαλακτικός αιθυλεστέρας	45	6.405	815	+	+	+	+	+	+	+	+
οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	88	21.38	1198	+	+	+	+	+	+	+	+
πεντανοϊκός αιθυλεστέρας	88	9.951	904	+	+	+	+	+	+	+	+
προπανοϊκός αιθυλεστέρας	57	3.416	710	+	+	+	+	+	+	+	+

οξικός εξυλεστέρας	43	14.545	1016	-	+	+	-	+	+	+	+
οξικός ισοαμλεστέρας	70	8.939	879	+	+	+	+	-	+	-	-
οξικός μεθυλεστέρας	74	1.752	527	+	+	+	+	+	+	+	+
βουτανοϊκός μεθυλεστέρας	74	3.652	719	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοπεντανοϊκός αιθυλεστέρας	102	11.528	942	-	+	-	-	-	+	-	-
οξικός αμυλεστέρας	43	10.519	918	-	+	-	-	-	+	-	-
οξικός τερπινυλεστέρας	93	26.462	1352	-	+	+	-	+	+	-	-
Εξανοϊκός μεθυλεστέρας	74	10.897	927	+	+	+	+	+	+	+	+
Υδρογονάνθρακες											
Βενζόλιο	78	2.67	655	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του τριμεθυλοβενζολίου	105	14.732	1021	+	+	+	+	+	+	+	+
Προπυλοβενζόλιο	91	11.982	953	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του τριμεθυλοβενζολίου	105	13.588	992	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθυλοβενζόλιο	91	8.125	858	+	+	+	+	+	+	+	+
Ναφθαλένιο	128	20.731	1180	+	+	+	+	+	+	+	+
Στυρένιο	104	9.356	888	+	+	+	+	+	+	+	+
Τολουόλιο	91	4.712	757	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευλ-2-ένιο	91	9.438	891	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευλ-1-ένιο	91	8.448	864	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκ-1,4 διένιο	67	17.358	1088	-	-	-	-	-	-	-	-
Επτ-1-ένιο	56	3.04	689	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο	55	17.505	1092	-	-	-	-	-	-	-	-
Οκτ-2-ένιο, (Z)	112	6.365	815	-	+	-	+	+	-	+	+
3a,4,5,6,7,7a-εξυδρο-4,7- μεθανοινδένιο	66	16.419	1064	+	-	-	-	-	-	-	-
4,7-μεθανο-1H- τετραυδροινδένιο	95	17.383	1089	+	+	-	+	-	-	-	-
Οκτ-4-ένιο, (E)	112	6.086	808	+	+	+	+	+	-	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	-	+	-	-	-	-	-	-

Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	12.752	972	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	14.897	1025	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	15.257	1034	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	15.851	1050	+	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	57	16.027	1054	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.104	1056	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.441	1065	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	13.464	989	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.254	1060	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	71	16.888	1076	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	57	16.961	1078	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	17.578	1094	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	2.691	657	+	-	-	+	-	-	+	-
Ισομερές αλκανίου	71	2.732	661	-	-	-	-	-	-	-	-
Ισομερές αλκανίου	55	4.524	753	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	85	4.92	768	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	55	9.042	882	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	9.298	888	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	5.466	789	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές αλκανίου	70	5.731	791	-	-	-	+	-	-	-	-
C10	57	13.948	1000	+	+	+	+	+	+	+	+
C13	57	24.846	1300	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	57	27.984	1400	+	+	+	+	+	+	+	+
C15	57	30.965	1500	+	+	+	+	+	+	+	+
C16	57	32.747	1600	+	+	+	+	+	+	+	+
C17	57	33.638	1700	+	+	+	+	+	+	+	+
C18	57	34.268	1800	+	+	+	+	+	+	+	+
C5	72	1.65	500	+	+	+	+	+	+	+	+
C6	56	2.06	600	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	71	3.164	700	+	+	+	+	+	+	+	+

C8	85	5.823	800	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	57	9.797	900	+	+	+	+	+	+	+	+
Μεθυλοκυκλοεξάνιο	83	3.6	717	+	+	+	+	+	+	+	+
Κυκλοεξάνιο	84	2.647	654	+	+	+	-	+	-	+	+
1,2, διμεθυλοκυκλοπεντάνιο	98	3.018	687	+	+	+	+	+	+	+	+
Αιθυλοκυκλοπεντάνιο	69	3.839	726	-	-	-	-	-	-	-	-
Δωδεκένιο	57	21.472	1200	+	+	+	+	+	+	+	+
3μεθυλοεξάνιο	71	2.787	666	+	-	+	+	+	+	+	+
Τετραχλωροαιθυλένιο	166	6.134	810	+	+	+	+	+	+	+	+
Ενδεκένιο (C11)	57	17.849	1100	+	+	+	+	+	+	+	+
Ινδάνιο	117	15.198	1033	+	+	+	+	+	+	+	+
Διάφορες ουσίες											
Διθειάνθρακας	76	1.785	538	+	+	+	+	+	+	+	+
Διμέθυλο σουλφίδιο	62	1.712	520	+	+	+	+	+	+	+	+
1,2-διαιθόξυαιθάνιο	74	1.661	507	+	-	+	+	+	+	+	+
2-n- βουτυλοφουράνιο	81	9.456	888	+	+	+	+	+	+	+	+
2-αιθυλοφουράνιο	81	3.212	702	+	+	+	+	+	+	+	+
2-μεθυλοφουράνιο	82	2.115	605	+	+	+	+	+	+	+	+
2-πεντυλοφουράνιο	81	13.603	991	+	+	+	+	+	+	+	+
τετραϋδρο- 2,2,5,5,τετραμεθυλοφουράνιο	113	4.594	755	+	+	+	+	+	+	+	+
Διχλωρομεθάνιο	84	1.76	531	+	+	+	+	+	+	+	+
Τριχλωρομεθάνιο	83	2.236	616	+	+	+	+	+	+	+	+
Βενζοθειαζόλη	135	22.23	1223	-	-	-	-	-	-	-	-
Άγνωστη	81	15.646	1044	+	+	+	+	+	+	-	+
Άγνωστη	69	18.571	1121	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	82	24.654	1295	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	82	25.329	1316	+	+	+	+	+	+	+	+
Άγνωστη	57	9.17	885	+	+	+	+	+	+	+	+
Τερπένια											

3-καρένιο	93	14.249	1009	+	+	+	+	+	+	+	+
α-φαιλανδρένιο	93	14.025	1003	+	+	-	+	-	-	-	-
α-πινένιο	93	11.091	930	+	+	+	+	+	+	+	+
α-τερπινένιο	121	14.505	1014	+	+	+	+	+	+	+	+
α-θουσένιο	93	10.89	926	+	+	+	+	+	+	+	+
β-πινένιο	93	12.877	975	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφένιο	93	11.671	944	+	+	+	+	+	+	+	+
Καμφορά	95	19.408	1144	+	+	+	+	+	+	+	+
Κυμένιο	105	10.776	924	+	+	+	+	+	+	+	+
Ευκαλυπτόλη	81	15.088	1030	+	+	+	+	+	+	+	+
γ-τερπινένιο	93	16.232	1059	+	+	+	+	+	+	+	+
Λεμονένιο	93	15.022	1028	+	+	+	+	+	+	+	+
Μυρκένιο	93	13.559	991	+	+	+	+	+	+	+	+
β-cis-οκιμένιο	93	15.462	1040	-	-	-	-	-	-	-	-
π-κυμένιο	119	14.865	1024	+	+	+	+	+	+	+	+
Ισομερές του π-κυμενίου	119	17.222	1085	+	+	+	+	+	+	+	+
Σαβινένιο	93	12.796	973	+	+	+	+	+	+	+	+
Τερπινολένιο	93	17.365	1088	+	+	+	+	+	+	+	+
Λιθανοόλη	71	17.805	1099	+	+	+	+	+	+	+	+
Καρβακρόλη	135	24.87	1302	-	-	-	-	-	-	-	-
L- μενθόλη	81	20.448	1173	+	+	+	-	+	+	+	+

^a: ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση

^β: γραμμικοί δείκτες κατακράτησης

*: αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της οργανοληπτικής ποιότητας και του μικροβιακού φορτίου

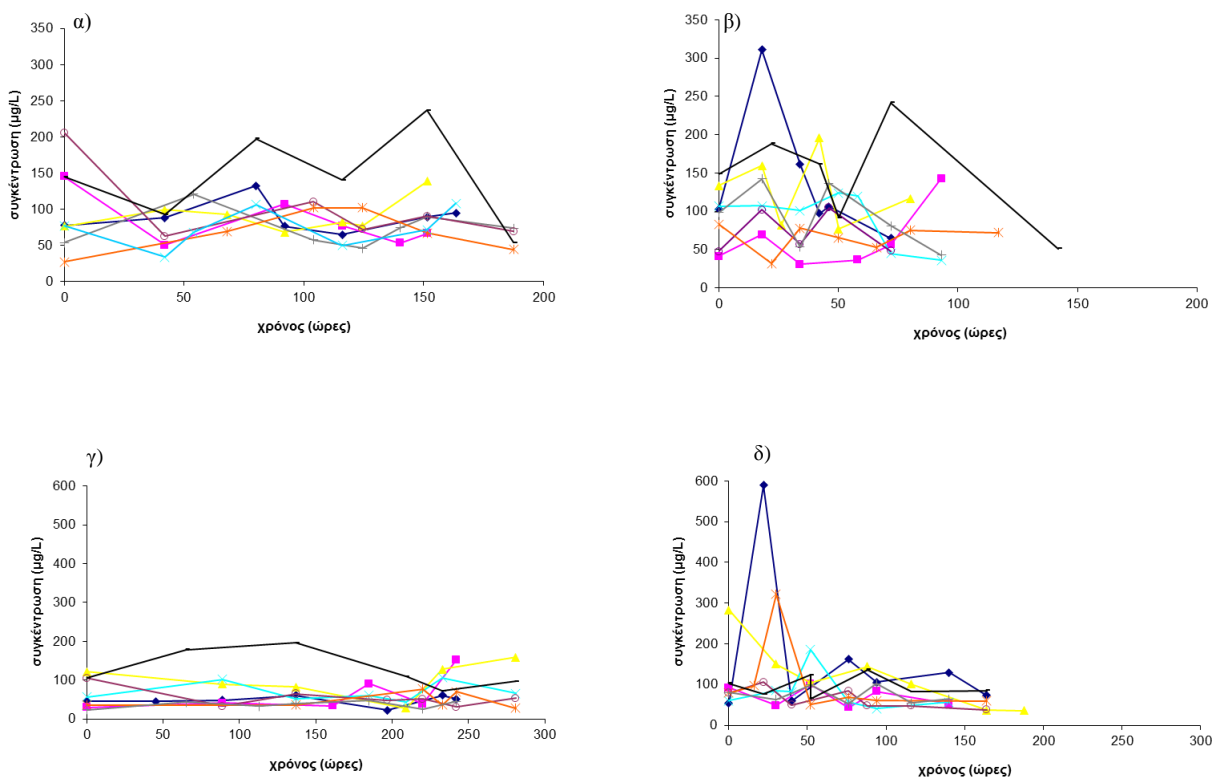
Οξέα

Κατά την συντήρηση των δειγμάτων, ανιχνεύθηκαν δύο οξέα, το οξικό οξύ και το εξαδεκανοϊκό οξύ. Το οξικό οξύ ανιχνεύθηκε μόνο σε δύο δείγματα στο τέλος της εμπορικής διάρκειας ζωής τα οποία είχαν εμβολιαστεί με μονοκαλλιέργειες των *P. fragi* και *L. sakei* και είχαν συντηρηθεί στους 10°C σε MAP. Το εξαδεκανοϊκό οξύ, ανιχνεύθηκε στην περίπτωση του εμβολιασμένου φιλέτου με *P. putida* στους 4 και 10°C σε δείγματα παρατεταμένης συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες και σε δείγμα που είχε συντηρηθεί για 34 ώρες αερόβια στους 10°C το οποίο ήταν εμβολιασμένο με *P. fragi*. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στην GC/MS δεν είναι η πιο κατάλληλη για ανίχνευση οξέων, ως εκ τούτου είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθεί άλλη μέθοδος για ανάλυση των οξέων που βρίσκονται στο κρέας.

Αλκοόλες

Η ομάδα των αλκοολών που ανιχνεύθηκε περιείχε 25 αλκοόλες. Η μεθυλοπενταν-1-όλη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Στην Εικόνα 5.3.9 παρουσιάζεται η μεταβολή της αιθανόλης κατά τη συντήρηση μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου σε αέρα και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Από τα προφίλ των αλκοολών, φαίνεται πως μεταξύ των ίδιων ενώσεων παρατηρούνται διαφορετικές ποσότητες και διαφορετικές τάσεις, σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης. Η παραγωγή αλκοολών μπορεί να αποδοθεί σε μεταβολισμό της γλυκόζης και των αμινοξέων παρουσία μικροοργανισμών, ή και εξαιτίας της οξείδωσης λιπαρών οξέων. Αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως οι *Pseudomonas*, έχουν βρεθεί ότι παράγουν αιθανόλη, μεθανόλη, προπανόλη, 2-μεθυλοπροπανόλη (πρόδρομος βαλίνης) και 2-μεθυλοβουτανόλη (πρόδρομος ισολευκίνης) (Nychas et al., 2007, Tsigarida & Nychas, 2001). Ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια έχουν αναφερθεί για την παραγωγή αιθανόλης η οποία πιθανότατα προέρχεται από τον καταβολισμό της γλυκόζης ή/ και της μικροβιακής μετατροπής της θρεονίνης (Nychas et al., 2007, Tsigarida & Nychas, 2001, Leroy et al., 2009). Πιθανά προϊόντα βακτηριακών μετατροπών είναι η 3-μεθυλοβουτανόλη και η 2-μεθυλοπροπανόλη που προέρχονται από τα αμινοξέα λευκίνη και βαλίνη, αντιστοίχως, μετά την αποδόμηση Strecker των

αμινοξέων κατά τη διάρκεια της πρωτεόλυσης (Ercolini et al., 2009, Luna et al., 2006, Smit et al., 2005). Ορισμένες από τις αλκοόλες έχουν επίσης αναφερθεί ως πιθανά προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων. Αυτές είναι προπαν-1-όλη, βουταν-1-όλη, επταν-1-όλη, οκταν-1-όλη, οκτ-1-εν-3-όλη, και 2-αιθυλοεξαν-1-όλη (Leroy et al., 2009, O'Sullivan et al., 2005).



Εικόνα 5.3.9: Μεταβολή της αιθανόλης σε α) αέρα στους 4°C, β) αέρα στους 10°C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης χλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

Από τις 25 αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν δημιουργήθηκαν 3 ομάδες.

1) Η πρώτη ομάδα περιείχε 6 αλκοόλες, τις εννεαν-1-όλη, 2,3-βουτανεν-2-διόλη, 2-φαινυλαιθανόλη, επταν-3-όλη, 1-βουτοξυπροπαν-2-όλη και οκταν-3-όλη. Σε αυτήν την ομάδα, οι αλκοόλες αυτές δεν ανιχνεύθηκαν στο μη εμβολιασμένο δείγμα φιλέτου κατά την αερόβια συντήρησή του στις 2 θερμοκρασίες ενώ στην συντήρηση σε MAP η αλκοόλη επταν-3-όλη

ανιχνεύθηκε στους 10°C από την αρχή της συντήρησης ενώ στους 4°C παράχθηκε κατά τη διάρκεια συντήρησης του μη εμβολιασμένου δείγματος. Επιπρόσθετα, η επταν-3-όλη δεν ανιχνεύθηκε στους 10°C σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης σε καμία περίπτωση εμβολιασμένου κρέατος. Για τις υπόλοιπες περιπτώσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων, η ομάδα των αλκοολών παρουσίασε μεικτή τάση για τα εμβολιασμένα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, η αλκοόλη εννεαν-1-όλη ανιχνεύθηκε κατά την αποθήκευση στο δείγμα που είχε εμβολιαστεί ταυτόχρονα με τους 4 μικροοργανισμούς στις 2 θερμοκρασίες στον αέρα ενώ κατά τη συντήρηση σε MAP στις 2 θερμοκρασίες δεν ανιχνεύθηκε για την ίδια περίπτωση εμβολιασμού. Στη περίπτωση εμβολιασμού με *Ln. mesenteroides* η εννεαν-1-όλη ανιχνεύθηκε σε θερμοκρασία 4 και 10°C σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης ενώ δεν βρέθηκε στην περίπτωση του MAP. Για το βακτήριο *L. sakei* η εννεαν-1-όλη παράχθηκε μόνο στις συνθήκες συντήρησης με MAP μετά από συντήρηση 137 και 76 ωρών σε θερμοκρασίες 4 και 10°C αντίστοιχα. Οι ψευδομονάδες παράγαγαν την αλκοόλη αυτή μόνο στους 10°C και ιδιαίτερα στα αλλοιωμένα δείγματα. Παρομοίως, η οκταν-3-όλη δεν ανιχνεύθηκε στις θερμοκρασίες 4 και 10°C σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης ενώ σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4°C παράχθηκε στα εμβολιασμένα δείγματα με τη συγκαλλιέργεια των ψευδομονάδων στα δείγματα που έχουν χαρακτηριστεί αλλοιωμένα και την περίπτωση εμβολιασμού με το βακτήριο *L. sakei* κατά το τέλος της αλλοίωσης, ενώ σε θερμοκρασία 10°C παράχθηκε κατά τη συντήρηση δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με τις μονοκαλλιέργειες των ψευδομονάδων σε φρέσκα δείγματα και με τη συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων μετά από 76 ώρες συντήρησης. Η αλκοόλη 2-φαινυλαιθανόλη δεν ανευρέθηκε στη συντήρηση σε MAP, ενώ στην αερόβια συντήρηση βρέθηκε μόνο στην περίπτωση του εμβολιασμού με *L. sakei* σε θερμοκρασία 4°C. Η 1-βουτοξυπροπαν-2-όλη ανιχνεύθηκε στην αερόβια αλλοίωση σε θερμοκρασία 4°C στις περιπτώσεις όπου το φιλέτο είχε εμβολιαστεί με το κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών, με *L. sakei*, με τις μονοκαλλιέργειες των ψευδομονάδων και τη συγκαλλιέργεια των ψευδομονάδων, μόνο στα αλλοιωμένα δείγματα, ενώ σε θερμοκρασία 10°C βρέθηκε στην περίπτωση εμβολιασμού με την συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων σε αλλοιωμένα δείγματα. Στην συντήρηση σε MAP, η αλκοόλη αυτή ανιχνεύθηκε σε θερμοκρασία 4°C του εμβολιασμένου δείγματος με το βακτήριο *L. sakei* μετά από 137 ώρες συντήρησης, ενώ στους 10°C δεν βρέθηκε σε καμία περίπτωση. Τέλος, η 2,3-βουτανεν-2-διόλη βρέθηκε μόνο σε μία περίπτωση, σε θερμοκρασία 10°C σε δείγμα που ήταν εμβολιασμένο με τη συγκαλλιέργεια των ψευδομονάδων μετά από 30 ώρες συντήρησης.

2) Η δεύτερη ομάδα αποτελούταν από 6 αλκοόλες, οι οποίες είναι οι αιθανόλη, προπανόλη, βουταν-1-όλη, οκταν-1-όλη, 2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη και λαυρική αλκοόλη. Όλες οι αλκοόλες της ομάδας αυτής βρέθηκαν στο μη εμβολιασμένο φιλέτο κρέατος και στο εμβολιασμένο φιλέτο σε όλες τις περιπτώσεις της συντήρησης του με τους επιλεγμένους μικροοργανισμούς και τους συνδυασμούς τους. Πιο συγκεκριμένα, η αιθανόλη (Εικόνα 5.3.9) όπως και όλες οι υπόλοιπες αλκοόλες παρουσίασαν αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων.

3) Η επόμενη ομάδα απαρτιζόταν από 13 αλκοόλες. Οι αλκοόλες αυτές (βουταν-2-όλη, 2-μεθυλοβουταν-1-όλη, 3-μεθυλοβουταν-1-όλη, 3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη, ισοβουτανόλη, πενταν-1-όλη, πεντ-1-εν-3-όλη, εξανόλη, εξαν-2-όλη, 2-αιθυλοεξαν-1-όλη, επτανόλη, οκτ-2-εν-1-όλη και οκτ-1-εν-3-όλη) παρουσιάζουν μεικτή τάση με αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις τους σε όλες τις περιπτώσεις. Η οκτ-2-εν-1-όλη δεν ανιχνεύθηκε στην περίπτωση του δείγματος που έχει εμβολιαστεί με τους 4 μικροοργανισμούς στους 4°C στην συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η ισοβουτανόλη δεν ανιχνεύθηκε στους 10°C για τον μικροοργανισμό *P. fragi* στην αερόβια συντήρηση ενώ στη συντήρηση σε MAP δεν ανιχνεύθηκε στους 4°C στην περίπτωση του κρέατος που είχε εμβολιαστεί με *P. fragi* και στους 10°C για τις περιπτώσεις με κρέας που είχε εμβολιαστεί με *P. fragi*, *P. putida*, και *L. sakei*. Η οκτ-1-εν-3-όλη παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά στην αερόβια συντήρηση από ότι στη συντήρηση σε MAP καθώς στην συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα η συγκέντρωσή της μειώνεται με την πάροδο της αποθήκευσης.

Καρβονυλικές ενώσεις

Η ομάδα των καρβονυλικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν περιείχε 21 αλδεΐδες και 21 κετόνες. Στις Εικόνες 5.3.10, 5.3.11, παρουσιάζεται η μεταβολή της αλδεΐδης ακεταλδεΐδης και της κετόνης ακετοΐνης κατά τη συντήρηση του μη εμβολιασμένου και του εμβολιασμένου φιλέτου με τους επιλεγμένους μικροοργανισμούς σε αέρα και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες όπως και οι αλκοόλες μπορούν να παραχθούν με μεταβολισμό της γλυκόζης, των αμινοξέων και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Οι γραμμικές κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες με περισσότερα από πέντε άτομα άνθρακα, οφείλονται στην οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων, ενώ οι αλδεΐδες με μεθύλιο και οι φαινυλοαλδεΐδες σχετίζονται περισσότερο με την αποικοδόμηση των αμινοξέων (Xie et al., 2008). Αλδεΐδες, όπως η εξανάλη, εννεανάλη, και δεκανάλη μπορεί να προέρχονται από υδρόλυση των τριγλυκεριδίων ή από αποικοδόμηση αμινοξέων (Ercolini et al., 2009). Η εξανάλη είναι πιθανό να προκύψει από οξειδωση ακόρεστων ω-6 λιπαρών οξέων, υδρόλυση τριγλυκεριδίων ή/ και αποικοδόμηση αμινοξέων (Brewer & Vega, 1995, Montel eta al., 1998). Η εννεανάλη αναφέρθηκε ως προϊόν αποσύνθεσης του 10-υδροϋπεροξειδίου που παράγεται από την οξειδωση του ελαϊκού οξέος, το οποίο είναι το κύριο λιπαρό οξύ στο λίπος του βόειου κρέατος (Insausti et al., 2002). Η 2-μεθυλοβουτανάλη (πρόδρομος ισολευκίνης) μπορεί να παραχθεί από διάφορα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (π.χ. *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*) όπως και κατά την αποικοδόμηση της ισολευκίνης (Aaslyng & Schafer, 2008, Nychas et al., 2007). Αντίστοιχα, η 3-μεθυλοβουτανάλη μπορεί να παραχθεί κατά την αποικοδόμηση του αμινοξέος λευκίνη (Aaslyng & Schafer, 2008). Παρακάτω, αναλύονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των αλδεϊδών.

1) Οι αλδεΐδες 2-μεθυλοβουτανάλη και 3-μεθυλοβουτανάλη ανευρίσκονται στο μη εμβολιασμένο κρέας και σε όλες τις περιπτώσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων κρέατος. Η ποσότητα της 2-μεθυλοβουτανάλης κατά την συντήρηση της αερόβια στους 4°C αυξάνεται ενώ το αντίθετο παρατηρείται στους 10°C. Κατά τη συντήρηση σε MAP, παρουσιάζει μεικτή τάση. Στους 10°C για τις μονοκαλλιέργειες των *P. putida*, *Ln. mesenteroides* και *L. sakei* η αλδεΐδη αυτή μετά το μέσο του χρόνου συντήρησης δεν ανιχνεύεται. Επιπροσθέτως, η ποσότητα της 3-μεθυλοβουτανάλης μειώνεται κατά τη συντήρηση σε MAP ενώ κατά την αερόβια συντήρηση παρουσιάζει αυξομειώσεις.

2) Η ακεταλδεΐδη και η βενζαλδεΐδη ανιχνεύθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις στείρου μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου κρέατος με μικρές αυξομειώσεις στις ποσότητες τους.

3) Η επόμενη ομάδα αποτελούταν από 6 αλδεΐδες, τις φαινυλακεταλδεΐδη, τρανς-εξαν-2-άλη, επταν-2-άλη (E)επταν-2,4-διενάλη, δεκεν-2-άλη E, εντεκανάλη και δωδεκανάλη. Οι ουσίες αυτές δεν ανευρέθηκαν στο μη εμβολιασμένο φιλέτο κρέατος σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από τις επταν-2,4-διενάλη και δεκεν-2-άλη E που ανιχνεύθηκαν στο μη εμβολιασμένο φιλέτο κρέατος

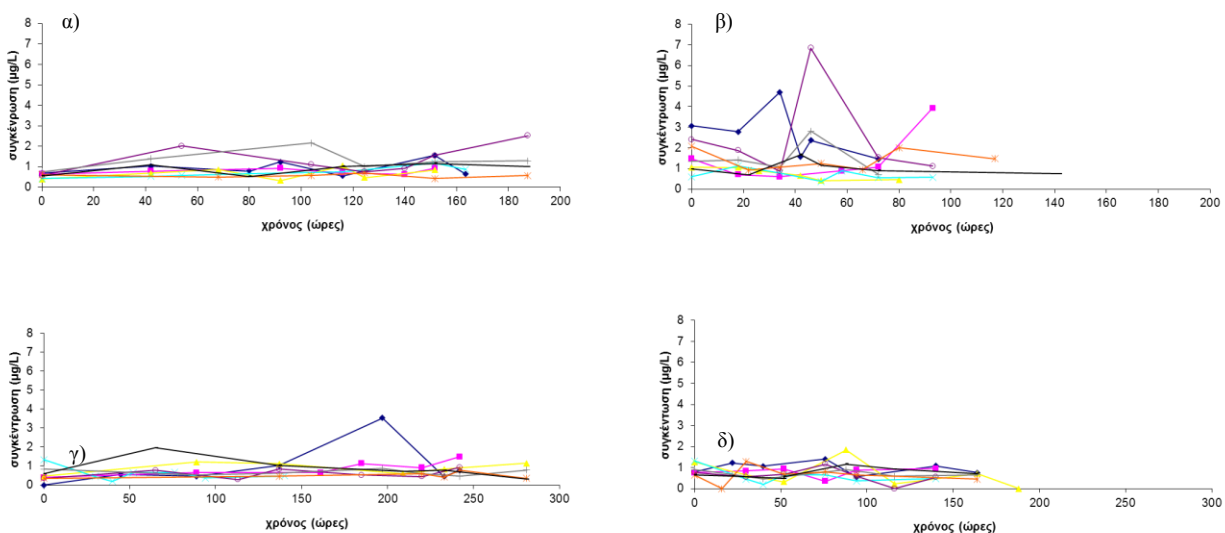
μετά από 42 ώρες συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 10°C και η ουσία δωδεκανάλη, η οποία ανιχνεύθηκε σε θερμοκρασία 4°C μετά από 151 ώρες συντήρησης του μη εμβολιασμένου δείγματος σε αερόβιες συνθήκες. επτεν-2-άλη (E) επτεν-2-άλη (E). Η φαινυλακεταλδεΰδη σε θερμοκρασία 4°C σε αερόβιες συνθήκες ανιχνεύθηκε μόνο στην περίπτωση του δείγματος που είχε εμβολιαστεί με *Ln. mesenteroides*. Σε θερμοκρασία 10°C δεν βρέθηκε στην περίπτωση του μη εμβολιασμένου δείγματος και στη περίπτωση εμβολιασμού με τη συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών. Σε συνθήκες MAP δεν ανιχνεύθηκε σε καμία περίπτωση. Η τρανς-εξαν-2-άλη βρέθηκε σε θερμοκρασία 10°C σε φρέσκα δείγματα που ήταν εμβολιασμένα με τις ψευδομονάδες σε αερόβιες συνθήκες. Η επταν-2,4-διενάλη στη συντήρηση σε MAP δεν βρέθηκε σε θερμοκρασία 4°C σε καμία περίπτωση των εμβολιασμένων φιλέτων κρέατος. Αντίθετα, σε θερμοκρασία 10°C, ανιχνεύθηκε στις περιπτώσεις πολύ αλλοιωμένων δειγμάτων για *P. putida*, *Ln. mesenteroides*, συγκαλλιέργεια ψευδομονάδων και των 4 μικροοργανισμών. Στην αερόβια συντήρηση σε θερμοκρασία 4°C ανιχνεύθηκε σε αλλοιωμένα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με *Ln. mesenteroides* και με συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων. Σε θερμοκρασία 10°C η αλδεΰδη αυτή βρέθηκε σε όλες τις περιπτώσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων. Η δεκεν-2-άλη E παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C όπου ανιχνεύεται μόνο στην περίπτωση των μονοκαλλιεργείων των γαλακτικών βακτηρίων, ενώ σε θερμοκρασία 10°C βρέθηκε σε όλες τις περιπτώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων. Τέλος οι αλδεΰδες εντεκανάλη και δωδεκανάλη δεν ανιχνεύθηκαν σε καμία περίπτωση κατά τη συντήρηση σε MAP στις 2 θερμοκρασίες.

4) Τέλος, 11 ακόμη αλδεΰδες (πεντανάλη, εξανάλη, επτανάλη, επτεν-2-άλη (E), οκτανάλη, τρανς-οκτεν-2-άλη, εννεανάλη, εννεαν-2,4,διάλη E,E, δεκανάλη, δεκαν-2,4-διενάλη και το ισομερές της) ανιχνεύθηκαν, οι οποίες παρουσίασαν μεικτή τάση κατά την συντήρηση των δειγμάτων κρέατος. Ειδικότερα, η εξανάλη παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα κατά την αρχή της συντήρησης κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη της αλδεΰδης αυτής στο κρέας ως προϊόν οξείδωσης του ελαϊκού οξέος του χοιρινού κρέατος (Insausti et al., 2002).

Κετόνες

Οι κετόνες που ανιχνεύθηκαν παρουσίασαν μεικτό προφίλ σε κάθε περίπτωση συσκευασίας και θερμοκρασίας. Κάποια αρνητικά κατά Gram βακτήρια (π.χ. *Pseudomonas*,

Shewanella, *Moraxella*) καθώς και ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) έχουν βρεθεί ότι παράγουν ακετοΐνη και διακετύλιο (Nychas et al., 2007, Tsigarida & Nychas, 2001). Οι κετόνες που ανιχνεύθηκαν στον χοιρινό φιλέτο (επταν-2-όνη, οκταν-2,5-διόνη, εννεανόνη, βουταν-2-όνη) είναι πιθανό να προέρχονται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων, εξαιτίας της αυτοοξείδωσης, ή της ενζυματικής α - και β - οξείδωσης (Ercolini et al., 2009, Leroy et al., 2009, Yu et al., 2008). Τέλος, η βουταν-2-όνη έχει αναφερθεί πως παράγεται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια (π.χ. *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*) (Nychas et al., 2007).



Εικόνα 5.3.10.: Μεταβολή της ακεταλδεϋδης σε α) αέρα στους 4 °C, β) αέρα στους 10 °C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης γλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ×: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

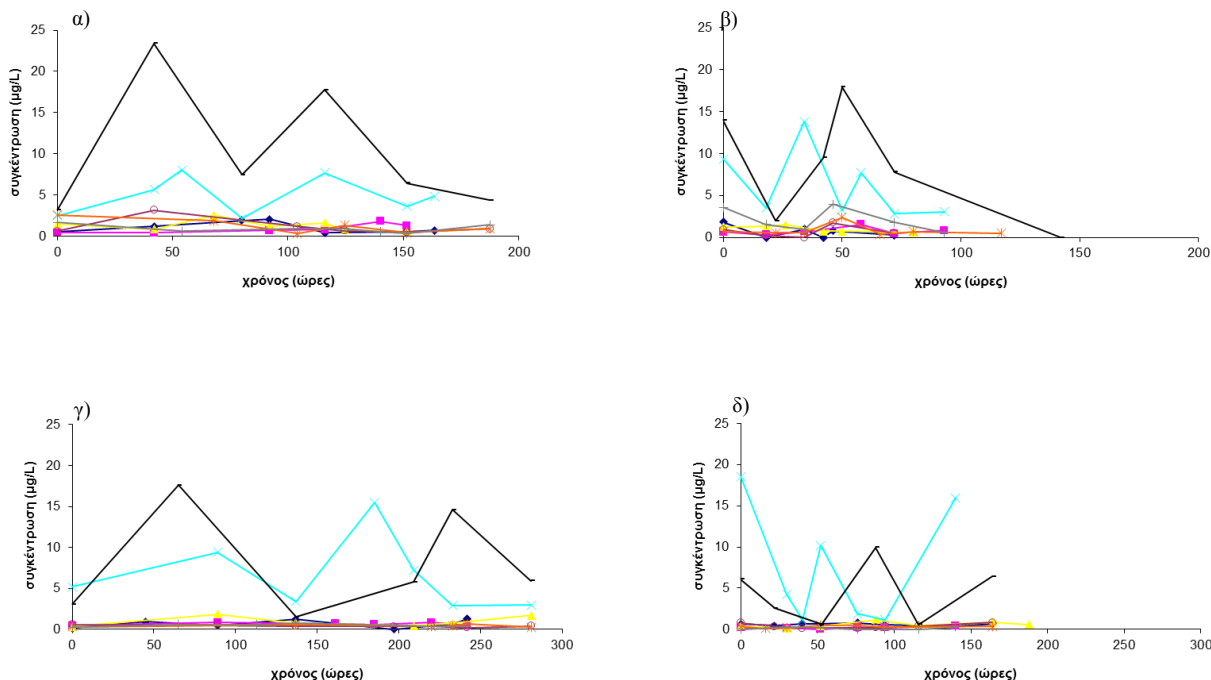
1) Η πρώτη ομάδα αποτελούταν από πέντε κετόνες τις 1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη, 2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη, εξαν-2-όνη, 5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη και οκτ-3-εν-2-όνη. Οι κετόνες 1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη, 2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη, εξαν-2-όνη, 5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη, δεν ανευρίσκονται στο στείρο κρέας στους 4 και στους 10°C στην αερόβια αλλοίωση ενώ η κετόνη οκτ-3-εν-2-όνη δεν ανιχνεύθηκε στο στείρο κρέας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η 5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη παρουσίασε διαφορετική συμπεριφορά στα δείγματα που συντηρούνταν σε αερόβιες συνθήκες από τα αντίστοιχα σε MAP. Έτσι, η κετόνη αυτή δεν ανιχνεύθηκε στα

εμβολιασμένα δείγματα κρέατος στην αερόβια αλλοίωση. Η οκτ-3-εν-2-όνη δεν ανιχνεύθηκε στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στις 2 θερμοκρασίες όπως επίσης στην αερόβια συσκευασία δεν ανιχνεύθηκε στις περιπτώσεις εμβολιασμού με την συγκαλλιέργεια της ψευδομονάδας και με το κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών σε θερμοκρασία 4°C. Οι υπόλοιπες κετόνες εμφάνισαν μεικτό προφίλ για την κάθε περίπτωση.

2) Η επόμενη ομάδα περιλάμβανε τις κετόνες επταν-2-όνη, 6-μεθυλοεπταν-2-όνη, οκταν-2-όνη, οκταν-3-όνη και την εννεαν-2-όνη. Οι κετόνες παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ ανάλογα με τον μικροοργανισμό που έχει εμβολιαστεί το κρέας και τις συνθήκες συντήρησης. Ενδεικτικά, η 6-μεθυλοεπταν-2-όνη δεν ανιχνεύεται στους 4°C στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας με τους 4 μικροοργανισμούς και στις μονοκαλλιέργειες με *P. putida*, *Ln. mesenteroides*, *L. sakei* στην αερόβια συντήρηση, στους 10°C στην αερόβια συντήρηση δεν ανιχνεύεται για το στείρο φιλέτο, και για τις μονοκαλλιέργειες με *P. fragi*, *P. putida*, *Ln. mesenteroides*, *L. sakei* και την συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων.

3) Οι κετόνες ακετόνη, 2-βουτανόνη, διακετύλιο (βουτανο-2,3-διόνη), ακετοΐνη (3-υδρόξυβουταν-2-όνη), πενταν-2-όνη, πενταν-2,3-διόνη, οκτ-1-εν-3-όνη, ακετοφαινόνη, 6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη και οκταν-2,5-διόνη, παρουσιάζουν αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις τους σε όλες τις περιπτώσεις θερμοκρασίας και συσκευασίας χωρίς κάποια ιδιαίτερη τάση για το μη εμβολιασμένο ή το εμβολιασμένο χοιρινό φιλέτο.

4) Η ακετόνη του γερανυλεστέρα ήταν παρούσα σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από το δείγμα κρέατος που είχε εμβολιαστεί με *P. fragi* και είχε συντηρηθεί στους 10°C αερόβια.



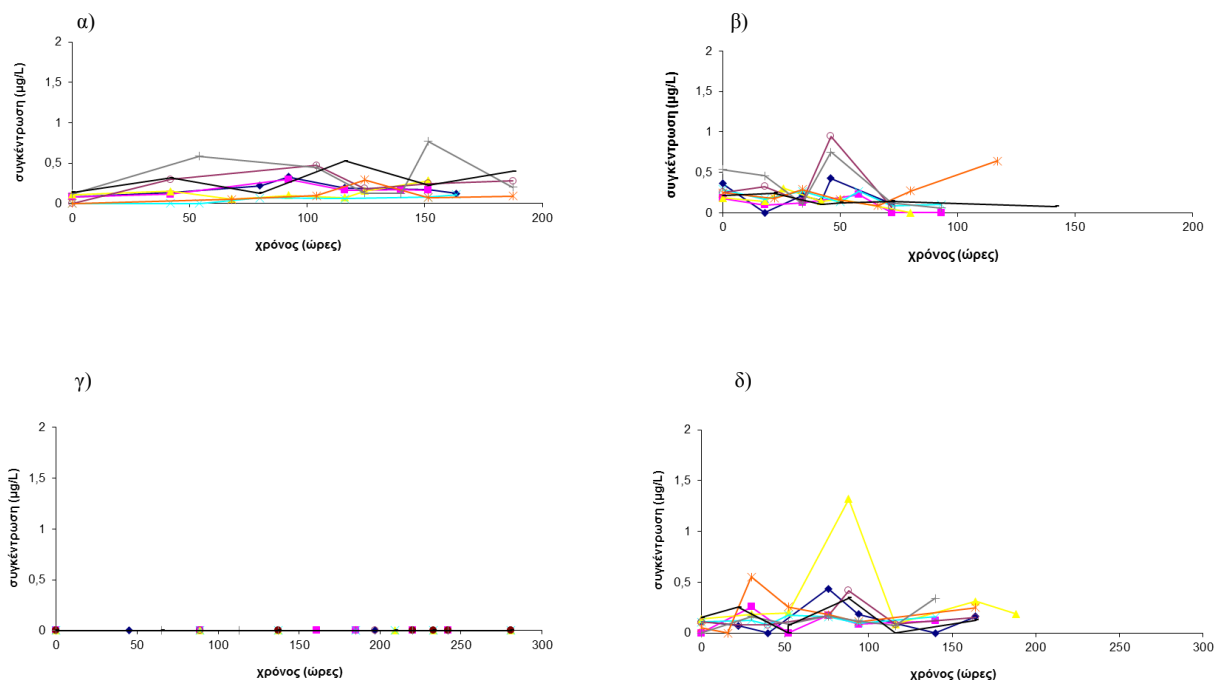
Εικόνα 5.3.11.: Μεταβολή της ακετοΐνης σε α) αέρα στους 4 °C, β) αέρα στους 10 °C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης χλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

Εστέρες

Η ομάδα των εστέρων που ανιχνεύθηκε περιείχε 24 ενώσεις. Κατά τους Insausti et al., (2002) οι εστέρες παράγονται μετά από εστεροποίηση διαφόρων αλκοολών και καρβοξυλικών οξέων τα οποία υπάρχουν στο βόειο κρέας. Οι Ercolini et al., (2009) αναφέρουν πως εξαιτίας της δραστηριότητας της μικροβιακής εστεράσης σχηματίζονται αιθυλεστέρες μέσω της εστεροποίησης των αλκοολών και των καρβοξυλικών οξέων. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί των γενών *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella* είναι ικανοί να παράγουν μέθυλ- και αίθυλ- εστέρες (Nychas et al., 2007). Οι εστέρες που ανιχνεύθηκαν στο στείρο και στο εμβολιασμένο φιλέτο κρέατος, παρουσιάζονται παρακάτω. Από τα αποτελέσματα, φαίνεται πως οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των εστέρων εξαρτώνται από τη θερμοκρασία και την συσκευασία. Στην Εικόνα 5.3.12, παρουσιάζεται η μεταβολή του εξανοϊκού μεθυλεστέρα κατά τη συντήρηση μη

εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου σε αέρα και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στις δύο θερμοκρασίες.

1) Η πρώτη ομάδα περιείχε 8 εστέρες, τους αιθυλ-2-βουτυλαιθέρα, 2-μεθυλοπεντανοϊκό αιθυλεστέρα, οξικό αμυλεστέρα, οξικό εξυλεστέρα, επτανοϊκό αιθυλεστέρα, επτανοϊκός αλλυλεστέρας, άγνωστο εστέρα (1096), οξικό τερπινυλεστέρα. Οι παραπάνω εστέρες παρατηρούνται κυρίως στις μονοκαλλιέργειες της αερόβιας αλλοίωσης στους 10°C ενώ στη συντήρηση σε MAP μόνο ο οξικός εξυλεστέρας παρατηρείται σε όλα τα δείγματα εκτός από το μη εμβολιασμένο δείγμα κρέατος.



Εικόνα 5.3.12: Μεταβολή του εξανοϊκού μεθυλεστέρα σε α) αέρα στους 4 °C, β) αέρα στους 10 °C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης γλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, x: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

2) Η δεύτερη ομάδα αποτελούταν από τους οξικό μεθυλεστέρα, οξικό αιθυλεστέρα, οξικό βουτυλεστέρα, βουτανοϊκό αιθυλεστέρα, αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικό αιθυλεστέρα, αιθυλ-3-μεθυλοβουτυρικό αιθυλεστέρα, πεντανοϊκό αιθυλεστέρα, εξανοϊκό αιθυλεστέρα, ισοβουτυρικό αιθυλεστέρα και οκτανοϊκό αιθυλεστέρα. Οι εστέρες οξικός μεθυλεστέρας, οξικός αιθυλεστέρας,

οξικός βουτυλεστέρας, βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, εξανοϊκός αιθυλεστέρας, οκτανοϊκός αιθυλεστέρας ανευρίσκονται σε όλες τις περιπτώσεις μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου κρέατος. Οι υπόλοιποι 4 εστέρες δεν ανευρίσκονται στα δείγματα που συντηρούνται σε MAP, ενώ στην αερόβια συντήρηση ανιχνεύονται στο στείρο κρέας και στα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με τα γαλακτικά βακτήρια.

3) Η επόμενη ομάδα (γαλακτικός αιθυλεστέρας, προπανοϊκός αιθυλεστέρας, οξικός ισοαμυλεστέρας, βουτανοϊκός μεθυλεστέρας) παρουσίασε διαφορές μεταξύ των συσκευασιών. Οι εστέρες δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα με την *P. fragi* που ήταν συσκευασμένα αερόβια στους 4°C ενώ ο γαλακτικός αιθυλεστέρας δεν βρέθηκε ούτε στο δείγμα με τη συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών στις ίδιες συνθήκες. Στη συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ο βουτανοϊκός μεθυλεστέρας δεν ανιχνεύεται για καμία περίπτωση στείρου και εμβολιασμένου φιλέτου στους 4°C ενώ οι υπόλοιποι 3 εστέρες παρουσιάζουν μικτές τάσεις.

4) Οι εξανοϊκός μεθυλεστέρας (Εικόνα 5.3.12) και δεκανοϊκός αιθυλεστέρας δεν ανευρίσκονται στην συντήρηση σε MAP στους 4°C. Στους 10°C, ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας ανιχνεύθηκε μόνο στη περίπτωση της *P. fragi*. Κατά την αερόβια συντήρηση, ο εστέρας αυτός είναι παρόν στην περίπτωση του εμβολιασμένου δείγματος με *P. fragi* στους 4°C ενώ στους 10°C ανιχνεύθηκε στα δείγματα με *P. fragi* και συγκαλλιέργειας *P. fragi* με *P. putida*. Ο εξανοϊκός μεθυλεστέρας στην αερόβια συντήρηση σε θερμοκρασίες 4 και 10°C και σε θερμοκρασία 10°C σε MAP παρουσιάζει αύξηση και στη συνέχεια μείωση της συγκέντρωσης του μέχρι την αλλοίωση των δειγμάτων.

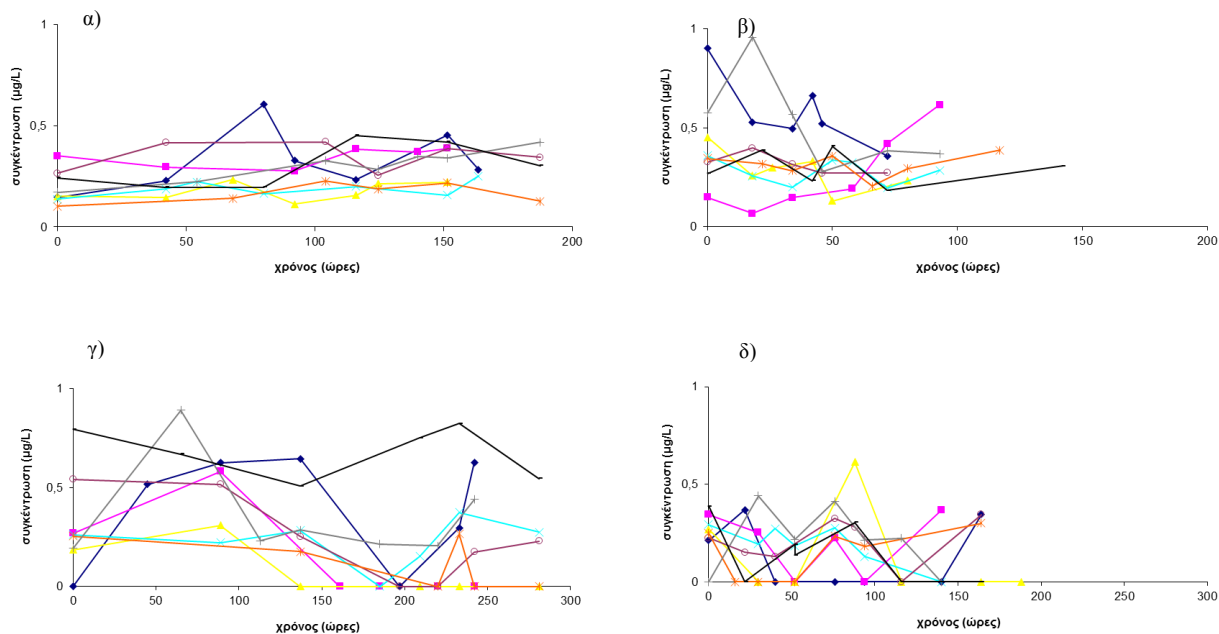
Υδρογονάνθρακες

Η ομάδα των υδρογονανθράκων που ανιχνεύθηκε περιείχε 61 ενώσεις. Σε γενικές γραμμές, οι υδρογονάνθρακες παρουσιάζουν μια παρόμοια μεικτή τάση, με κάποιους να είναι παρόντες μόνο στα δείγματα που διατηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ενώ στα δείγματα της αερόβιας αλλοίωσης ήταν σε ίχνη ή δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου. Είναι πιθανό οι υδρογονάνθρακες που ανιχνεύθηκαν μόνο στη περίπτωση του MAP να προέρχονται από το υλικό συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα, καθώς οι Jackson et al., (1992) αναφέρουν

πως οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση άδειας συσκευασίας MAP με GC/MS ήταν κυρίως ευθείες αλυσίδες υδρογονανθράκων.

Τερπένια

Όλα τα τερπένια που ανιχνεύθηκαν έδωσαν μεικτό προφίλ για τα δείγματα του μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου φιλέτου κρέατος. Εντοπίστηκαν 21 ενώσεις, οι λιβανούλη, καρβακρόλη, L-μενθόλη, 3-καρένιο, α-φαιλανδρένιο, α-πινένιο, β-πινένιο, α-τερπινένιο, α-θουσένιο, καμφένιο, καμφορά, κυμένιο, ευκαλυπτόλη, γ-τερπινένιο, λεμονένιο, μυρκένιο, β-cis-οκιμένιο, π-κυμένιο, σαβινένιο, τερπινολένιο και ισομερές του π-κυμενίου. Πιο συγκεκριμένα, τα α-φαιλανδρένιο και β-cis-οκιμένιο παρατηρήθηκαν σε ίχνη ή μικρές ποσότητες σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης ενώ τα α-πινένιο, π-κυμένιο και λεμονένιο βρέθηκαν να έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπρόσθετα, η καρβακρόλη ανιχνεύθηκε κυρίως κατά την αερόβια συντήρηση. Στους 10°C βρέθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ενώ στους 4°C δεν ανιχνεύθηκε στην συγκαλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων. Στην συντήρηση σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, στους 4°C ανιχνεύθηκε μόνο στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας των γαλακτικών βακτηρίων ενώ στους 10°C δεν ανευρίσκεται. Η λιβανούλη (Εικόνα 5.3.13) κατά τη συντήρηση σε αέρα (εκτός από την περίπτωση της *P. putida* σε θερμοκρασία 10°C) μειώθηκε ενώ κατά τη συντήρηση σε MAP παρουσίασε μεικτή τάση.



Εικόνα 5.3.13.: Μεταβολή της λινανοόλης σε α) αέρα στους 4 °C, β) αέρα στους 10 °C, γ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C και δ) τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 10°C του στείρου ιστού κρέατος και της εμβολιασμένης χλωρίδας. -: στείρος ιστός κρέατος, ◆: *Pseudomonas fragi*, ■: *P. putida*, ▲: *P. fragi* και *P. putida*, +: *Leuconostoc mesenteroides*, ○: *Lactobacillus sakei*, ★: *L. sakei* και *Ln mesenteroides*, ×: κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών

Διάφορες ενώσεις

16 ενώσεις δεν ομαδοποιήθηκαν ή δεν κατέσσει δυνατόν να ταυτοποιηθούν αξιόπιστα σύμφωνα με τη βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε. Οι ενώσεις που βρέθηκαν ήταν οι διθειάνθρακας, διμέθυλο σουλφίδιο, διχλωρομεθάνιο, 1,2-διαιθόξυαιθάνιο, 2-μεθυλοφουράνιο, 2-αιθυλοφουράνιο, 2-πεντυλοφουράνιο, τετραϋδρο-2,2,5,5,τετραμεθυλοφουράνιο, n-βουτυλοφουράνιο, βενζοθειαζόλη, τριχλωρομεθάνιο και 5 άγνωστες. Από τις παραπάνω ουσίες, οι τετραϋδρο-2,2,5,5,τετραμεθυλοφουράνιο και 3 άγνωστες ουσίες, ανιχνεύονται σε ίχνη ή δεν ανιχνεύονται καθόλου στην αερόβια συντήρηση. Οι υπόλοιπες ουσίες εμφανίζουν μεικτό προφίλ σε όλες τις περιπτώσεις. Οι ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως το διμέθυλο σουλφίδιο, μπορεί να προέρχονται από θειούχα αμινοξέα (κυστεΐνη, μεθειονίνη) (Insausti et al., 2002).

5.3.2.2. Αξιολόγηση των σημαντικότερων πτητικών ενώσεων

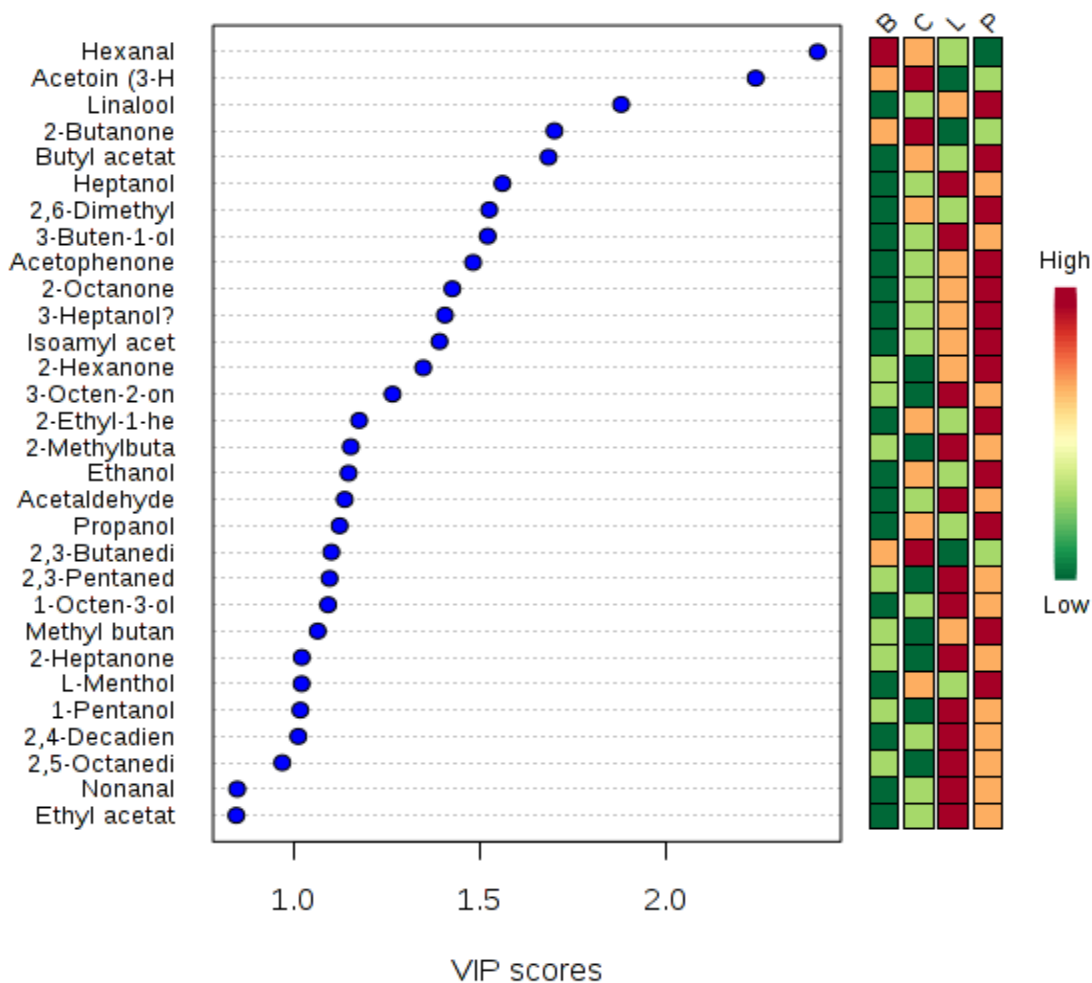
Μια περαιτέρω προσέγγιση στην ανάλυση των πτητικών ενώσεων που εντοπίστηκαν με την GC/MS έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) ώστε να διερευνηθούν οι συσχετίσεις των ουσιών με τις ομάδες των μικροοργανισμών που είχαν εμβολιαστεί αλλά και με το στείρο (μη εμβολιασμένο) φιλέτο κρέατος. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι όπως, η ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way-anova) με σύγκριση των μέσων όρων με τη μέθοδο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher, θερμικά διαγράμματα (heatmaps) και PLS-DA για τις πτητικές ουσίες και την κάθε ομάδα μικροοργανισμού που εμβολιάστηκε στο δείγμα (το δείγμα χωρίστηκε σε 4 ομάδες μικροοργανισμών, στείρο, «B», «εμβολιασμένο με ψευδομονάδες, «P», εμβολιασμένο με γαλακτικά βακτήρια, «L» και εμβολιασμένο με τους 4 μικροοργανισμούς, «C»).

5.3.2.2.1. Αερόβια συντήρηση στους 4°C

Στην αερόβια συντήρηση στους 4°C η *P. fragi* καθώς και οι συγκαλλιέργειες των ψευδομονάδων ήταν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στον Πίνακα 5.3.9 παρουσιάζονται οι πτητικές ουσίες που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές μετά από ανάλυση διακύμανσης. 10 αλκοόλες, 11 αλδεΐδες, 12 κετόνες, 1 τερπένιο και 3 εστέρες βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικοί και να παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των ομάδων των μικροοργανισμών. Αναλυτικότερα, η 3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη παρόλο που ανευρίσκεται σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε να έχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των στείρων δειγμάτων και των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με γαλακτικά βακτήρια και ψευδομονάδες. Αντίστοιχα, οι ουσίες προπανόλη, 2-αιθυλοεξαν-1-όλη, 2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη, οκταν-2-όνη και οξικός βουτυλεστέρας βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με τις ψευδομονάδες με τα στείρα δείγματα και αυτά τα οποία είχαν εμβολιαστεί με γαλακτικά βακτήρια.

Πίνακας 5.3.9: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 4°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)

Πητικές ενώσεις	Τιμή α	Fisher's LSD
Προπανόλη	0,0461	P - B; P - L
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	0,0050	L - B; P - B
Ισοβουτανόλη	0,0084	C - B; C - L; C - P
Πεντανόλη	0,0000	L - B; L - C; P - C; L - P
Πεντ-1-εν-3-όλη	0,0033	L - B; L - C; L - P
2-αιθυλοεξαν-1-όλη	0,0438	P - B; P - L
Επτανόλη	0,0003	C - B; L - B; P - B
2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	0,0111	P - B; P - L
Οκταν-1-όλη	0,0339	C - B; L - B; P - B
Οκτ-1-εν-3-όλη	0,0010	L - B; L - C; P - C; L - P
Λινανόλη	0,0022	L - B; P - B; P - C
Ακεταλδεϋδη	0,0060	C - B; L - B; P - B
Βενζαλδεϋδη	0,0000	L - B; L - C; L - P
2-μεθυλοβουτανάλη	0,0086	L - B; L - C; P - C
Πεντανάλη	0,0240	L - B; L - C; L - P
Εξανάλη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Επτεν-2-άλη E	0,0025	L - B; L - C; L - P
τρανς-οκτεν-2-άλη	0,0013	L - B; L - C; L - P
Εννεανάλη	0,0429	L - B; P - B
εννεαν-2,4,διάλη E,E	0,0006	L - B; L - C; L - P
Δεκανάλη	0,0191	C - B; C - P
Δεκαν -2,4-διενάλη	0,0088	L - B; L - C
Βουταν-2-όνη	0,0000	C - B; B - L; B - P; C - L; C - P
Ακετοΐνη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Διακετύλιο	0,0000	C - B; C - L; C - P
Ακετοφαινόνη	0,0325	P - B
Πενταν-2,3-διόνη	0,0015	L - B; L - C; P - C
Εξαν-2-όνη	0,0443	P - C
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	0,0297	C - B; C - P
Οκταν-2,5-διόνη	0,0012	L - B; L - C; P - C
Οκταν-2-όνη	0,0067	P - B; P - C; P - L
Οκταν-3-όνη	0,0093	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκτ-1-εν-3-όνη	0,0009	L - B; L - C; L - P
Ακετόνη του γερανυλεστέρα	0,0171	C - B; C - L; C - P
Οξικός βουτυλεστέρας	0,0019	P - B; P - C; P - L
Εξανοϊκός αιθυλεστέρας	0,0038	L - C; P - C; L - P
Γαλακτικός αιθυλεστέρας	0,0179	B - C; L - C; P - C



Εικόνα 5.3.14: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 4°C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για το μη εμβολιασμένο κρέας και για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση)

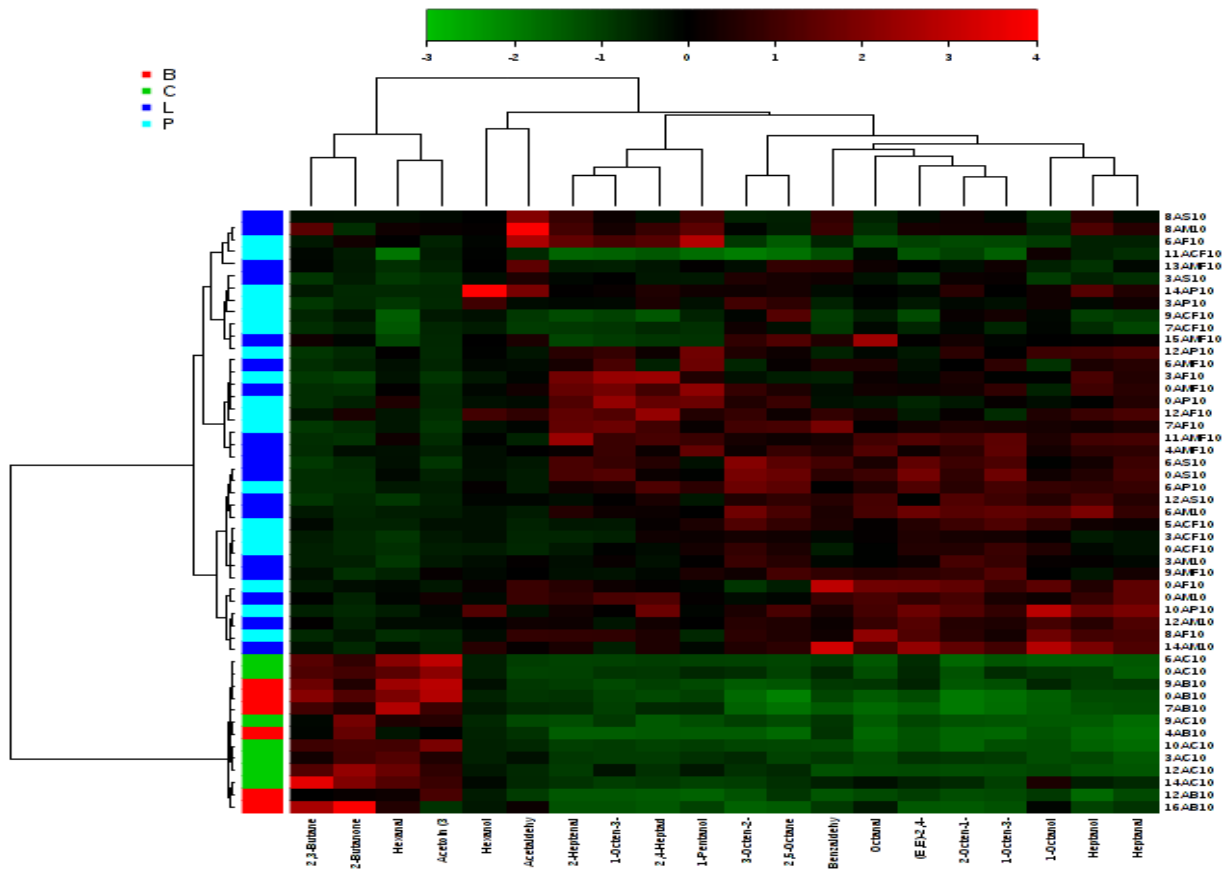
Από την ανάλυση με PLS-DA φαίνεται πως η εξανάλη είναι η πτητική ένωση που διαφοροποιεί περισσότερο τα μη εμβολιασμένα δείγματα ενώ οι ουσίες ακετοΐνη, διακετύλιο και βουταν-2-όνη, διαφοροποιούν τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με το κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών. 13 πτητικές ενώσεις διαφοροποιούν τις ψευδομονάδες κυρίως αλκοόλες και κετόνες ενώ 13 ενώσεις διαφοροποιούν τα γαλακτικά βακτήρια οι οποίες είναι κυρίως αλδεΐδες και αλκοόλες (Εικόνα 5.3.14).

5.3.2.2.2. Αερόβια συντήρηση στους 10°C

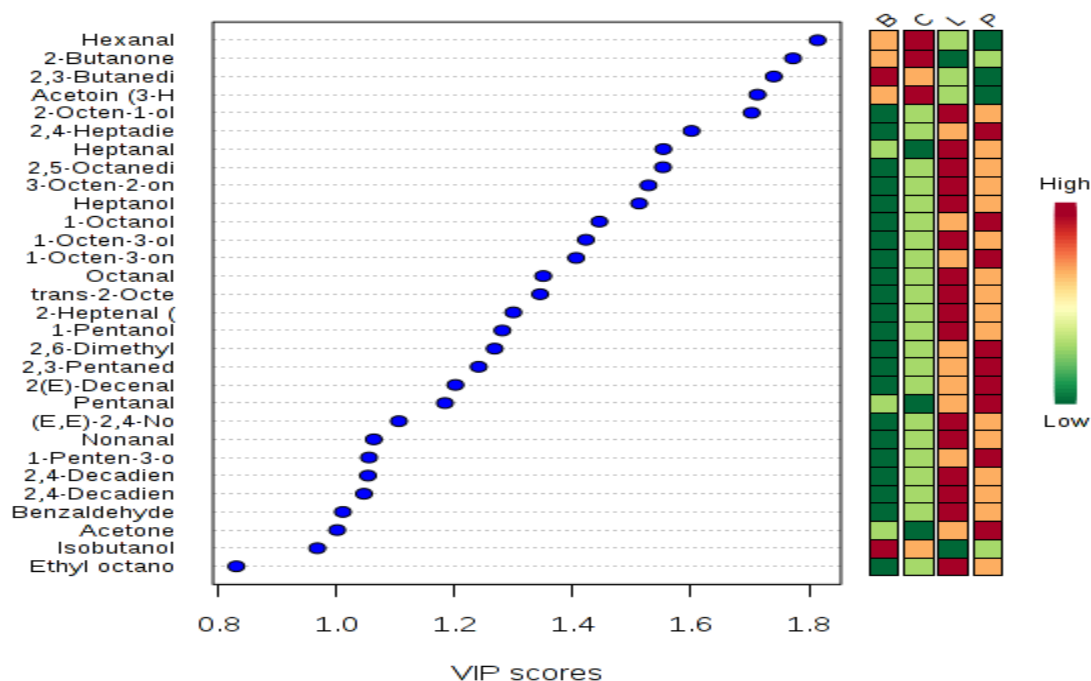
Κατά την αερόβια συντήρηση στους 10°C όλοι οι μικροοργανισμοί έφτασαν σε υψηλό τελικό πληθυσμό. Οι πτητικές ενώσεις που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές κατά την αερόβια συντήρηση στους 10°C ήταν 11 αλκοόλες, 13 αλδεΐδες, 8 κετόνες και 3 εστέρες. Οι ουσίες πεντ-1-εν-3-όλη ακετόνη 2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη ήταν στατικώς σημαντικές για την διάκριση των ψευδομονάδων με τις άλλες ομάδες. Οι ουσίες πενταν-1-όλη, επτανόλη, οκταν-1-όλη, πεντανάλη, επτανάλη, επτεν-2-άλη (E), επταν-2,4-διενάλη, οκτανάλη, πενταν-2,3-διόνη, οκτ-1-εν-3-όνη, οκταν-2,5-διόνη, οκτ-3-εν-2-όνη και οκτανοϊκός αιθυλεστέρας διαφοροποιούν τα δείγματα κρέατος που έχουν εμβολιαστεί με γαλακτικά βακτήρια και με ψευδομονάδες από τα αντίστοιχα στείρα δείγματα και τα δείγματα με το κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών, αλλά δεν διαφοροποιούν τα δείγματα μεταξύ των ψευδομονάδων και των γαλακτικών βακτηρίων. Οι παραπάνω ουσίες ανευρίσκονται σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος. Οι ουσίες εξανάλη ακετοΐνη, διακετύλιο και βουταν-2-όνη έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά για τα μη εμβολιασμένα δείγματα και για τα αντίστοιχα με την συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών. Αντίστοιχα αποτελέσματα έφερε η ανάλυση με PLS-DA (Εικόνα 5.3.16). Στην Εικόνα 5.3.15 παρουσιάζεται το διάγραμμα θερμικής απεικόνισης μετά από δένδρογραμμα ιεραρχικής ομαδοποίησης μεταξύ 20 πιο σημαντικών πτητικών ουσιών και των ομάδων των μικροοργανισμών. Φαίνεται πως οι μικροοργανισμοί διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες συστάδες (cluster). Η μία συστάδα αποτελείται από τα στείρα μη εμβολιασμένα δείγματα και από τη συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών ενώ η άλλη ομάδα, από τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με τις ψευδομονάδες και από τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με τα γαλακτικά βακτήρια. Οι πτητικές ενώσεις που έχουν τη υψηλότερη συσχέτιση με την πρώτη ομάδα (στείρα και κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών) είναι οι ουσίες εξανάλη ακετοΐνη, διακετύλιο και βουταν-2-όνη ενώ οι υπόλοιπες ουσίες έχουν υψηλή έκφραση με την δεύτερη ομάδα. Αναλυτικότερα, η ακεταλδεΐδη και η βενζαλδεΐδη παρουσιάζουν υψηλότερη συσχέτιση με την ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων, ενώ η εξανόλη έχει την υψηλότερη συσχέτιση με δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με ψευδομονάδες και βρίσκονται προς το τέλος της διάρκεια ζωής του δείγματος.

Πίνακας 5.3.10: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 10°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)

Πτητικές ενώσεις	Τιμή α	Fisher's LSD
Βουταν-2-όλη	0,0023	B - L; C - L; P - L
Ισοβουτανόλη	0,0127	B - L; B - P
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	0,0097	C - B; L - B; P - B
Πενταν-1-όλη	0,0001	L - B; P - B; L - C; P - C
Πεντ-1-εν-3-όλη	0,0292	P - B; P - C
Εξαν-2-όλη	0,0107	B - L; B - P; C - L
Επτανόλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκταν-1-όλη	0,0001	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκτ-1-εν-3-όλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C; L - P
Οκτ-2-εν-1-όλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C; L - P
2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	0,0004	P - B; P - C; P - L
Ακεταλδεϋδη	0,0138	L - B; L - C
Βενζαλδεϋδη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C; L - P
Πεντανάλη	0,0016	L - B; P - B; L - C; P - C
Εξανάλη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Επτανάλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Επτεν-2-άλη (E)	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Επταν-2,4-διενάλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκτανάλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Τρανς-οκτεν-2-άλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Εννεανάλη	0,0002	L - B; P - B; L - C; P - C
εννεαν-2,4,διάλη E,E	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Δεκεν-2-άλη E	0,0014	L - B; P - B; L - C; P - C
Δεκαν-2,4-διενάλη	0,0014	L - B; P - B; L - C
Ισομερές της δεκαν-2,4-διενάλης	0,0065	L - B; P - B; L - C
Ακετόνη	0,0048	P - B; P - C; P - L
Ακετοΐνη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Διακετύλιο	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Βουταν-2-όνη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Πενταν-2,3-διόνη	0,0029	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκτ-1-εν-3-όνη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκταν-2,5-διόνη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκτ-3-εν-2-όνη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	0,0019	L - B; P - B; L - C; P - C
Οξικός ισοαμυλεστέρας	0,0076	L - P
Εξανοϊκός αιθυλεστέρας	0,0114	L - B; L - C; L - P



Εικόνα 5.3.15: Διάγραμμα θερμικής απεικόνισης για τα δείγματα που συντηρήθηκαν αερόβια στους 10°C. Το πράσινο χρώμα σημαίνει χαμηλή συσχέτιση ενώ το κόκκινο χρώμα σημαίνει υψηλή συσχέτιση μεταξύ πτητικών ουσιών και των ομάδων των μικροοργανισμών (στείρα μη εμβολιασμένα δείγματα, δείγματα εμβολιασμένα με γαλακτικά βακτήρια, ψευδομονάδες και κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών)

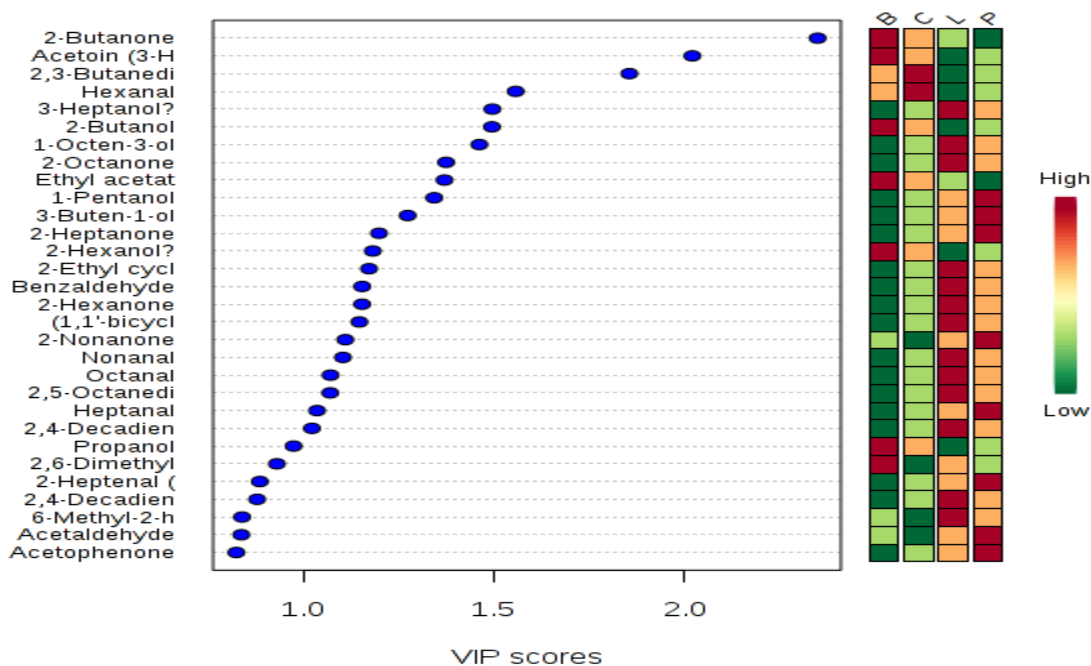


Εικόνα 5.3.16: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την αερόβια συντήρηση στους 10°C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση).

5.3.2.2.3. Συντήρηση σε MAP στους 4°C

Κατά την συντήρηση στους 4°C σε MAP, οι μονοκαλλιέργειες των ψευδομονάδων παρουσίασαν εκτεταμένη φάση προσαρμογής και διατηρήθηκαν σε χαμηλούς πληθυσμούς όπως έχει ήδη σχολιαστεί παραπάνω. Οι ουσίες που θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μετά από ανάλυση της διακύμανσης φαίνονται στον Πίνακα 5.3.11. Συγκριτικά με την αερόβια αλλοίωση, οι ουσίες που προσδιορίστηκαν είναι αριθμητικά λιγότερες και ένα μεγάλο ποσοστό των πτητικών ενώσεων είναι διαφορετικό από το αντίστοιχο της αερόβιας συντήρησης. Έτσι, οι πτητικές ενώσεις επταν-3-όλη, 2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη, 1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη, 5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη, επταν-2-όνη, 6-μεθυλοεπταν-2-όνη και οξικός αιθυλεστέρας βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές στην περίπτωση της συντήρησης σε MAP στους 4°C ενώ το ίδιο δε παρατηρήθηκε για τις ουσίες αυτές κατά την αερόβια συντήρηση στις δύο θερμοκρασίες. Οι ουσίες βουταν-2-όλη, εξαν-2-όλη, 2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη, οξικός αιθυλεστέρας και οξικός βουτυλεστέρας

φαίνεται να διαφοροποιούν τα μη εμβολιασμένα δείγματα από όλες τις άλλες περιπτώσεις. Επίσης, οι πτητικές ουσίες εξανάλη, βουταν-2-όνη, διακετύλιο, ακετοΐνη, οκταν-2-όνη, οκταν-2,5-διόνη διαφοροποιούν τα μη εμβολιασμένα δείγματα από τα αντίστοιχα που είχαν εμβολιαστεί με τις ψευδομονάδες ή τα γαλακτικά βακτήρια όπως επίσης, τα δείγματα με την συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών με αυτά που είχαν εμβολιαστεί με τις ψευδομονάδες ή τα γαλακτικά βακτήρια αλλά όχι τα μη εμβολιασμένα από τα δείγματα με την συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών. Στην ανάλυση με PLS-DA (Εικόνα 5.3.17) οι ουσίες που βρέθηκαν να σχετίζονται περισσότερο με τα μη εμβολιασμένα δείγματα ήταν περισσότερες από τις αντίστοιχες που είχαν προσδιοριστεί κατά την αερόβια συντήρηση του κρέατος. Έτσι, οι αλκοόλες προπανόλη, βουταν-2-όλη, πενταν-1-όλη, εξαν-2-όλη, 2,6, διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη και ο οξικός αιθυλεστέρας σχετίζονται περισσότερο με τα στείρα δείγματα. Οι εξανάλη, ακετοΐνη, διακετύλιο και βουταν-2-όνη σχετίζονται περισσότερο με τα μη εμβολιασμένα και με τα δείγματα με την συγκαλλιέργεια των 4 μικροοργανισμών. Τέλος, οι καρβονυλικές ενώσεις και οι αλκοόλες επταν-3-όλη και βουτ-3-εν-1-όλη σχετίζονται περισσότερο με τις περιπτώσεις των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με τις ψευδομονάδες ή τα γαλακτικά βακτήρια.



Εικόνα 5.3.17: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 4°C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση)

Πίνακας 5.3.11: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 4°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)

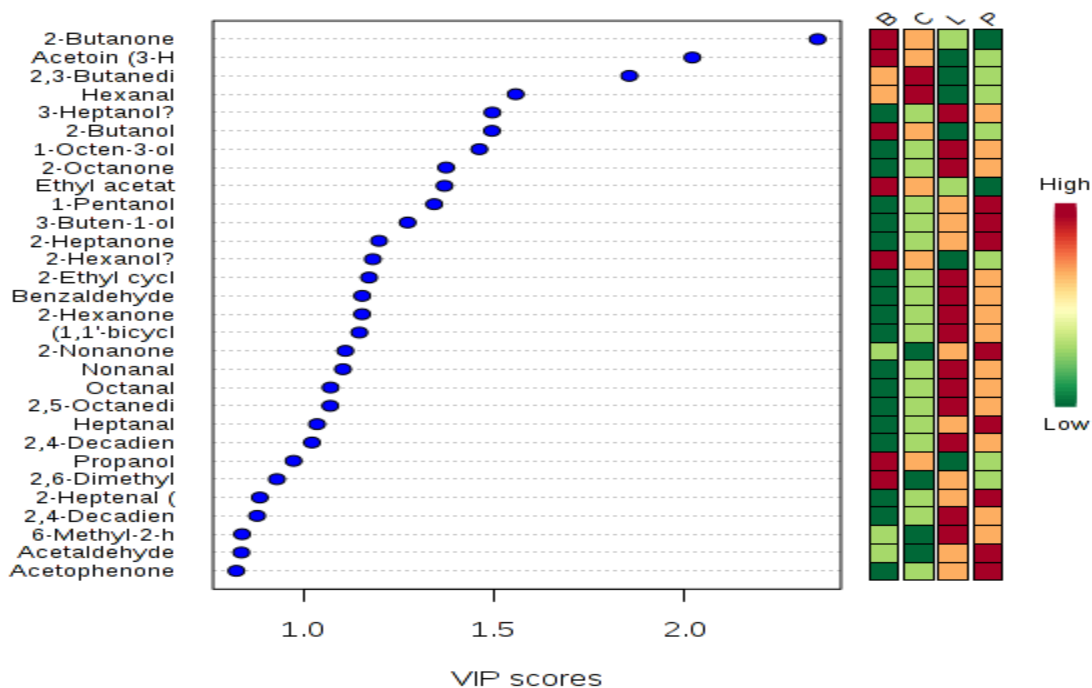
Πτητικές ενώσεις	Τιμή α	Fisher's LSD
Βουταν-2-όλη	0,0002	B - C; B - L; B - P
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	0,0101	L - B; P - B; L - C; P - C
Πενταν-1-όλη	0,0067	L - B; P - B
Εξαν-2-όλη	0,0000	B - C; B - L; B - P
Επτan-3-όλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκτ-1-εν-3-όλη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C
2,6-διμεθυλοοκτ-7-εν-2-όλη	0,0007	B - C; B - L; B - P
Βενζαλδεΐδη	0,0041	L - B; P - B; L - C; P - C
Εξανάλη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Οκτανάλη	0,0123	L - B; P - B; L - C; P - C
Εννεανάλη	0,0004	L - B; P - B; L - C; P - C
Δεκανάλη	0,0273	L - B; L - C
Ισομερές της δεκαν-2,4-διενάλης	0,0133	L - B; P - B; L - C
Βουταν-2-όνη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Διακετύλιο	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Ακετοΐνη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Εξαν-2-όνη	0,0002	L - B; P - B; L - C
2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C; L - P
1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη	0,0000	L - B; P - B; L - C; P - C; L - P
5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη	0,0009	L - B; L - C; L - P
Επτan-2-όνη	0,0367	P - B; P - C
6-μεθυλοεπτan-2-όνη	0,0005	L - B; L - C; P - C; L - P
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	0,0214	L - B; L - C; L - P
Οκταν-2-όνη	0,0019	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκταν-2,5-διόνη	0,0003	L - B; P - B; L - C; L - P
Οξικός αιθυλεστέρας	0,0029	B - C; B - L; B - P
Οξικός βουτυλεστέρας	0,0156	B - C; B - L; B - P

5.3.2.2.3. Συντήρηση σε MAP στους 10°C

Τέλος, κατά τη συντήρηση σε MAP στους 10°C, οι ουσίες που θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μετά από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα ήταν 21 πτητικές ενώσεις (3 αλκοόλες, 7 αλδεΐδες, 10 κετόνες και 1 εστέρας). Αναλυτικά, οι ουσίες οκτ-1-εν-3-όλη και βενζαλδεΐδη οκταν-2-όνη και οκταν-2,5-διόνη μπορούν να διακρίνουν τα στείρα δείγματα ή τα δείγματα με το κοκτέιλ των 4 μικροοργανισμών από τα υπόλοιπα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με τις ψευδομονάδες ή τα γαλακτικά βακτήρια. Η ανάλυση με PLS-DA (Εικόνα 5.3.18) παρουσίασε αντίστοιχα αποτελέσματα με την περίπτωση της συντήρησης σε MAP στους 4°C.

Πίνακας 5.3.12: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 10°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)

Πτητικές ενώσεις	p value	Fisher's LSD
Βουταν-2-όλη	0,0010	B - P; C - P; L - P
3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη	0,0058	L - B; L - P
Οκτ-1-εν-3-όλη	0,0033	L - B; P - B; L - C; P - C
Βενζαλδεΐδη	0,0022	L - B; P - B; L - C; P - C
Εξανάλη	0,0000	B - L; B - P; C - L; C - P
Επτανάλη	0,0379	P - C; P - L
Επτεν-2-άλη (E)	0,0456	P - B; P - C
Εννεαν-2,4,διάλη E,E	0,00519	P - B; L - C; P - C
Δεκαν-2,4-διενάλη	0,0466	L - C; P - C
Ισομερές της δεκαν-2,4-διενάλης	0,0360	L - B; P - B; L - C; P - C
Ακετόνη	0,0372	B - C; B - L; B - P
Βουταν-2-όνη	0,0000	C - B; B - L; B - P; C - L; C - P
Διακετύλιο	0,0216	C - B; C - L; C - P
Ακετοΐνη	0,0000	C - B; B - L; B - P; C - L; C - P
Ακετοφαινόνη	0,0012	L - B; P - B; L - C
Εξαν-2-όνη	0,0295	L - B; P - B
5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη	0,0461	L - B; P - B
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	0,0204	L - C; L - P
Οκταν-2-όνη	0,0021	L - B; P - B; L - C; P - C
Οκταν-2,5-διόνη	0,0117	L - B; P - B; L - C; P - C
Προπανοϊκός αιθυλεστέρας	0,0133	L - B; L - C; L - P



Εικόνα 5.3.18: Οι σημαντικότερες ουσίες κατά την συντήρηση σε MAP στους 10°C όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση με PLS-DA για την κάθε ομάδα των μικροοργανισμών (το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υψηλή συσχέτιση ενώ το πράσινο χρώμα την χαμηλή συσχέτιση)

5.3.2.3. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια συσχέτισης της οργανοληπτικής εκτίμησης με τις πτητικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν από την GC/MS για όλες τις περιπτώσεις κρέατος. Ανάλογα με τη θερμοκρασία και τη συσκευασία προσδιορίστηκαν διαφορετικές ουσίες οι οποίες είναι ικανές να διαφοροποιήσουν την οργανοληπτική κατηγορία ενός δείγματος. Από τα αποτελέσματα για την αερόβια συντήρηση φαίνεται πως η διάκριση γίνεται κυρίως μεταξύ των κατηγοριών «αλλοιωμένο από φρέσκο» και αλλοιωμένο από σχετικά φρέσκο» ενώ η διάκριση «σχετικά φρέσκο από φρέσκο» υστερεί. Έτσι, στην αερόβια αλλοίωση στους 4°C (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα), οι ουσίες βουταν-1-όλη, ισοβουτανόλη, 3-μεθυλοβουταν-1-όλη, 2-μεθυλοβουταν-1-όλη, επταν-3-όλη, L- μενθόλη, επτεν-2-άλη (E), οκτανάλη, τρανς-οκτεν-2-άλη, ακετοφαινόνη, εξαν-2-όνη, οκτ-1-εν-3-όνη, εννεαν-2-όνη, και οξικός βουτυλεστέρας μπορούσαν να διαφοροποιήσουν ένα δείγμα αλλοιωμένο από φρέσκο ή σχετικά φρέσκο. Επίσης, οι ουσίες προπανάλη, βενζαλδεΐδη, εξανάλη,

επτανάλη και ακετόνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση ενός φρέσκου από αλλοιωμένο δείγμα. Στους 10°C, οι αντίστοιχες ουσίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3.13 φαίνεται πως οι καρβονυλικές ενώσεις δεκανάλη, τρανς-οκτεν-2-άλη και οκταν-2-όνη σχετίζονται με τη διάκριση «αλλοιωμένο από φρέσκο».

Πίνακας 5.3.13: Οι σημαντικότερες ουσίες σε σχέση με την οργανοληπτική αξιολόγηση κατά την αερόβια συντήρηση στους 10°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)

Πτητικές ενώσεις	Τιμή α	Fisher's LSD
2-αιθυλοεξαν-1-όλη	0,0001	s - f; s - sf
Βουταν-1-όλη	0,0001	s - f; s - sf
Εννεαν-2-όνη	0,0003	s - f; s - sf
Πενταν-2-όνη	0,0014	s - f; s - sf
Πεντανάλη	0,0023	f - s; sf - s
Οκταν-2-όνη	0,0028	s - f
Ακετοφαινόνη	0,0035	s - f; s - sf
Επταν-2-όνη	0,0046	s - f; s - sf
2-μεθυλοβουταν-1-όλη	0,0050	s - f; s - sf
6-μεθυλοεπτ-5-εν-2-όνη	0,0095	s - f; s - sf
Πενταν-1-όλη	0,0178	f - s; sf - s
3-μεθυλοβουταν-1-όλη	0,0192	s - f; s - sf
Δεκανάλη	0,0231	s - f
τρανς-οκτεν-2-άλη	0,0412	f - s

Κατά την συντήρηση σε MAP, φαίνεται πως η διάκριση γίνεται κυρίως μεταξύ των κατηγοριών «σχετικά φρέσκο από φρέσκο» και «αλλοιωμένο από φρέσκο» ενώ η διάκριση «αλλοιωμένο από σχετικά φρέσκο» υστερεί. Στον Πίνακα 5.3.14, παρουσιάζονται οι αντίστοιχες ενώσεις για την θερμοκρασία των 4°C. Κατά την συντήρηση στους 10°C η αλκοόλη επταν-3-όλη, οι καρβονυλικές ενώσεις 3-μεθυλοβουτανάλη, πεντανάλη, επτανάλη, επτεν-2-άλη (E), τρανς-οκτεν-2-άλη, 1,1, δικυκλοπεντυλ-2-όνη, 2-αιθυλοκυκλοπεντανόλη, πενταν-2-όνη, οκτ-1-εν-3-όνη και ο οξικός μεθυλεστέρας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ φρέσκων και αλλοιωμένων ή σχετικά φρέσκων δειγμάτων, ενώ οι αλκοόλες προπανόλη και εξανόλη και οι κετόνες επταν-2-όνη, 6-μεθυλοεπταν-2-όνη βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές για τη διάκριση μεταξύ φρέσκων και αλλοιωμένων δειγμάτων.

Πίνακας 5.3.14: Οι σημαντικότερες ουσίες σε σχέση με την οργανοληπτική αξιολόγηση κατά την συντήρηση σε MAP στους 4°C όπως προέκυψαν από την ανάλυση της διακύμανσης ενός παράγοντα σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha < 0,05$)

Πτητικές ενώσεις	Τιμή α	Fisher's LSD
Πεντανάλη	0,0000	f - s; f - sf
Επτανάλη	0,0000	f - s; f - sf
Επτεν-2-άλη (E)	0,0000	f - s; f - sf
Οκτ-1-εν-3-όνη	0,0001	f - s; f - sf
Οκτανάλη	0,0008	f - s; f - sf
Οξικός μεθυλεστέρας	0,0010	sf - f; sf - s
Βενζαλδεΐδη	0,0130	f - sf
Τρανς-οκτεν-2-άλη	0,0140	f - s; f - sf
Εννεανάλη	0,0246	f - s
Προπανοϊκός αιθυλεστέρας	0,0261	s - f
Εννεαν-2-όνη	0,0390	s - f

5.4. Συζήτηση

Το άρωμα του κρέατος είναι από τα πιο σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για τη συνολική αποδοχή του και σχετίζεται με το ενδομυϊκό λίπος. Ουσίες όπως αλδεΐδες, κετόνες και αλκοόλες βρίσκονται ανάμεσα στις πτητικές ουσίες που σχηματίζονται κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων του κρέατος (Insausti et al., 2002, Meinert et al., 2007). Παρόλο που το χοιρινό κρέας ανήκει στα πιο σημαντικά είδη κρέατος στον κόσμο, δεν έχει γίνει εκτενής μελέτη του αρώματός του (Meinert et al., 2009). Οι Nurjuliana et al. (2011), μελετώντας τις πτητικές ουσίες φρέσκου χοιρινού κρέατος, αναφέρουν πως οι αλδεΐδες βενζαλδεΐδη, βουτανάλη, εξανάλη, επτανάλη, οκτανάλη, εννεανάλη, δεκαν-2,4,-διενάλη, οι αλκοόλες εξανόλη, επτανόλη και οι κετόνες βουταν-2-όνη, διακετύλιο και ακετοΐνη βρίσκονται ανάμεσα στις κυριότερες πτητικές ουσίες του φρέσκου χοιρινού κρέατος. Κατά τη μικροβιακή αλλοίωση νωπών κρεάτων ή πουλερικών αναπτύσσονται δυσάρεστες οσμές οι οποίες είναι συνέπεια της αύξησης των αρχικά χαμηλών πληθυσμών σε σημαντικά μεγαλύτερους πληθυσμούς, ικανούς να παράγουν διακριτές οσμές αλλοίωσης (Stutz et al., 1991). Η κατανάλωση των συστατικών του κρέατος από τους μικροοργανισμούς όπως υδατάνθρακες και αμινοξέα, με ταυτόχρονη παραγωγή ανεπιθύμητων πτητικών προϊόντων σχετίζεται με την ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της αλλοίωσης (Ercolini et al., 2009). Μια γενική τάση στη σύγχρονη μικροβιολογία τροφίμων είναι η αντικατάσταση της επίπονης και χρονοβόρας μικροβιολογικής ανάλυσης με τις χημικές μεταβολές που θα μπορούσαν να συνδέονται με τη μικροβιακή αύξηση στο κρέας (Tsigarida &

Nychas, 2001). Ως εκ τούτου, καθώς τα παραγόμενα δύσοσμα προϊόντα εντείνονται με την εξέλιξη της διαδικασίας της αλλοίωσης, η ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων θα μπορούσε δυνητικά να παρέχει ταχεία εκτίμηση της αλλοίωσης ή του μικροβιολογικού φορτίου του τροφίμου (Xu et al., 2010b).

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια συσχέτισης των πτητικών ουσιών που παράγονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στείρου ιστού κρέατος ο οποίος έχει εμβολιαστεί με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς και έχει συντηρηθεί σε 2 θερμοκρασίες και 2 συσκευασίες.

Η ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας έδωσε 192 κορυφές, οι οποίες βρέθηκαν να είναι εξαρτώμενες από τον εκάστοτε μικροοργανισμό, τη θερμοκρασία ή/και τη συσκευασία συντήρησης του κρέατος (Πίνακες 5.3.5 έως 5.3.8). Από τις 192 κορυφές, επιλέχθηκαν οι σημαντικότερες για την περαιτέρω ανάλυση. Έτσι, επιλέχθηκαν 64 κορυφές αποτελούμενες από αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και εστέρες που προέκυψαν κατά τη συντήρηση του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες. Αντίστοιχα, κατά τη συντήρηση του στείρου ιστού κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας επιλέχθηκαν 63 κορυφές, αποτελούμενες εξίσου από αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και εστέρες. Ουσίες όπως 1-βουτοξυπροπαν-2-όλη, 2-φαινυλαιθανόλη, οκταν-3-όλη και τρανς-εξαν-2-άλη εντοπίστηκαν μόνο στην περίπτωση της συντήρησης του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες ενώ ουσίες όπως 2,3-βουτανεν-2-διόλη, 2-αιθυλοκυκλοπεντανόνη, 5-μεθυλοεξ-5-εν-2-όνη και οξικός αμυλεστέρας ανιχνεύθηκαν μόνο κατά τη συντήρηση του κρέατος σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

Με την πάροδο της συντήρησης του κρέατος οι ουσίες αύξησαν ή μείωσαν τη συγκέντρωσή τους διαφορετικά κατά περίπτωση μικροοργανισμού, θερμοκρασίας συντήρησης και συσκευασίας αποθήκευσης. Για να προσδιοριστούν οι τάσεις στις πτητικές ουσίες σε σχέση με τους μικροοργανισμούς που είχε εμβολιαστεί το κρέας, τα δεδομένα αναλύθηκαν με πολυμεταβλητές στατιστικές μεθόδους. Για κάθε περίπτωση θερμοκρασίας και συσκευασίας προσδιορίστηκαν οι στατιστικά σημαντικές πτητικές ενώσεις και η συσχέτιση τους με τις ομάδες μικροοργανισμών. Ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης βρέθηκαν διαφορετικές ουσίες για κάθε περίπτωση. Οι ουσίες 3-μεθυλοβουτ-3-εν-1-όλη, βενζαλδεΐδη, εξανάλη, βουταν-2-όνη, διακετύλιο, ακετοΐνη και οκταν-2,5-διόνη ήταν οι ουσίες που βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Από τις ουσίες αυτές, η εξανάλη προέρχεται

από την αυτοοξειδωση των λιπαρών οξέων του κρέατος κυρίως του αραχιδονικού και του ελαϊκού οξέος αλλά και από την αποικοδόμηση των αμινοξέων (Ercolini et al., 2009, Insausti et al., 2002). Η ουσία αυτή βρέθηκε σε όλα τα δείγματα του μη εμβολιασμένου κρέατος και ως εκ τούτου δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης μικροβιακής αλλοίωσης καθώς η συγκέντρωσή της εξαρτάται και από μη μικροβιακούς παράγοντες. Οι Imafidon & Spanier (1994) αναφέρουν πως οι ουσίες βενζαλδεΐδη, οκταν-2,3-διόνη, δεκα-2,4-διενάλη (E,Z) και δεκαοκτεν-16-άλη είναι χαρακτηριστικές ουσίες του χοιρινού κρέατος. Η ακετοΐνη, κατά τη συντήρηση του κρέατος που είχε εμβολιαστεί με τις μονοκαλλιέργειες και την συγκαλλιέργεια ψευδομονάδων μειώθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις (Εικόνα 5.3.11). Η ικανότητα των ψευδομονάδων να μεταβολίζουν την ουσία αυτή όπως έχει αναφερθεί από τους Dainty et al. (1989b), μπορεί να προκάλεσε τη μείωση της συγκέντρωσής της στις περιπτώσεις αυτές. Ακετοΐνη και διακετύλιο μπορούν να παραχθούν από τα γαλακτικά βακτήρια (κυρίως από στελέχη των βακτηρίων *Lactobacillus* spp.) και να αυξήσουν τη συγκέντρωσή τους στο κρέας αλλά ανευρίσκονται και σε κρέας με τη φυσική του μικροχλωρίδα (Dainty et al., 1989b, Dainty & MacKey, 1992).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε μία προσπάθεια συσχέτισης των πτητικών ουσιών με την οργανοληπτική κατηγορία που είχε ταξινομηθεί το κρέας. Οι ουσίες πεντανάλη, επτεν-2-άλη (E) και τρανς-οκτεν-2-άλη βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Οι ουσίες πεντανάλη και εξανάλη βρίσκονται συχνά σε χοιρινό άπαχο κρέας και σχετίζονται με τη διατροφή των χοίρων με τροφές πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Imafidon & Spanier, 1994). Επίσης, η ουσία επτεν-2-άλη (E) βρίσκεται στο χοιρινό κρέας και η ποσότητα της εξαρτάται από την ποσότητα του λινολενικού οξέος στο κρέας (Aaslyng & Schafer, 2008).

Παρόμοιες έρευνες έχουν εκπονήσει οι Ercolini et al. (2009) όπου μελέτησαν την εξέλιξη των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε κρέας μαζί με τη φυσική μικροχλωρίδα του και οι Tsigarida & Nychas (2001), όπου μελέτησαν στείρο ιστό κρέατος εμβολιασμένο με μονοκαλλιέργειες ψευδομονάδας και γαλακτικού βακτηρίου. Τα ευρήματά τους έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Οι Ercolini et al. (2009), προσδιόρισαν τις πτητικές ενώσεις στην αρχή της συντήρησης, και μετά από 15 και 30 μέρες συντήρησης σε θερμοκρασία 7°C. Κατά τη συντήρηση του μη εμβολιασμένου κρέατος, δεν βρήκαν πτητικές ουσίες, σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου οι πτητικές ουσίες στο στείρο μη εμβολιασμένο κρέας αύξαναν ή μείωναν τη συγκέντρωσή τους κατά τη διάρκεια της συντήρησης στις 2

συσκευασίες και σε 2 θερμοκρασίες. Επιπροσθέτως, οι προσδιοριζόμενες πτητικές ουσίες για το δείγμα που είχε εμβολιαστεί με *P. fragi* ήταν διαφορετικές από τις αντίστοιχες της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, σε μία αντίστοιχη μελέτη με βόειο κρέας εμβολιασμένο με ειδικούς αλλοιωγόνους αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς, οι Stutz et al. (1991), αναφέρουν πως οι ουσίες ακετόνη, διμέθυλο σουλφίδιο και διμέθυλο δισουλφίδιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης καθώς η συγκέντρωσή τους αυξανόταν κατά τη συντήρηση του κρέατος, κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τη παρούσα εργασία, καθώς οι παραπάνω ουσίες δεν είχαν σταθερό αυξητικό προφίλ κατά τη συντήρηση του κρέατος σε όλες τις περιπτώσεις. Μία πρόσφατη μελέτη (Holm et al., 2012) συσχέτισε με PLS τις υπεύθυνες πτητικές ουσίες για το ταγγό και ξινό άρωμα ενός προϊόντος κρέατος και αναφέρει πως αυτές οι ουσίες είναι οι 2 και 3-μεθυλοβουτανάλη, 2 και 3-μεθυλοβουτανόλη, ακετοΐνη και διακετύλιο. Τέλος, οι Xu et al. (2010), χρησιμοποιώντας πολυμεταβλητές στατιστικές μεθόδους όπως ανάλυση της διακύμανσης, PCA και PLS-DA μελέτησαν την ικανότητα των παραγόμενων πτητικών ουσιών στη διάκριση χοιρινού κρέατος με φυσιολογική χλωρίδα από κρέας που είχε εμβολιαστεί με παθογόνο μικροοργανισμό. Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν πως συγκεκριμένες πτητικές οργανικές ουσίες, χαρακτηριστικές της αλλοίωσης που προκαλείται από το παθογόνο βακτήριο που εξετάστηκε, όπως η φαινυλαιθυλική αλκοόλη, θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάκρισης της επιμόλυνσης με παθογόνα βακτήρια.

Κεφάλαιο 6

Γενικά Συμπεράσματα

6.1 Γενικά συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια για μία ολιστική προσέγγιση προκειμένου να αξιολογηθεί η αλλοίωση του χοιρινού κρέατος. Η εξέλιξη της μικροβιακής χλωρίδας μελετήθηκε παράλληλα με το μεταβολικό προφίλ του κρέατος. Έτσι, διάφορες ταχείες αναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν ώστε να διερευνηθεί η δυναμική τους στην αξιολόγηση της αλλοίωσης του κρέατος. Τα σημαντικότερα συμπεράσματα της διατριβής συνοψίζονται ως εξής:

- Η αρχική μικροχλωρίδα των δειγμάτων του χοιρινού κιμά κατά τη συντήρηση σε διαφορετικές ισόθερμες συνθήκες (0, 5, 10, 15 και 20°C) αερόβια και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα εξαρτιόταν σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία συντήρησης και τον τύπο της συσκευασίας. Έτσι, στη αερόβια αλλοίωση, την κυρίαρχη μικροχλωρίδα αποτελούσαν οι *Pseudomonas* spp., και ακολουθούσαν με φθίνουσα σειρά οι μικροοργανισμοί *B. thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια και *Enterobacteriaceae*. Κατά την συντήρηση σε MAP, η κυρίαρχη μικροχλωρίδα βρέθηκε να είναι το βακτήριο *B. thermosphacta*, από κοινού με τα γαλακτικά βακτήρια. Επιπλέον, η οργανοληπτική αξιολόγηση της αλλοίωσης δεν συσχετιζόταν πάντα με το ίδιο μικροβιακό φορτίο αλλά εξαρτιόταν από τη θερμοκρασία συντήρησης.
- Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και της συσκευασίας στην ανάπτυξη ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (*Pseudomonas fragi*, *P. putida*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* και συνδυασμοί τους αερόβια και σε MAP στους 4 και 10°C), που εμβολιάστηκαν σε στείρο ιστό χοιρινού κρέατος. Φαίνεται πως η *P. fragi* αποτέλεσε την κυρίαρχη μικροχλωρίδα στην αερόβια συντήρηση σε θερμοκρασίες 4 και 10°C και στη συντήρηση σε MAP σε θερμοκρασία 10°C. Και σε αυτήν την περίπτωση συντήρησης κρέατος, βρέθηκε πως η οργανοληπτική αξιολόγηση της αλλοίωσης δεν συσχετιζόταν πάντα με το ίδιο μικροβιακό φορτίο καθώς εξαρτιόταν από τη θερμοκρασία αποθήκευσης, αλλά και από τον εκάστοτε ειδικό αλλοιωγόνο μικροοργανισμό.
- Εξετάστηκε η ικανότητα της φασματοσκοπίας FTIR ως εργαλείο στην αξιολόγηση της ποιότητας του κρέατος αξιοποιώντας τα μεταβολικά δακτυλικά αποτυπώματα του χοιρινού κιμά συντηρημένου αερόβια και σε MAP σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C. Και στα δύο πειράματα διαπιστώθηκε καλή διάκριση μεταξύ των ποιοτικών κατηγοριών του δείγματος, οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικά επίπεδα αλλοίωσης. Επιπροσθέτως, η πρόβλεψη του κάθε

μικροβιακού πληθυσμού ξεχωριστά, απευθείας από τα φασματικά δεδομένα, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

- Ακολούθησε η μελέτη των πτητικών χαρακτηριστικών του χοιρινού κιμά με την ηλεκτρονική μύτη, η οποία είναι μία εν δυνάμει ταχεία και εύχρηστη μέθοδος ποιοτικής εκτίμησης της αλλοίωσης του κρέατος. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την παρούσα εργασία κατέδειξαν πως οι αποκρίσεις των αισθητήρων που συλλέχθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πτητικά δακτυλικά αποτυπώματα μίας ενεργής βιολογικής ουσίας, τα οποία περιέχουν πληροφορίες για την ποιότητά της, η οποία αντιστοιχεί σε διαφορετικά επίπεδα αλλοίωσης καθώς μπορούσε να προβλέψει αποτελεσματικά την ποιοτική κατηγορία ενός δείγματος, με ακρίβεια πρόβλεψης που κυμάνθηκε από 82,2% έως 86,0% για τα δείγματα του χοιρινού κιμά συντηρημένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και αερόβια αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η εκτίμηση του πληθυσμού των διάφορων μικροβιακών ομάδων έφερε θετικά αποτελέσματα, το οποίο αποδεικνύεται από τους δείκτες επίδοσης του μαθηματικού μοντέλου για την εκάστοτε ομάδα μικροοργανισμού.

- Επιπροσθέτως, μελετήθηκε το προφίλ των οργανικών οξέων κατά τη διάρκεια της συντήρησης του χοιρινού κιμά με HPLC. Η ανάλυση με HPLC οδήγησε στην επιλογή 16 ουσιών (γνωστών ουσιών είτε ουσιών που δε ταυτοποιήθηκαν) και από τα αποτελέσματα βρέθηκε πως τα 16 οργανικά οξέα δεν σχετίζονταν για όλες τις περιπτώσεις με τη θερμοκρασία ή τη συσκευασία. Τέλος, η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των οργανικών οξέων σε συνδυασμό με πολυμεταβλητές στατιστικές μεθόδους (PLS-DA, ανάλυση διακύμανσης, DFA, και SVM) έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η ανάλυση με DFA έδωσε πολύ υψηλά ποσοστά διάκρισης των τριών προκαθορισμένων ποιοτικών κατηγοριών του κρέατος ενώ η εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου των μικροβιακών ομάδων του κρέατος με SVM έδωσε ικανοποιητικούς δείκτες συσχέτισης. Η προσέγγιση μέσω της ανάλυσης της διασποράς ενός παράγοντα, βοήθησε στη διάκριση των οργανικών οξέων μεταξύ των ποιοτικών κατηγοριών του κρέατος αλλά και των δύο συσκευασιών καθώς τα οξέα που προσδιορίστηκαν είχαν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με το περιβάλλον συσκευασίας. Ο συνδυασμός των μεταβολιτών, που λαμβάνονται από την HPLC, με τη πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση φαίνεται να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στη διάκριση ποιότητας κρέατος και εκτίμησης του πληθυσμού των επιμέρους μικροβιακών ομάδων του κρέατος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως μια μέθοδος γρήγορης ανίχνευσης της αλλοίωσης του κρέατος

- Η ανάλυση με HS/SMPE GC/MS παρείχε χρήσιμες πληροφορίες για τις πτητικές ενώσεις που είναι παρούσες κατά τη συντήρηση του χοιρινού κιμά και στείρου ιστού χοιρινού κρέατος σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας. Οι ουσίες που προσδιορίστηκαν βρέθηκαν να είναι εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία ή/και τη συσκευασία συντήρησης των δειγμάτων κρέατος που εξετάστηκαν, καθώς κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης σε διαφορετικές συνθήκες οι ουσίες αύξησαν ή μείωσαν τη συγκέντρωσή τους διαφορετικά κατά περίπτωση συσκευασίας και θερμοκρασίας. Το προφίλ της μεταβολής των πτητικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση με πολυμεταβλητές στατιστικές μεθόδους. Πολλές από τις προσδιοριζόμενες πτητικές ενώσεις βρέθηκαν να έχουν διαφορετική συμπεριφορά στη συντήρηση στον αέρα σε σχέση με τη συντήρηση σε MAP και συσχετίστηκαν ανά περίπτωση διαφορετικά με την ποιοτική κλάση του προς εξέταση κρέατος. Πιο συγκεκριμένα, στη περίπτωση του χοιρινού κιμά ουσίες όπως η ακετοΐνη και το διακετύλιο σχετίζονται περισσότερο με τα ενδιάμεσα στάδια της αλλοίωσης του κρέατος ενώ στη συσκευασία σε MAP σχετίζονται περισσότερο με τα αλλοιωμένα δείγματα. Αντίστοιχα, στη περίπτωση του στείρου κρέατος, ουσίες όπως η εξανόλη σχετιζόταν περισσότερο με τα μη εμβολιασμένα δείγματα κρέατος σε σχέση με τα εμβολιασμένα με αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς.
- Τέλος, εξετάστηκε η χρήση διαφορετικών μοριακών τεχνικών για τον προσδιορισμό της διαδοχής των μελών του *Brochothrix* spp., καθώς και οι αλλαγές που συμβαίνουν σε επίπεδο στελέχους κατά τη συντήρηση χοιρινού κιμά αερόβια και σε MAP στους 0, 5, 10 και 15 °C. Διαφορετικά αποτελέσματα προέκυψαν από τις διαφορετικές μεθόδους το οποίο αποδίδεται στον διαφορετικό βαθμό διακριτικής ικανότητας της κάθε μοριακής μεθόδου. Σε αυτήν την μελέτη, παρατηρήθηκε μια σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ των απομονώσεων που ανακτήθηκαν από την αερόβια συντήρηση του χοιρινού κιμά, ενώ για τα στελέχη που ανακτήθηκαν από τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας η ετερογένεια ήταν χαμηλότερη. Επιπρόσθετα, οι απομονώσεις που ανακτήθηκαν στα αρχικά στάδια της συντήρησης του κρέατος ήταν αισθητά διαφορετικές από τις αντίστοιχες κατά το τελικό στάδιο της συντήρησης του κρέατος στις θερμοκρασίες ψύξης. Ακόμα, η ποικιλομορφία του *B. thermosphacta* και οι αλλαγές στη βακτηριακή σύνθεση μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος.
- Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την παρούσα εργασία φαίνεται πως οι προαναφερθείσες αναλυτικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ικανοποιητικό βαθμό για την αξιολόγηση της αλλοίωσης του κρέατος. Οι τεχνικές αυτές είναι ταχείες και παρέχουν την

«άμεση απάντηση» που απαιτεί η βιομηχανία, σε αντίθεση με τις ήδη υπάρχουσες κλασικές μέθοδοι (микροβιολογικές αναλύσεις), οι οποίες είναι χρονοβόρες και παρέχουν τα αποτελέσματα εκ των υστέρων. Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών όμως, ήταν εμφανής μόνο για παρτίδες ίδιων δειγμάτων και έτσι είναι σημαντικό να αξιολογηθούν τα ήδη υπάρχοντα μαθηματικά μοντέλα, χρησιμοποιώντας ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων, δηλαδή δείγματα που προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες κρέατος (κρέας με διαφορετικά αρχικά χαρακτηριστικά π.χ. διαφορετική προέλευση, pH, χρώμα, λίπος, μικροβιακό φορτίο) ώστε να επικυρωθεί και να επεκταθεί αυτή η προσέγγιση.

- Κλείνοντας, είναι θεμελιώδους σημασίας η αξιολόγηση της μικροβιακής ποικιλότητας των ειδών που ανευρίσκονται στο κρέας και η μελέτη της επίδρασης και της προσαρμοστικότητας των ειδών σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης για τη βελτίωση των ειδών συσκευασίες με απώτερο σκοπό την παράταση της διάρκειας ζωής και της ασφάλειας των προϊόντων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά δεδομένου ότι διευρύνουν την υπάρχουσα γνώση όσον αφορά την μικροβιακή οικολογία του κρέατος και πιο συγκεκριμένα συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης.

6.2. Μελλοντική έρευνα

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν πολλές αναλυτικές τεχνικές ώστε να διερευνηθεί η δυναμική τους στην εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν FTIR, HPLC, GC/MS, ηλεκτρονική μύτη. Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκαν να είναι ικανές να εκτιμήσουν λιγότερο ή περισσότερο την αλλοίωση του κρέατος. Περαιτέρω μελέτες, οι οποίες θα ενίσχυαν τα υπάρχοντα δεδομένα αλλά και θα βοηθούσαν στην καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης του κρέατος είναι σημαντικό να εκπονηθούν. Έτσι, θα μπορούσαν να διεξαχθούν τα παρακάτω πειράματα:

√ Μελέτη του μεταβολικού προφίλ στείρου ιστού χοιρινού κρέατος εμβολιασμένου με ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς με το FTIR. Η ανάλυση των φασματικών δεδομένων

θα μπορούσε να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την αλλοίωση του κρέατος που προκαλείται από έναν μόνο μικροοργανισμό ή κοκτέιλ επιλεγμένων μικροοργανισμών.

√ Αξιολόγηση της επίδρασης των αρχικών χαρακτηριστικών του κρέατος στην αποτελεσματικότητα των μεθόδων. Το κρέας με διαφορετικά ενδογενή (δηλαδή κρέας με διαφορετική προέλευση, διαφορετικό pH, χρώμα, υφή κ.λπ.) και εξωγενή χαρακτηριστικά (δηλαδή κρέας συσκευασμένο σε διάφορες θερμοκρασίες και ατμόσφαιρες συσκευασίας) θα πρέπει να αξιολογηθεί με τις ίδιες μεθόδους χρησιμοποιώντας τα έτοιμα μαθηματικά μοντέλα διερευνώντας έτσι την ικανότητα των ήδη ανεπτυγμένων μαθηματικών μοντέλων στην εκτίμηση της αλλοίωσης διαφορετικών παρτίδων κρέατος.

√ Τέλος, θα μπορούσε να γίνει ενσωμάτωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις διάφορες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, για την ανάπτυξη ενός συνδυαστικού μαθηματικού μοντέλου που θα προέρχεται από συγχώνευση δεδομένων από διαφορετικού τύπου αισθητήρες. Μια τέτοια εφαρμογή που θα συνδύαζε ετερογενή δεδομένα από τους δείκτες διαφορετικής προέλευσης (π.χ. πτητικές ενώσεις και οργανικά οξέα) θα μπορούσε να δημιουργήσει πιο ακριβείς δείκτες για την πρόβλεψη της εμπορικής διάρκειας ζωής του κρέατος και να ελαχιστοποιήσει το σφάλμα κατά την ανάπτυξη των μαθηματικών μοντέλων.

Κεφάλαιο 7

Βιβλιογραφία

- Aaslyng, M.D., & Schafer, A., 2008. The effect of free fatty acids on the odour of pork investigated by sensory profiling and GC-O-MS. Review. *Eur Food Res Technol*, **226**, 937-948
- Abd El-Rhman, H.A., Marriott, N.G., Wang, H., Yassein, M.M.A. Ahmed, A.M., 1998. Characteristics of minced beef stored at chilled and abuse temperatures. *J Muscle Foods*, **9**, 139-152
- Adams, M.R., Moss, M.O., 1995. Food microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Ait-Kaddour A., Boubelluta T., Chevallier I., 2011. Development of a portable spectrofluorimeter for measuring the microbial spoilage of minced beef. *Meat Sci*, **88**, 675- 681
- Ammor, M., Argyri, A., Nychas G.-J.E., 2009. Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Sci*, **81**, 507-515
- Antic, D., Blagojevic B., Ducic, M., Mitrovic R., Nastasijevic, I., Buncic, S., 2010. Treatment of cattle hides with Shellac-in-ethanol solution to reduce bacterial transferability – A preliminary study. *Meat Sci*, **85**, 77-81
- Argyri, A.A., 2010a. Quantifying meat spoilage with an array of biochemical indicators. PhD thesis, Cranfield University
- Argyri, A.A., Panagou, E.Z., Tarantilis, P.A, Polysiou, M., & Nychas, G.-J.E., 2010b. Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sens. Actuators, B*, **145**, 146-154
- Argyri, A.A., Doulgeraki A.I., Blana, V.A., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2011. Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage

- status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. *Int J Food Microbiol*, **150**, 25-33
- Argyri, A.A., Jarvis, R.M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E.Z., Goodacre, R., Nychas, G.-J.E., 2013. A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, **29**, 461- 470
- Argyri, A.A., Mallouchos, A., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2014. The dynamics of the HS/SPME-GC/MS as a tool to assess the spoilage of beef stored under different packaging and temperature conditions. Under revision on *Metabolomics*.
- Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Nou, X., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Kent, M.P., 2004. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *J Food Protect*, **67**, 658–665
- Arvanitoyannis, I.S., van Houwelingen-Koukaliaroglou, M., 2003. Implementation of Chemometrics for Quality Control and Authentication of Meat and Meat Products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **43**, 173-218
- Axelsson, L.T., 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*, pp. 1-72. Edited by S. Salminen, A. Von Wright. NY: Marcel Dekker
- Bacon, R.T., Sofos, J.N., Belk, K.E., Hyatt, D.R., Smith, G.C., 2002. Prevalence and antibiotic susceptibility of Salmonella isolated from beef animal hides and carcasses. *J of Food protect*, **65**, 284-290
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S., Logue, C.M., Gu, H., & Marchello, M., 2009. Neural networks-integrated metal oxide-based artificial olfactory system for meat spoilage identification. *J of Food Engin*, **91**, 91–98
- Baranyi, J., & Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol*, **23**, 277–294

- Baranyi, J., Tamplin, L.M., 2004. Combase: a common database on microbial responses in 13 food environments. *J Food Protect*, **67**, 1967-1971
- Belousov, A.I., Verzakov, S.A., & Frese, J., 2002. Applicational aspects of support vector machines. *J of Chemometrics*, **16**, 482–489
- Benedetti, S. Sinelli, N., Buratti, S., Riva, M., 2005. Shelf life of Crescenza cheese as measured by electronic nose. *J of Dairy Sci*, **88**, 3044-3051
- Berends, B.R., Van Knapen F., Mossel, D.A.A., Burt, S.A. Snijders, J.M.A., 1998. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. *Int J Food Microbiol*, **44**, 207- 217
- Berna, A.Z., Lammertyn, J., Saevels, S., Di Natale, C., & Nicolai, B.M., 2004. Electronic nose systems to study shelf life and cultivar effect on tomato aroma profile. *Sens. Actuators, B*, **97**, 324–333
- Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M., & Héberger, K., 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *J of Chrom A*, **1158**, 196–214
- Bicego, M., Tessari, G., Tecchiolli. G., Bettinelli, M., 2002. A comparative analysis of basic pattern recognition techniques for the development of small size electronic nose. *Sens. Actuators, B*, **85**, 137–144
- Boothe, D., & Arnold, J.W., 2002. Electronic nose analysis of volatile compounds from poultry meat samples, fresh and after refrigerated storage. *J Sci Food Agric*, **82**, 315-322
- Borch, E., Kant-Muemansb, M-L., & Blixt Y., 1996. Bacterial spoilage of meat products. *Int J Food Microbiol*, **33**, 103-120
- Boselli, E., Pacetti, D., Curzi, F., Frega, N.G., 2008. Determination of phospholipid molecular species in pork meat by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and evaporative light scattering detection. *Meat Sci*, **78**, 303- 313

- Brereton, R.G., 2003. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley & Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England
- Brewer, M.S., and Vega, J.D. 1995. Detectable odor thresholds of selected lipid oxidation compounds in a meat model system. *J Food Sci*, **60**, 592–595
- Brooks, J.C., Alvarado, M., Stephens, T.P., Kellermeier, J.D., Tittor, A.W., & Miller, M.F., 2008. Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *J of Food Protect*, **71**, 293–301
- Brunton, N.P., Cronin, D.A., Monahan, F.J., 2001. The effects of temperature and pressure on the performance of Carboxen/PDMS fibres during solid phase microextraction (SPME) of headspace volatiles from cooked and raw turkey breast. *Flavour and Fragrance Journal*, **16**, 294–302
- Brudzewski, K., Osowski, S., & Markiewicz, T., 2004. Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network. *Sens. Actuators, B*, **98**, 291–298
- Buratti, S., Ballabio, D., Benedetti, S., Cosio, M. S., 2007. Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of genetic algorithm regression models. *Food Chem*, **100**, 211-218
- Byun, J.S., Min, J.S., Kim, I.S., Kim, J.W., Chung, M.S., & Lee, M., 2003. Comparison of indicators of microbial quality of meat during aerobic cold storage. *J of Food Protect*, **66**, 1733–1737
- Γαρδέλη Χ., 2009. Μελέτη της χημικής σύστασης αιθερίων ελαίων ορισμένων αρωματικών φυτών της Ελληνικής χλωρίδας. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Calkins, C.R., Hodgen, J.M., 2007. A fresh look at meat flavor. *Meat Sci*, **77**, 63- 80

- Chenoll, E., Macian, M.C., Elizaquivel, P. & Aznar, R., 2007. Lactic acid bacteria associated with vacuum packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA based methods. *J Appl Microbiol*, **102**, 498-508
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. & Comi, G., 2004. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 1883-1894
- Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., & Comi, G., 2005. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *Int J Food Microbiol*, **103**, 167–178
- Concina, I., Falasconi, M., Gobbi, E., Bianchi, F., Musci, M., Mattarozzi, M., Pardo, M., Mangia, A., Careri, M., Sberveglieri, G., 2009. Early detection of microbial contamination in processed tomatoes by electronic nose. *Food Control*, **20**, 873-880
- Corich, V., Mattiazzi, A., Soldati, E., Carraro, A., & Giacomini, A., 2005. Sau-PCR, a novel amplification technique for genetic fingerprinting of microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 6401–6406
- Cosio, M. S., Ballabio, D., Benedetti, S., Gigliotti, C., 2007. Evaluation of different storage conditions of extra virgin olive oils with an innovative recognition tool built by means of electronic nose and electronic tongue. *Food Chem*, **101**, 485-491
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard, C.M., & Ramantanis, C.V., 1985. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *J Appl Bacteriol*, **63**, 427-434
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., & Hibbard C.M., 1989a. Spoilage of vacuum packed beef by *Clostridium* sp. *J Sci Food Agric Bacteriol*, **49**, 473-486
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard C.M. & Marnewick, J.J., 1989b. Volatile compound associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures. *J Appl Bacteriol*, **66**, 281-289

- Dainty, R.H., 1996. Chemical/biochemical detection of spoilage. *Int J Food Microbiol*, **33**, 19–34.
- Dainty, R.H. & MacKey, B.M., 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. In *Ecosystems: Microbes: Food*, pp. 103-114. Edited by R.G. Board, D. Jones, R.G. Kroll & G.L. Pettipher. Society for Applied Bacteriology Symposium Series. Vol. 73
- Damez, J.L., & Clerjon, S., 2008. Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Sci*, **80**, 132–149
- den Aantrekker, E.D., Boom, R.M., Zwietering, M.H., & van Schothorst, M., 2003. Quantifying recontamination through factory environments. A review. *Int Food Microbiol*, **80**, 117–130
- Di Natale, C., Macagnano, A., Davide, F., D’Amico, A., Paolesse, R., Boschi, T., Faccio, M., Ferri, G., 1997. An electronic nose for food analysis. *Sens. Actuators, B*, **44**, 521-526
- Di Natale, C., Macagnano, A., Paolesse, R., Mantini, A., Tarizzo, E., D’Amico, A., Sinesio, F., Bucarelli, F.M., Moneta, E., Quaglia, G.B., 1998. Electronic nose and sensorial analysis: comparison of performances in selected cases. *Sens. Actuators, B*, **50**, 246-252
- Di Natale, C., Olafsdottir, G., Einarsson, S., Martinelli, E., Paolesse, R., D’Amico, R., 2001. Comparison and integration of different electronic noses for freshness evaluation of cod-fish fillets. *Sens. Actuators, B*, **77**, 572-578
- Doulgeraki, A.I., 2010a. Monitoring the succession of bacterial communities during storage of raw meat. PhD thesis, Cranfield University
- Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., Kagkli, D.M., & Nychas, G.-J.E., 2010b. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiol*, **27**, 1028–1034

- Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., & Nychas, G.-J. E., 2011. Characterization of the *Enterobacteriaceae* community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Int J Food Microbiol*, **145**, 77–83
- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D, Villani, F., Nychas, G.-J. E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. Review. *Int J Food Microbiol*, **157**, 130-141
- Doulgeraki A.I., & Nychas, G.-J. E., 2013. Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food Microbiol*, **34**, 62-69
- Drosinos, E.H., 1994. Microbial associations of minced lamp and their ecophysiological attributes. PhD thesis. University of Bath, Bath, United Kingdom
- Drosinos, E.H., and Board, R.G., 1995. Attributes of microbial associations of meat growing as xenic batch cultures in a meat juice at 4°C. *Int J Food Microbiol*, **26**, 279-293
- Edwards, R.A., Dainty, R. H., & Hibbard C.M., 1987. Volatile compound produced by meat pseudomonads and related reference strains during growth in air at chill temperatures. *J Appl Bacteriol*, **62**, 403-412
- El Barbri, N., Llobet, E., El Bari, N., Correig, X., & Bouchikhi, B., 2008. Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as an alternative technique for the spoilage classification of red meat. *Sensors*, **8**, 142–156
- Estevez, M., Morcuende, D., Ventanas, S., Cava, R., 2003. Analysis of volatiles in meat from Iberian pigs and lean pigs after refrigeration and cooking by using SPME-GC-MS. *J Agricult and Food Chem*, **51**, 3429–3435.
- Ellis, D.I., & Goodacre, R., 2001. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: Current status and future trends. *Trends in Food Sci and Techn*, **12**, 414–424

- Ellis, D.I., Broadhurst, D., Kell, D.B., Rowland, J.J., & Goodacre, R., 2002. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 2822–2828.
- Ellis, D.I., Broadhurst, D., & Goodacre, R., 2004. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Anal Chim Acta*, **514**, 193–201
- Ellis, D.I., Broadhurst, D., Clarke, S.J., Goodacre, R., 2005. Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *Analyst*, **130**, 1648–1654
- Enfors, S.-O., Molin, G. & Ternstroem, A., 1979. Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen or air on the microbial flora of pork stored at 4°C. *J Appl Bacteriol*, **47**, 197- 208
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F., 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 4663–4671
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, I., Mauriello, G. & Villani, F., 2007. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 2354-2359
- Ercolini, D., F. Russo, A. Nasi, P. Ferranti, & Villani F., 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *in vitro* and in beef. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 1990–2001.
- Ercolini, D., Ferrocino, I., La Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P. & Villani, F., 2010. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiol*, **27**, 137-143
- Fernandes, R., 2009. Chilled and Frozen raw meat, poultry and their products. In *Meat products*, pp. 1-52. Edited by R. Fernandes. Cambridge, Leatherhead Publishing

- Food and Agriculture Organization (FAO), 2007. Consumption of 10 major animal foods. Assessed at: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/fao-statistical-yearbook-2007-2008/d-consumption/en/>
- Flores, M., Dura, M.A., Marco, A., Toldra, F., 2004. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci*, **68**, 439–446
- Fung, D. Y., 2010. Microbial Hazards in food: Food-borne infections and intoxications. In *Handbook of meat processing*, pp. 481-500. Edited by F. Toldra, USA: Blackwell Publishing
- Gan, H. L., Che Man, H. B., Tan, C. P., Noraini, I., Nazimah, S. A. H., 2005. Characterisation of vegetable oils by surface acoustic wave sensing electronic nose. *Food Chem*, **89**, 507-518
- Gardner, J. W., & Bartlett, P. N., 1994. A brief history of electronic noses. *Sens. Actuators, B*, **18**, 211–220.
- Garcia-Lopez, M. L., Prieto, M., & Otero, A., 1998. The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. In, *The microbiology of meat and poultry*, pp. 1–34. Edited by R. G. Board & A. R. Davies. London: Blackie Academic and Professional.
- Gevers, D., Huys, G. & Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*, **205**, 31-36
- Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L., Daube, G., 2007. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. *Int J Food Microbiol*, **116**, 111-120
- Ghasemi-Varnamkhashti, M., Mohtasebi, S.S., Siadat, M., Balasubramanian, S., 2009. Meat Quality Assessment by Electronic Nose (Machine Olfaction Technology). Review. *Sensors*, **9**, 6058-6083

- Gianelli, M.P., Flores, M., Toldra, F., 2002. Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *J Sci Food Agric*, **82**, 1703–1709
- Gill, C. O., 1976. Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J Appl Bacteriol*, **41**, 401-410
- Gill, C. O., 1998. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In *The microbiology of meat and poultry*, pp. 118-157. Edited by A. Davies, R. Board, London: Blackie academic and professional
- Gill, C. O. & Jeremiah, L. E., 1991. The storage life of non-muscle offals packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol*, **8**, 339-353
- Gill, C.O., and Newton, K.G., 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Meat Sci*, **2**, 207-217
- Gill, C.O., and Newton, K.G., 1979. Spoilage of vacuum packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures. *Appl Environ Microbiol*, **37**, 362-364
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G., & Kell, D.B., 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*, **22**, 245-252
- Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., & Nychas, G.-J. E., 2008. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiol*, **25**, 313–323
- Gustavsson, P. & Borch, E., 1993. Contamination of beef carcasses by psychrotrophic *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* at different stages along the processing line. *Int J Food Microbiol*, **20**, 67-83
- Harrigan, W.F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. California: Elsevier Science and Technology

- Hernández Gómez, A., Wang, J., Hu, G., & García Pereira, A., 2007. Discrimination of storage shelf-life for mandarin by electronic nose technique. *Lebens-Wissen und Techn*, **40**, 681–689
- Holm, E.S., Schäfer, A., Skov, T., Koch, A.G., Petersen, M.A., 2012. Identification of chemical markers for the sensory shelf-life of saveloy. *Meat Sci*, **90**, 314-322
- Holzapfel, W.H., 1998. The gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In *The Microbiology of Meat and Poultry*, pp. 35-84. Edited by R. G. Board & A. R. Davies, London, UK: Blackie Academic and Professional.
- Horváth, K.M., Seregély, Z., Dalmadi, I., Andrassy, E., & Farkas, J. 2007. Estimation of bacteriological spoilage of pork cutlets by electronic nose. *Acta Micro et Immun Hungarica*, **54**, 179–194
- Huis in't Veld, J.H.J., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *Int J Food Microbiol*, **33**, 1–18
- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C. & Cocolin, L., 2006. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from Italian naturally fermented sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Sci*, **74**, 281-288
- Imafidon, G.I., Spanier, A.M., 1994. Unraveling the secret of meat flavor. *Trends Food Sci Tech*, **5**, 315-321
- Insausti, H.K., Beriain, M.J., Gorraiz, C., & Purroy, A., 2002. Volatile Compounds of Raw Beef from 5 Local Spanish Cattle Breeds Stored Under Modified Atmosphere. *J Food Sci*, **67**, 1580-1560
- Jackson, T.C., Acuff, G.R., Vanderzant, C., Sharp T.R., & Savell, J.W., 1992. Identification and Evaluation of Volatile Compounds of Vacuum and Modified Atmosphere Packaged Beef Strip Loins. *Meat Sci*, **31**, 175- 191

- Jay, J.M., 1986. Microbial spoilage indicators and metabolites. In *Food borne microorganisms and their toxins: Developing methodology*, pp. 219–240. Edited by D. Pierson & N. J. Stern. Basil: Marcel Dekker Inc.
- Jurs, P.C., Bakken, A., & McClelland, H.E., 2000. Computational methods for the analysis of chemical sensor array data from volatile analytes. *Chem Rev*, **100**, 2649–2678
- Kennedy, J., Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D.A., Cowan, C. & Bolton, D. J., 2005. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerator. *J Food Protect*, **68**, 1421-1430
- Kilcher, S., Loessner, M.J., & Klumpp, J., 2010. *Brochothrix thermosphacta* Bacteriophages Feature Heterogeneous and Highly Mosaic Genomes and Utilize Unique Prophage Insertion Sites. *J of Bacter*, **192**, 5441- 5453
- Koutsoumanis, K.A., & Nychas, G.-J.E., 1999. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean Boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 698-706
- Koutsoumanis, K.A., & Sofos, J.N., 2004. Microbial contamination. In W. K. Jensen, C. Devine, & M. Dikeman Editors, *Encyclopedia of meat sciences*, pp. 727–737. Oxford, Elsevier,
- Koutsoumanis, K.A., Stamatiou, A.P., Skandamis, P., & Nychas, G.-J.E., 2006. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 124-134.
- Koutsoumanis, K.A., Stamatiou, A.P., Drosinos, E.H., & Nychas, G.-J.E., 2008. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiol*, **25**, 915–921
- Lambert, A.D., Smith, J.P., & Dodds. K.L., 1991. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat: a review. *Food Microbiol*, **8**, 267-297

- Lambropoulou, K.A., Drosinos, E.H.M. & Nychas, G.-J.E., 1996. The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 °C. *Int J Food Microbiol*, **30**, 281-291
- Law, B.A. & Kolstad, J. 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Anton Leeuw*, **49**, 225-245
- Legg, S.J., Khela, N., Madie, P., Fenwick, S.G., Quynh, V., Hedderley, D.I., 1999. A comparison of bacterial adherence to bare hands and gloves following simulated contamination from a beef carcass. *Int J Food Microbiol*, **53**, 69-74
- Leporq, B., Membré, J.M., Dervin, C., Buche, P., Guyonnet, J.P., 2005. The “Sym’Previus” software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *Int J Food Microbiol*, **100**, 231-237.
- Leroy F., Vasilopoulos, C., Van Hemelryck, S., Falony, G., De Vuyst, L., 2009. Volatile analysis of spoiled, artisan-type, modified-atmosphere-packaged cooked ham stored under different temperatures. *Food Microbiol*, **26**, 94-102
- Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., & Casiraghi, E., 2010. Evaluation and predictive modeling of shelf-life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Sci*, **84**, 129–136
- Li, H., Liang, Y., & Xu, Q., 2009. Support vector machines and its applications in chemistry. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **95**, 188–198
- Li, M.Y., Zhou, G.H., Xu, X.L., Li, C.B., Zhu, W.Y., 2006 Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food Microbiol*, **23**, 607- 611
- Li, M.Y., Niu, H., Zhao, G., Tian, L., Huang, X., Zhang, J., Tian, W., Zhang, Q., 2013. Analysis of mathematical models of *Pseudomonas* spp. growth in pallet-package pork stored at different temperatures. *Meat Sci*, **93**, 855- 864

- Liu, Y., Lyon, B.G., Windham, W. R., Lyon, C E., & Savage, E.M., 2004. Prediction of physical, color, and sensory characteristics of broiler breasts by visible/near infrared reflectance spectroscopy. *Poultry Sci*, **83**, 1467–1474
- Luna, G., Aparicio-Ruiz, R., & García-González, D.L., 2006. A tentative characterization of white dry-cured hams from Teruel (Spain) by SPME-GC, *Food Chem*, **97**, 621–630
- Magan, N., Evans, P., 2000. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J of Stored Products Research*, **36**, 319-340
- Mano, S.B., Ordonez, J.A., & Garcia de Fernando, G.D., 2000. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food Microbiol*, **17**, 657-669
- Mataragas, M., Skandamis, P., Nychas, G-J.E. Drosinos, E.H., 2007. Modeling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. *Meat Sci*, **77**, 348–356
- McDonald, K. & Sun, D.-W.. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int J Food Microbiol*, **52**, 1–27
- McMeekin. T.A., 1982. Microbial spoilage of meats. In: Davies, R. (Ed), *Developments in Food Microbiology I*, pp. 1-40. Applied Science Publishers, London, UK.
- McMillin, K.W., 2008. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci*, **80**, 43-65
- Meinert, L, Andersen, L.T., Bredie, W.L.P., Bjerregaard, C., Aaslyng, M.D., 2007. Chemical and sensory characterization of pan-fried pork flavour: Interactions between raw meat quality, ageing and frying temperature. *Meat Sci*, **75**, 229-242
- Meinert, L, Schofer, A., Bjerregaard, C., Aaslyng, M.D., Bredie, W.L.P., 2009. Comparison of glucose, glucose 6-phosphate, ribose, and mannose as flavor

- precursors in pork; the effect of monosaccharide addition on flavour generation. *Meat Sci*, **81**, 419-425
- Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R., 1998. Bacterial role in flavor development. *Meat Sci*, **49**, 111–123
- Newton, K.G. & Gill, C.O., 1978. The development of anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *J Appl Microbiol*, **44**, 91-95
- Nielsen, H., Esaiassen, M., Heia, K., & Sigernes, S., 2002. Visible/near-infrared spectroscopy: A new tool for the evaluation of fish freshness. *J of Food Sci*, **67**, 1821–1826
- Newton, K.G., & Gill, C.O., 1978. The development of anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *J of Applied Microbiol*, **44**, 91–95.
- Nowak, A., & Czyzowaka, A., 2011. In vitro synthesis of biogenic amines by *Brochothrix thermosphacta* isolates from meat and meat products and the influence of other microorganisms. *Meat Sci*, **88**, 571-574
- Nowak, A., & Piotrowska, M., 2012. Biochemical activities of *Brochothrix thermosphacta*. *Meat Sci*, **90**, 410–413
- Nurjuliana, M., Che Man, Y.B., Mat Hashim, D., Mohamed, A.K.S., 2011. Rapid identification of pork for halal authentication using the electronic nose and gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer. *Meat Sci*, **88**, 638-644
- Nychas, G.-J.E., Drosinos, E.H., & Board, R.G., 1998. Chemical changes in stored meat. In *The Microbiology of Meat and Poultry* (pp. 288–326). Edited by R. G. Board & A. R. Davies, London, UK: Blackie Academic and Professional
- Nychas, G.-J.E., Marshall, D.L. & Sofos, J.N., 2007. Meat, Poultry, and Seafood. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, pp. 105-140 Edited by M. P. Doyle, L. R. Beuchat, Washington D.C: ASM Press.

- Nychas, G.-J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C., & Koutsoumanis K.P., 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*, **78**, 77-89
- Nychas, G.-J.E., & Skandamis, P., 2005. Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In *Improving the Safety of Fresh Meat*. Edited by J. N. Sofos. Cambridge, UK: CRC/Woodhead Publishing Limited. pp. 461–502
- Nychas, G.-J.E., & Tassou, C.C., 1997. Spoilage process and proteolysis in chicken as noted by HPLC method. *J Sci Food Agric*, **74**, 199–208.
- Olafsdottir, G., Chanie, E., Westad, F., Jonsdottir, C. R., Thalmann, S., Bazzo, S., Labreche, S., Marcq, P., Lundby, F., Haugen, J. E., 2005. Prediction of microbial and sensory quality of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by electronic nose. *J of Food Sci*, **70**, 563-574
- Osorio, M.T., Zumalacarregui, J.M., Alaiz-Rodriguez, R., Gusman-Martinez, R., Englesen, S.B., & Mateo, J., 2009. Differentiation of perirenal and omental quality of suckling lambs according to the rearing system from Fourier transforms mid-infrared spectra using partial least squares and artificial neural networks analysis. *Meat Sci*, **83**, 140–147
- O’Sullivan, M.G., Byrne, D.V., Jensen, M.T., Andersen, H.J., & Vestergaard J., 2003. A comparison of warmed-over flavour in pork by sensory analysis, GC/MS and the electronic nose. *Meat Sci*, **65**, 1125–1138
- Panagou, E.Z., Sahgal, N., Magan, N., & Nychas, G.-J.E., 2008. Table olives volatile fingerprints: Potential of an electronic nose for quality discrimination. *Sens. Actuators, B*, **134**, 902–907
- Panagou, E.Z., Mohareb, F.R., Argyri, A.A., Bessant, C.M., & Nychas, G.-J.E., 2011. A comparison of artificial neural networks and partial least squares modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints. *Food Microbiol*, **28**, 782- 790

- Papadopoulou, O., Panagou, E. -Z., Tassou, C. -C., & Nychas, G.-J.E., 2011. Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Res Int*, **44**, 3264–3271
- Papadopoulou, O., Panagou, E.Z., Mohareb, F.R., & Nychas, G.-J.E., 2012. Sensory and microbiological quality assessment of beef fillets using a portable electronic nose in tandem with support vector machine analysis. *Food Res Int*, **50**, 241-249
- Papadopoulou, O., Doulgeraki, A.I., Cocolin, L., Botta, C., & Nychas, G. -J. E., 2013. Genotypic characterization of *Brochothrix thermosphacta* isolated during storage of minced pork under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Meat Sci*, **92**, 735- 738
- Paramithiotis, S., Skandamis, P.N. & Nychas, G.-J. E., 2009. Insights into fresh meat spoilage. *Safety of Meat and Processed Meat, Food Microbiology and Food Safety*, Springer, 55-82
- Pardo, M., & Sberveglieri, G., 2005. Classification of electronic nose data with support vector machines. *Sens. Actuators, B*, **107**, 730–737
- Pedersen, D.K., Morel, S., Andersen, H.J., & Engelsen, S.B., 2003. Early prediction of water-holding capacity in meat by multivariate vibrational spectroscopy. *Meat Sci*, **65**, 581–592.
- Pennacchia, C., Villani, F., & Ercolini, D., 2009. Development of a real-time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled meat. *Int J Food Microbiol*, **134**, 230–236
- Perez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E.C.D., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M., & Zurera, G., 2007. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. *Meat Sci*, **76**, 692–699
- Penza, M., Cassano, G., 2004. Chemometric characterization of Italian wines by thin-film multisensors array and artificial neural networks. *Food Chem*, **86**, 283-296

- Peris, M., & Escuder-Gilabert, L., 2009. A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Anal Ch Acta*, **638**, 1–15
- Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S., 2009. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Sci*, **83**, 175–186.
- Rajamaki, T., Alakomi, H.L., Ritvanen, T., Skytta, E., Smolander, M., & Ahvenainen, R., 2006. Application of an electronic nose for quality assessment of modified atmosphere packaged poultry meat. *Food Control*, **17**, 5–13
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., & Nuñez, M., 2009. Volatile compounds in fresh meats subjected to high pressure processing: Effect of the packaging material. *Meat Sci*, **81**, 321-328
- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive model in food microbiology. *J Appl Microbiol*, **81**, 501-508
- Russo, F., Ercolini, D., Aurelio, G., & Villani, F., 2006. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food Microbiol*, **23**, 797–802
- Sakala R.M., Hayashidani, H. Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C., & Ogawa, M., 2002. Change in the composition of the microflora on vacuum packaged beef during chiller storage. *Int J Food Microbiol*, **74**, 87–99.
- Samelis, J., 2006. Managing microbial spoilage in meat industry. In *Food spoilage microorganisms*, pp. 213-286. Edited by C. de W. Blackburn, Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Schaller, E., Bosset, J.O., Escher, F., 1998. Electronic Noses' and Their Application to Food. *Lebens-Wissen und Techn*, **31**, 305-316

- Sinelli, N., Barzaghi, S., Giardina, C., & Cattaneo, T.M.P., 2005. A preliminary study using Fourier transform near infrared spectroscopy to monitor the shelf-life of packed industrial ricotta cheese. *J of Near Infrared Spectro*, **13**, 293–300.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, K.J., 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *Food Sci & Techn*, **42**, 448-457
- Singh, K. P., Basant, N., & Gupta, S., 2011. Support vector machines in water quality management. *Anal Ch Acta*, **703**, 152–162
- Skandamis, P.N. & Nychas, G-J.E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J Appl Microbiol*, **91**, 1011-1022
- Skandamis, P.N. & Nychas, G-J.E., 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *Int J Food Microbiol*, **79**, 35-45
- Smit, G., Smit, B.A., & Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev*, **29**, 591–610
- Soncin, S., Chiesaa, L.M., Cantonia, C., Biondi, P.A., 2007. Preliminary study of the volatile fraction in the raw meat of pork, duck and goose. *J Food Compos Anal*, **20**, 436- 439
- Stanbridge, L.H., & Davis, A.R., 1998. The microbiology of chill-stored meat. In *The microbiology of meat and poultry* pp. 174–219. Edited by R. G. Board & A. R. Davies London, UK: Blackie Academic and Professional.
- Stolzenbach, S., Leisner, J.J., Byrne, D.V., 2009. Sensory shelf life determination of a processed meat product ‘rullepølse’ and microbial metabolites as potential indicators. *Meat Sci*, **83**, 285-292

- Stutz, H.K., Silverman, G.J., Angelini, P., & Levin, R.E., 1991 Bacteria and volatile compounds associated with ground beef spoilage. *J Food Sci*, **56**, 1147-1153
- Tang, J., Jin, Q.Z., Shen, G.H., Ho, C.T., Chang, S.S., 1983. Isolation and identification of volatile compounds from fried chicken. *J of Agric Food Chem*, **31**, 1287–1292
- Tsigarida, E., & Nychas, G.-J.E., 2001. Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *J Appl Microbiol*, **90**, 696–705
- Tsigarida, E., Boziaris, I.S., & Nychas, G.-J.E., 2003. Bacterial synergism or antagonism in a Gel Cassette system. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 7204-7209
- Van de Voort, 1992. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res Int*, **25**, 397-403
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol reviews*, **60**, 407-438.
- Vasilopoulos, C., Ravyis, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., & Leroy, F., 2008. Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *J of Applied Microbiol*, **104**, 1341–1353
- Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L. & Leroy, F., 2010. Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiol*, **27**, 77-84
- Verbeke, W., Perez-Cueto, F.J.A., de Barcellos, M.D., Krystallis, A., & Grunert, K.G., 2009. European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Sci*, **84**, 284–292

- Verbeke, W., Van Oeckel, M.J., Warnants, N., Viaene, J., Boucque, Ch.V., 1999. Consumer perception, facts and possibilities to improve acceptability of health and sensory characteristics of pork. Review. *Meat Sci*, **53**, 77-99
- Versari, A., Parpinello, G P., Chinnici, F., & Meglioli, G., 2011. Prediction of sensory score of Italian traditional balsamic vinegars of Reggio-Emilia by mid-infrared spectroscopy. *Food Chem*, **125**, 1345–1350
- Viana, E.S., Gomide, L.A.M., Vanetti, M.C.D., 2005. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. *Meat Sci*, **71**, 696-705
- Vorst, K.L., Todd, E.C.D., & Ryser, E.T., 2006. Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *J Food Protect*, **69**, 619–626
- Wang, L., Li, Y., & Mustapha, A., 2007. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real time PCR and immunomagnetic separation. *J Food Protect*, **70**, 1366–1372
- Wang, D., Wang, X., Liu, T., & Liu, Y., 2012. Prediction of total viable counts on chilled pork using an electronic nose combined with support vector machines. *Meat Sci*, **90**, 373–377
- Wettasinghe, M., Vasanthan, T., Temelli, F., & Swallow, K., 2001. Volatile flavor composition of cooked by-product blends of chicken, beef and pork: a quantitative GC-MS investigation. *Food Res Int*, **34**, 149-158
- Xia, J., Psychogios, N., Young, N., Wishart, D.S., 2009. MetaboAnalyst: a web server for metabolomics data analysis and interpretation. *Nucleid Acids Research*, **37**, doi: 10.1093/nar/gkp356
- Xie, J., Sun, B., Zheng, & F., Wang, S., 2008. Volatile flavor constituents in roasted pork of Mini-pig. *Food Chem*, **109**, 506–514

- Xu, Y.Z., Anyogu, A., Ouoba, L.I.I., & Sutherland, J.P., 2010a. Genotypic characterization of *Brochothrix* spp. isolated from meat, poultry and fish. *Lett in Applied Microbiol*, **51**, 245–251
- Xu, Y., Cheung, W., Winder, C.L., Goodacre, R., 2010b. VOC-based metabolic profiling for food spoilage detection with the application to *detecting Salmonella typhimurium* contaminated pork. *Anal Bioanal Chem*, **397**, 2439-2449
- Young, L.L., Reviere, R.D. & Cole, A.B., 1988. Fresh meat red meat: a place to apply modified atmosphere. *Food Techn*, **42**, 65-69
- Yu, A-N., Sun, B-G., Tian, D-T., & Qu, W-Y., 2008. Analysis of volatile compounds in traditional smoke-cured bacon (CSCB) with different fiber coatings using SPME, *Food Chem*, **110**, 233–238
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., & Uden, G., 2006. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbio Biotechnol*, **72**, 421–429
- Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y., 2010. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Sci*, **86**, 119-128

Παράρτημα Ι

Ανακοινώσεις σε εθνικά συνέδρια

- 1) Παπαδοπούλου Ο., Τάσσου Χ., Πανάγου Ζ.Ε. και Νυχάς Ι-Γ.Ε., 2009. Έλεγχος της αλλοίωσης χοιρινού κιμά με μικροβιακές και βιοχημικές μεθόδους. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων, 15-17 Οκτωβρίου 2009, Ρέθυμνο Κρήτης.
- 2) Παπαδοπούλου Ο., Τάσσου Χ., Μαλλιδης Κ., και Νυχάς Ι-Γ.Ε. 2010. Έλεγχος της ποιότητας χοιρινού κιμά με την τεχνική φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier. 3^ο Πανελλήνιο συνέδριο ΔΕΔΥΤ, 04-06 Ιουνίου, Θεσσαλονίκη.
- 3) Ο. Papadopoulou, E. Z. Panagou, A. Argyri and G.-J. E. Nychas, 2012. Multi-spectral image analysis new dimension in evaluation of meat spoilage. 29th September-2nd October, Meat Days 2012, international Athens airport, Athens, Greece.

Παράρτημα ΙΙ

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- 1) Papadopoulou O., Panagou E., Mallidis C., and Tassou C., 2009. Potential use of Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) to assess pork spoilage. IAFP's Fifth European Symposium on Food Safety, 7-10 October, Berlin, Germany
- 2) Olga S. Papadopoulou, Chrysoula C. Tassou, Luigi Schiavo, Antonio Scarpa, Efstathios Z. Panagou, 2010. Monitoring minced pork spoilage using electronic nose technique and chemometrics. Food Micro 2010, 30 August – 3 September, Copenhagen, Denmark.
- 3) O. S. Papadopoulou, C. C. Tassou, L. Schiavo, G.-J. E. Nychas, E. Z. Panagou, 2011. Rapid assessment of meat quality by means of an electronic nose and support vector machines. 11th International Congress on Engineering and Food, 22-26th of May, Athens, Greece
- 4) O.S, Papadopoulou, A. Doulgeraki, Tassou S. and GJ Nychas, 2012. Genotypic Characterization of *Brochothrix thermosphacta* Strains that Developed during Storage of Minced Pork under Aerobic or Modified Atmosphere Packaging Conditions. 22-25 July 2012, International Association for Food Protection (IAFP), Rhode Island Convention Center Providence, Rhode Island, USA.
- 5) O. Papadopoulou, C. Tassou, G.-J. Nychas and E. Panagou, 2012. Rapid quantitative and qualitative assessment of minced pork meat spoilage using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data. 22-25 July 2012, International Association for Food Protection (IAFP), Rhode Island Convention Center Providence, Rhode Island, USA.
- 6) Olga S. Papadopoulou, Agapi I. Doulgeraki, Luca Cocolin, and George-John E. Nychas, 2012. Characterization of *Brochothrix thermosphacta* strains with Rep and Sau-PCR that developed during storage of minced pork under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. 3-7 September, 2012 Food Micro, Istanbul, Turkey

- 7) Olga Papadopoulou, Iliopoulos Vasilis, Athanasios Mallouchos, Eustathios Z. Panagou and George-John E. Nychas, 2013. Monitoring minced pork spoilage using GC/MS and chemometrics. 8th International Conference 2013, Predictive Modelling of Food Quality and Safety, 16-20 of September, 2013, Paris, France

Παράρτημα ΙΙΙ

Δημοσιευμένες εργασίες

Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat

Bjørn Skovlund Dissing · Olga S. Papadopoulou ·
Chrysoula Tassou · Bjarne Kjaer Ersbøll ·
Jens Michael Carstensen · Efstathios Z. Panagou ·
George-John Nychas

Received: 19 January 2012 / Accepted: 1 May 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The quality of stored minced pork meat was monitored using a rapid multispectral imaging device to quantify the degree of spoilage. Bacterial counts of a total of 155 meat samples stored for up to 580 h have been measured using conventional laboratory methods. Meat samples were maintained under two different storage conditions: aerobic and modified atmosphere packages as well as under different temperatures. Besides bacterial counts, a sensory panel has judged the spoilage degree of all meat samples into one of three classes. Results showed that the multispectral imaging device was able to classify 76.13 % of the meat samples correctly according to the defined sensory scale. Furthermore, the multispectral camera device was able to predict total viable counts with a standard error of prediction of 7.47 %. It is concluded that there is a good possibility that a setup like the one investigated will be successful for the detection of spoilage degree in minced pork meat.

B. S. Dissing (✉) · B. K. Ersbøll · J. M. Carstensen
Institute for Informatics and Mathematical Modelling,
Technical University of Denmark,
Richard Petersens Plads, Building 321,
2800 Kgs Lyngby, Denmark
e-mail: bsdi@imm.dtu.dk

O. S. Papadopoulou · E. Z. Panagou · G.-J. Nychas
Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods,
Department of Food Science and Technology,
Agricultural University of Athens,
Iera Odos 75,
11855 Athens, Greece

O. S. Papadopoulou · C. Tassou
Hellenic Agricultural Organisation 'Demeter',
Institute of Technology of Agricultural Products,
Sofokli Venizelou 1,
Lycovrissi 141 23, Greece

Keywords Multispectral imaging · Meat spoilage ·
Chemometrics · Computational biology · Meat quality ·
Non-invasive methods · Converging technologies ·
Predictive modelling

Introduction

So far, more than 50 chemical, physical and microbiological methods have been proposed for the detection and measurement of bacterial safety or spoilage in meat (Ellis and Goodacre 2001; Byun et al. 2003; Nychas et al. 2008). However, most of these methods are time-consuming and provide retrospective information, so they cannot be used on- or at-line (Ellis et al. 2002, 2004; Nychas et al. 1998, 2008). Additionally, the development in food processing and preservation technologies [e.g., vacuum packaging (VP), modified atmosphere packaging (MAP), active packaging, etc] as well as the storage temperature either misused or even abused in the meat chain (Koutsoumanis and Taoukis 2006) make it evident that the important and urgent task of identifying safety and spoilage indicators is a complicated proposition. On the other hand, the meat industry needs rapid analytical methods or tools for quantification of these indicators in order to determine and select suitable processing procedures for their raw material and to predict the remaining shelf life of their products. The use of microbial metabolites as well as the quantification of fingerprinting e.g. with vibrational spectroscopy instruments in meat has been continuously recognized as a potential means for assessing meat quality (Dainty 1996; Nychas et al. 2008).

Recently the potential of using image analysis of digital colour pictures has been applied for assessing the quantitative distribution of different tissues in the surface of hams prior to salting (Sánchez et al. 2008) and for the quantification of fat

content in salmon fillets (Stien et al. 2007). It is, however, still difficult with most vision technologies to reliably distinguish small differences in the appearance of food products, because the visual variation is typically within shades of red, shades of green, shades of yellow, or in the case of fried meat within shades of greyish-brown. A way to combine the strengths of vision technology and spectroscopy is to use multispectral imaging in the visual and near infrared range of wavelengths. This is the case with a videometer, an instrument able to record spectral reflection properties in narrow bands, thereby making it possible to assess the surface chemistry maps or hypercubes of the object of interest (Carstensen et al. 2006; Chevallier et al. 2006). In short, multispectral images can provide not only spatial information, such as regular imaging systems, but also spectral information for each pixel in an image. Thus, using hyperspectral images, it is possible to assess physical and geometric characteristics such as colour, size, shape and texture. Several publications have been written on the subject of using multispectral imaging for food control (Gowen et al. 2007; Daugaard et al. 2010; Taghizadeh et al. 2010). Multispectral images are a natural source of massive, high dimensional datasets, which may be analyzed using specific techniques. A discipline, which is gaining ground in the area of chemical and biological analysis, is the discipline of machine learning that covers advanced statistical and numerical methods such as support vector machines, cluster analysis, neural networks, partial least squares and logistic regression. Both supervised as well as unsupervised statistical methods are considered, and may be used in conjunction with multispectral image analysis to relate multispectral images to chemical reference measurement values or sensory labels. Clustering algorithms based on data from multispectral images have been thoroughly investigated to assess food quality (Tran et al. 2005). In this study, the potential of multispectral imaging techniques was exploited for the assessment of spoilage degree in pork meat. The specific objective was to evaluate pork meat quality based on spectral as well as spatial information using various chemometric techniques, namely regression and clustering. The aim was to find a method that would be able to evaluate meat spoilage regardless of storage temperature (0, 5, 10, 15 and 20 °C) as well as different package types (aerobic and modified atmosphere). The evaluation was based on predicting microbial growth as well as on classifying between different quality classes as evaluated by a sensory panel.

Materials and Methods

Experimental Design and Sample Preparation

Fresh minced pork (*Sus scrofa domesticus*, pH 5.6–5.8) obtained from different carcasses was purchased immediately

after grinding from the central meat market in Athens and transported under refrigeration to the laboratory within 30 min. Minced pork was divided in portions of 50 g, packed individually and stored under controlled isothermal conditions at 0, 5, 10, 15 and 20 °C in high precision (± 0.5 °C) incubators (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) for up to 580 h, depending on storage temperature, until spoilage was pronounced (intense discolouration and presence of off-odours) either aerobically (AIR) or modified atmosphere packaging (MAP). For aerobic storage, meat samples were placed on Styrofoam trays which were subsequently wrapped manually with air-permeable polyethylene plastic film. The underlying objective of the treatment was to simulate the pre-packaged meat available in retail outlets. Samples packaged in MAP were also enclosed in plastic pouches with oxygen permeability of $6 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ 24 h}^{-1}$ at 20 °C and 50 % RH, flushed with a gas mixture of 60 % CO_2 /20 % O_2 /20 % N_2 and heat-sealed with a HencoVac machine (Howden Food Equipment BV, The Netherlands). This mixture is a typical gas mixture used in the meat industry. Oxygen was used in the packages to maintain the desirable red colour of the meat while carbon dioxide was used for antimicrobial purposes and nitrogen to get a rigid pack. For every time point two samples were withdrawn for further analysis. The first sample was divided into two portions; one portion was used for microbiological analysis and the other for image analysis. The second sample was also divided into two portions; one portion was used for microbiological analysis and the other portion for sensory analysis. It was assumed that the microbial population in the first portion of the meat would be representative of the microbial population in the other portion of the meat subjected to image analysis or sensory analysis. Samples stored at AIR packaging at 5 and 0 °C were analyzed approximately every 12 and 24 h, respectively, whereas samples stored at 10 and 15 °C were analyzed every 6–7 h. Finally, samples stored at 20 °C were analyzed every 4 h. For samples stored at MAP at 0 and 5 °C, analysis was undertaken approximately every 24 h, whereas samples stored at 10 °C were analyzed every 8 h. Samples stored at 15 and 20 °C were analyzed every 5 h. In total, 310 meat samples (160 samples stored in AIR and 150 samples stored in MAP) underwent microbiological analysis (results are shown as mean values) for all temperatures and packaging conditions tested. Specifically, 32 and 30 meat samples were analyzed from each storage temperature at aerobic and MAP conditions, respectively.

Microbial Analyses

Duplicate packages from each storage temperature and packaging condition were analyzed at appropriate time intervals to allow for efficient kinetic analysis of different microbial groups. In this study only total viable counts (TVC) were used for the development of models, although

Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria, pseudomonads, *Brochothrix thermosphacta* and yeasts were also analyzed (Papadopoulou et al. 2011). In particular, in order to estimate the number of viable cells, minced meat samples (25 g) were weighed aseptically, added to sterile quarter strength Ringer's solution and homogenized in a stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) for 60 s at room temperature. Serial dilutions were prepared with the same Ringer's solution, and duplicate 0.1- or 1-ml samples of the appropriate dilutions were spread or mixed on the following media: plate count agar (PCA, Biolife 4021452, Milano, Italy) for total viable counts, incubated at 30 °C for 48–72 h; Pseudomonas agar base selective supplement (PAB, Biolife 401961, Milano, Italy) for *Pseudomonas* spp., incubated at 25 °C for 48–72 h; streptomycin thallos acetate actidione agar (STAA, Biolife 402079, Milano, Italy) for *B. thermosphacta*, incubated at 25 °C for 72 h; violet red bile glucose agar (VRBGA, Biolife, 402185, Milano Italy) for Enterobacteriaceae counts, overlaid with the same medium and incubated at 37 °C for 18–24 h; and de Man–Rogosa–Sharp medium with pH adjusted at 5.7 (MRS, Biolife, 4017282, Milano, Italy) for lactic acid bacteria, overlaid with the same medium and incubated at 30 °C for 48–72 h. Growth data from plate counts were log-transformed and fitted to the primary model of Baranyi and Roberts (1994) using the DMFitprogram (available at www.combase.cc) to determine the kinetic parameters of microbial growth (maximum specific growth rate and lag phase duration). In parallel with microbiological analyses, the pH value of minced pork meat was recorded with a digital pH-meter (Metrohm pH Lab, Switzerland), the glass electrode of which was immersed in the homogenised meat sample after the end of microbiological analysis.

Sensory Analysis

Sensory evaluation of pork samples was performed during storage by a sensory panel composed of five members (in-house trained staff from the laboratory) at the same time intervals as for microbiological analyses as described elsewhere (Argyri et al. 2010). The same trained persons were used in each evaluation, and all were blinded to the meat sample tested. The sensory evaluation was carried out in artificial light, and the temperature of the packed product was close to ambient. The descriptors selected were based on the perception of colour, smell and taste. The first two descriptors were assessed before and after cooking for 20 min at 180 °C in a preheated oven, while the last descriptor was evaluated only after cooking. Each sensory attribute was scored on a three-point hedonic scale corresponding to fresh, semi-fresh and spoiled. The first vague indication of meat spoilage occurred at the point labelled semi-fresh. Odour characteristics of minced pork, as determined by special

samples kept frozen and thawed prior to each sensory evaluation, were considered as fresh. Putrid, sweet, sour or cheesy odours were regarded as indicative of microbial spoilage and classified the samples as spoiled. Bright colours typical of fresh oxygenated meat were considered fresh, whereas a persistent dull or unusual colour rendered the sample spoiled (Skandamis and Nychas 2002; Ammor et al. 2009; Argyri et al. 2010). Overall, 155 minced pork meat samples were scored by the taste panel and discriminated into the pre-defined groups as fresh (18), semi-fresh (64) and spoiled (73).

Multispectral Imaging System

The data acquisition was done using VideometerLab (Carstensen and Hansen 2003; Videometer 2009), which acquires multi-spectral images in 18 different wavelengths ranging from 405 to 970 nm. The spectral radiation of the 18 bands is not uniformly distributed over the sampling area, but rather at wavelengths 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 and 970 nm. The acquisition system records surface reflections with a standard monochrome charge coupled device chip, nested in a Point Grey Scorpion camera. The object of interest is placed inside an integrating or Ulbricht sphere in which the camera is top-mounted. The sphere has its interior coated with a matt coating. The coating together with the curvature of the sphere ensures a uniform reflection of the cast light, and thereby a uniform light in the entire sphere. At the rim of the sphere, light emitting diodes (LEDs) with narrow-band spectral radiation distribution are positioned side by side. The LEDs are placed in a pattern which distributes them uniformly around the entire rim. When an image is obtained, the LEDs are turned on successively, and the reflection from that specific wavelength is recorded by the top-mounted camera. The result is a monochrome image with 32-bit floating point precision for each LED type, giving in the end a hyperspectral cube of dimensionality 1280×960×19. The system is first calibrated radiometrically and geometrically using well-defined standard targets, followed by a light setup based on the type of object to be recorded (Folm-Hansen 1999). The homogeneous diffuse light, together with the calibration steps, ensures an optimal dynamic range and minimizes shadows and shading effects as well as specular reflection and gloss-related effects. The system has been developed to guarantee the reproducibility of images collected, which means it can be used in comparative studies of time series or across a large variety of different samples (Hansen et al. 2005; Clemmensen et al. 2007; Gomez et al. 2007; Dissing et al. 2009).

Image Processing and Statistical Analysis

An example of a recorded multispectral image is seen in Fig. 1a, where the channels are listed according to

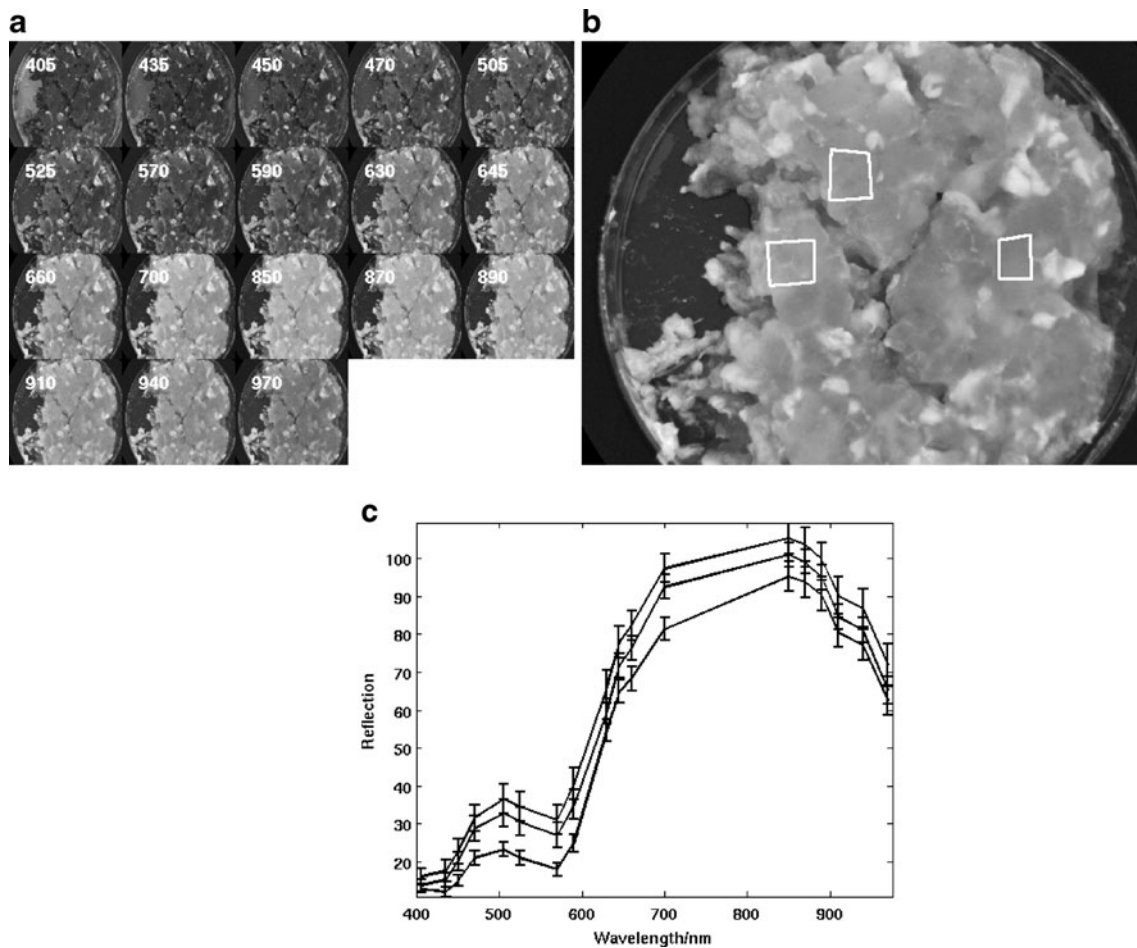
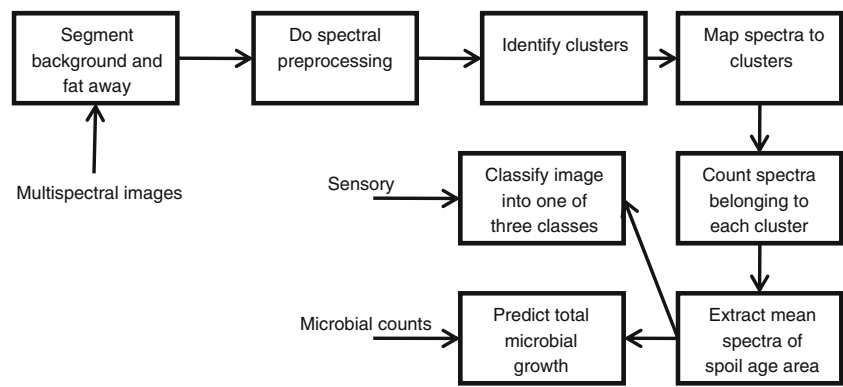


Fig. 1 **a** All channels, ranging from 410 to 970 nm. **b** Channel recorded at 525 nm with squared annotation areas. **c** Mean spectra of square areas in (**b**)

wavelengths mentioned in the previous section. Moreover, Fig. 1b, c illustrates the mean reflectance spectrum, with error bars indicating one standard deviation for three different locations in the same piece of meat. The mean spectra are calculated as mean values of all the pixels within each of the three squares indicated in Fig. 1b. The diversity of spectra contained within each image may be appreciated when looking at the difference between these mean spectra. The largest difference between the spectra is a scaling, which basically indicates how much light is reflected in general in a point or in other words the luminosity. Scaling differences has many causes, but two essential causes are shadow effects as well as light-scattering effects due to the topology of the surface. In order to compensate for such influences, a simple pre-processing step, commonly known as autoscaling or simple standardization of data (Hastie et al. 2009), which centers all spectra and ensures unit variance, has been used on the images. Such a pre-processing step will help enhance the true differences in the spectra, and thereby improve the later signal processing. Figure 2 shows an overview of the entire data processing pipeline which has

been performed in order to quantify the spoilage degree. The images are initially segmented or divided into regions of interest. This means dividing the images into foreground and background, meaning only the meat area, except fat areas, is to be considered in the further statistical analysis. It is common to use orthogonal transformations such as principal component analysis to find similar tissues in the multispectral image space. However, PCA creates orthogonal projection vectors based on a variance maximizing criterion and does not take spatial information into account. The maximum noise fraction (MNF) (Green et al. 1988) is a related method, also belonging to the orthogonal transformation function family, which seeks to maximize the signal to noise ratio (SNR) instead of the variation. This is done by estimating the covariance matrix of the spectra, Σ , as well as the covariance matrix of the noise Σ_{Δ} (Nielsen 1999) and finding vectors, b , that maximize the ratio of these (the Rayleigh quotient).

$$R(b) = \frac{b^T \Sigma_{\Delta} b}{b^T \Sigma b}$$

Fig. 2 Schematic structure of processing pipeline

When the noise covariance structure is estimated as the covariance of the difference of neighbouring pixels, the MNF reduces to the maximum autocorrelation factor (MAF). A maximization of the signal to noise ratio is then achieved by minimizing the autocorrelation between neighbouring pixels. This optimally finds projection directions of similar neighbouring reflection properties. Two components are used to cut away background as well as fat tissue, where an adaptive thresholding technique (Otsu 1979) is used to transform components into masks which indicate pure meat. Before clustering the spectra, a standardization of the spectra as previously described is performed. All pixels are finally mapped to identify clusters to indicate areas of spoilage in order to improve predictability of the entire sample image. The model used was not aware of any conditions the meat was treated under. An unsupervised K-means algorithm was used to find a set of clusters based on the recorded spectral images. These clusters

merely describe a spectral grouping, thus completely disregarding packaging conditions and temperature. The number of pixels in the images belonging to the various clusters was counted which showed correlation with spoilage degree. The size of these areas was then used in a regression model with output being spoilage degree. In this sense, when a new spectral image is acquired, all pixels in the new image must be mapped to one of the analysed clusters and counted, and finally the spectral image may be predicted to a spoilage degree.

Results and Discussion

Development of Microbial Association

The microbial association during storage of minced pork meat under aerobic and MAP condition is described

Table 1 Estimated kinetic parameters of total viable counts (TVC) in minced pork meat stored aerobically and under modified atmospheres at various temperatures

Temperature (°C)	Packaging	Lag phase (h)	y_0^a (log cfu/g)	y_{end}^b (log cfu/g)	μ_{max}^c (h ⁻¹)	Standard error	R^2
0	AIR	74.1±23.75 ^c	5.95±0.24 ^f	9.68±0.22 ^e	0.045±0.008 ^e	0.332	0.947
5	AIR	21.6±6.42	5.62±0.27	9.64±0.11	0.093±0.008	0.255	0.974
10	AIR	2.3±6.84	5.39±0.23	9.34±0.20	0.146±0.016	0.369	0.933
15	AIR	1.7±5.51	5.37±0.01	9.51±0.17	0.205±0.026	0.404	0.930
20	AIR	3.8±3.30	5.88±0.05	9.42±0.11	0.325±0.038	0.327	0.938
0	MAP	6.1±78.04	5.57±0.08	7.20±0.195	0.008±0.001	0.258	0.830
5	MAP	– ^d	5.65±0.38	7.78±0.09	0.027±0.005	0.246	0.902
10	MAP	7.8±9.11	5.46±0.17	7.94±0.10	0.082±0.009	0.251	0.929
15	MAP	1.7±6.07	5.50±0.07	8.26±0.10	0.126±0.015	0.266	0.928
20	MAP	–	5.36±0.06	8.32±0.11	0.218±0.048	0.366	0.877

^{a,b} Initial and final population estimated by the Baranyi and Roberts model

^c Maximum specific growth rate

^d Not detected

^e Standard error

^f Standard deviation

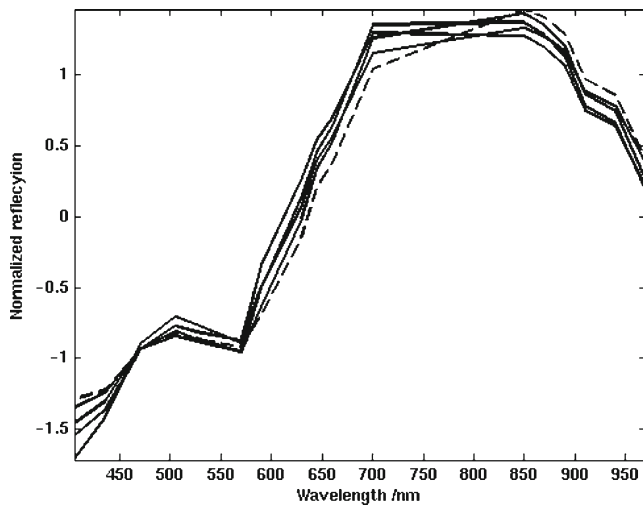


Fig. 3 Spectral characteristics of the five meat types. The *dotted line* indicates the spectrum for spoiled meat types

elsewhere (Papadopoulou et al. 2011). In brief, the initial microbiota of minced pork consisted of *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae. In general, aerobic storage of minced pork at all temperatures allowed the members of microbial association to reach higher population levels in comparison with samples stored at MAP conditions. At air packaging, *Pseudomonas* spp. were the dominant microorganisms followed by *B. thermosphacta*, whereas lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae remained at lower levels. On samples stored under modified conditions, lactic acid bacteria became the dominant bacteria throughout storage, together with *B. thermosphacta* (data not shown). This is in line with the existing data from previous studies dealing with the meat spoilage

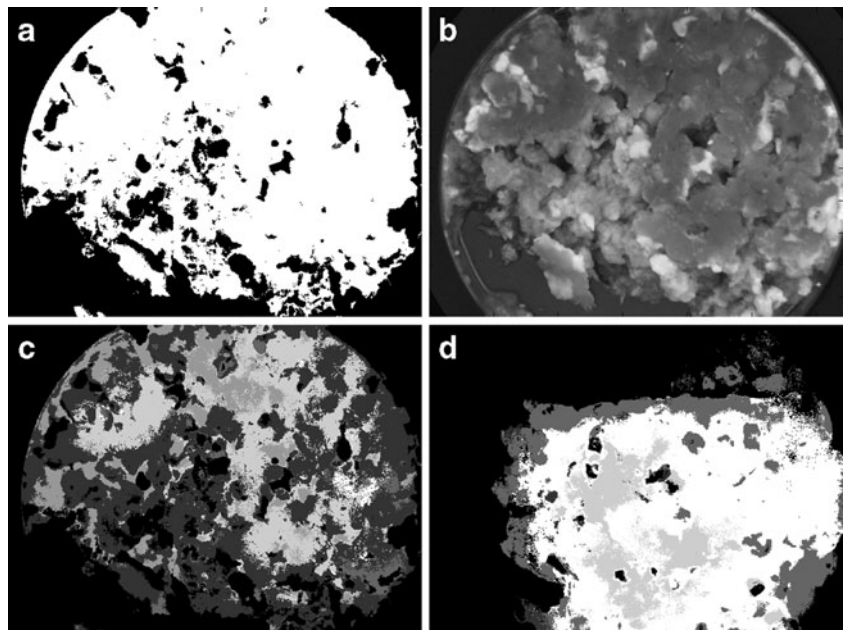
and the contribution of the ESO (Ercolini et al. 2006; Nychas et al. 2008; Doulgeraki et al. 2010). The kinetic parameters estimated by the Baranyi model fitted the experimental data well, as can be inferred by the low values of the standard error of fit and the high values of R^2 (Table 1). In more detail, pronounced lag phase was evident at 0 °C, the duration of which was greatly reduced or not observed at all at higher temperatures. A progressive increase of maximum specific growth rate (μ_{\max}) was observed with increasing storage temperature (Table 1).

The sensory panel judged a meat sample as semi-fresh or spoiled on different time points for each temperature and packaging condition. Specifically, the sensory panel judged a sample as semi-fresh after 108, 48, 21.5 and 16 and 12 h at 0, 5, 10, 15 and 20 °C, respectively, for samples stored under aerobic conditions, while for samples stored under modified atmospheres the corresponding time was 118.5, 97, 65, 36 and 16 h, respectively. In addition, at the time of sensory rejection (meat characterized as spoiled), the mean value of total viable counts was ca. 8 log cfu/g at all storage temperatures. This observation is in agreement with those by previous researchers who concluded that bacterial counts of 7–8 log cfu/g can cause noticeable off-odours and slime (Koutsoumanis et al. 2006, 2008), whereas others have reported that proteolytic changes do not occur until bacterial counts reach approximately 9 log cfu/cm² (Brooks et al. 2008).

Imaging Analysis

Based on pre-processed spectra originating from the pure meat area, a large variation in the pixels is still found; however, it is more subtle. By empirically looking at spectra

Fig. 4 **a** Binary mask for a piece of spoiled meat having TVC of 9.83 log cfu/g. A greyscale image of this same piece of meat is seen in **(b)** where the recording at 590 nm is shown. The binary mask indicates where in the image meat is located, which is used in further analysis. **c** Spatial distribution of how pixels have been mapped to identified clusters. There is a total of five clusters. *Dark areas* indicate spoiled meat, while *lighter areas* represent more fresh meat. **d** Spatial distribution of clusters in a fresh portion of pork meat. The clusters are colour coded in the same order as in **(c)**, i.e. *light clusters* indicate fresh meat. The difference in cluster colours in the two images is very clear



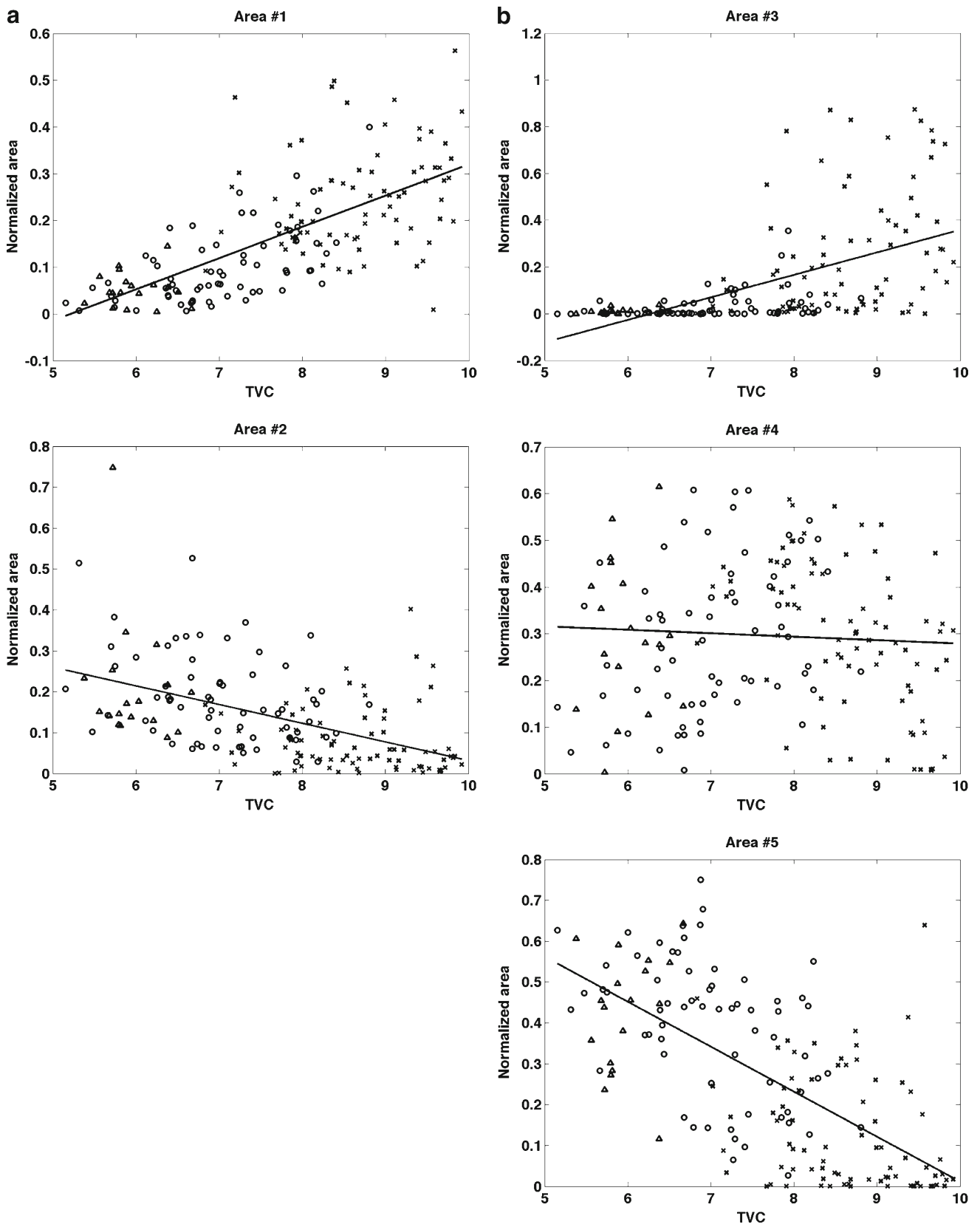


Fig. 5 Meat area size as a function of total viable count with correlations 0.68, -0.49, 0.55, -0.058 and -0.67. Each plot represents a meat area assigned to a similar Euclidean. Fresh (Δ), semi-fresh (o) and spoiled (x) samples

as well as colour-transformed images, it was found that five different types of meat was the optimal subdivision of meat types existing across the meat samples. These types of meat were basically very bright areas with high fat content, more pure meat, which had been oxidized, areas which appeared very spoiled with abnormal meat colours and two intermediate types. A K-means algorithm (Hastie et al. 2009) was used to identify the cluster centers shown in Fig. 3 as normalized spectra. A specific cluster center is shown as a dashed line, which indicates areas of meat with a spoiled appearance. Carefully inspecting the characteristics of this spectrum reveals a higher response in the area of shorter wavelengths corresponding to blue and a lower response from 600 to 800 nm resembling the reddish colours. Furthermore, it then seems to shift in the high, near infrared area, indicating a higher response here compared to the remaining four cluster centers. These characteristics resemble quite well an intuitive understanding of the appearance of spoiled meat as being less red and more green/blue.

Having normalized images as well as identified cluster centers, a mapping of each recorded spectrum in each picture may be done by calculating either true or approximated Euclidean distances and assigning each pixel to its closest cluster. This process creates a further segmented image, where it is possible to estimate the distribution of different types of meat surface in each image. This distribution may then directly or indirectly be used to classify the image as being fresh, semi-fresh or spoiled, for example, or to quantify the amount of bacterial growth on the meat by predicting the total viable counts, which are both shown as the two output boxes in Fig. 2. The actual classification of images, and prediction of total viable counts, was done using a logistic regression model (Hastie et al. 2009) and a partial least squares model (Hastie et al. 2009), respectively. Figure 4a shows a binary mask of the meat sample in Fig. 4b. The mask indicates the areas which represent only meat, i.e. no background or fat. This mask was created using a maximum autocorrelation transformation, which decomposes a multispectral image into similar tissue types, the first step in the spectral process line (Fig. 2). This specific piece of meat is very spoiled, having a total viable count of 9.8 log cfu/g. A graphical representation of the image after each pixel has been assigned to a cluster center is shown in Fig. 4c. The image contains five levels of greytone, each corresponding to a cluster center. The very dark area represents spoiled meat, while the very bright area represents less spoiled meat. For comparison a fresh piece of meat is seen in Fig. 4d, with TVC measured to 5.6 log cfu/g. A clear difference is seen as the meat area generally appears much brighter in the fresh sample (Fig. 4d) compared to the spoiled image in Fig. 4b. Thus, the majority of pixels in the two images have been assigned to different clusters. The dark edges of the fresh piece of meat might be due to an

Table 2 Logistic regression on sensory labels using meat area estimations

From/to	Fresh	Semi-fresh	Spoiled	Row total	Sensitivity (%)
Fresh	10	7	1	18	55.5
Semi-fresh	7	46	11	64	71.8
Spoiled	1	10	62	73	84.9
Column total	18	63	74	155	
Specificity (%)	55.56	73.02	83.8		

Total classification rate 76.13 %, Cohens kappa value 0.598

initial spoilage, but may also be due to scattering effects as well as shadow effects caused by the change in topology in these regions. Being able to spatially determine areas of spoilage enables spatial inference on the images. This means e.g. that it is possible to count how many pixel occurrences of each meat type there exist in the image, and estimate the total area percentage covered by a specific meat type. Doing this for all types of area on all images, and plotting it as a function of total viable count, is seen in Fig. 5. In Fig. 5 the meat area for cluster 1 shows an increase in area as TVC increases, while the area for cluster 5 shows a linear decrease as TVC increases. The area size for the intermediate clusters shows little or no development as TVC increases. The trends of clusters 1 and 5 are interpreted as a spoiled meat cluster and a fresh meat cluster. In order to extract the best features for a prediction model of TVC, as well as for a classification model of sensory labels, the mean spectrum of the area of spoiled meat in all images is used as a feature space. A logistic regression model using the extracted features as covariates was used to classify the pork samples into three sensorial categories (fresh, semi-fresh and spoiled). For comparison, a logistic regression was similarly used to classify the same samples into the same categories using the four microbial measurements as independent variables. Due to the small number of samples, both classification models were assessed using leave-one-out cross-validation in order

Table 3 Logistic regression on sensory labels using microbial reference data

From/to	Fresh	Semi-fresh	Spoiled	Row total	Sensitivity (%)
Fresh	12	6	0	18	66.6
Semi-fresh	6	46	12	64	71.8
Spoiled	0	7	66	73	90.4
Column total	19	61	75	155	
Specificity (%)	63.2	75.4	88		

Total classification rate 80 %, Cohens kappa value 0.662

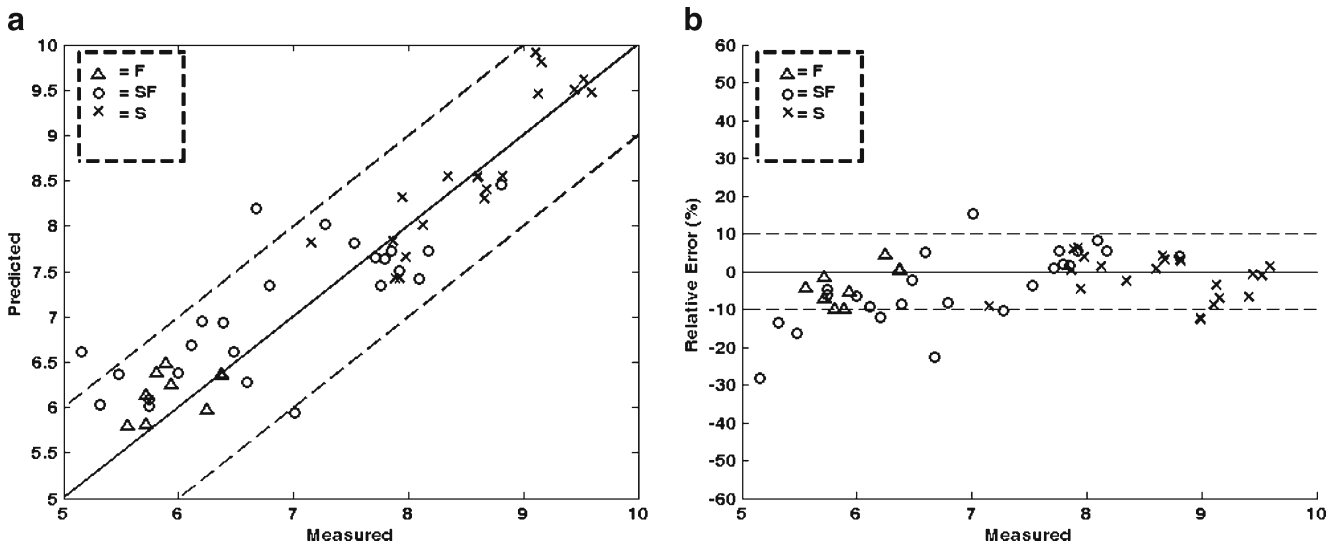


Fig. 6 **a** Regression results for total viable counts using a partial least square. Model trained using cross-validation on a training set and validated on an unknown test set. The plotted values are predicted versus total viable counts. The *lines* show the line of equality, i.e. a

perfect fit, while the *dashed lines* represent ± 1 log cfu unit. **b** Relative errors in % between observed and predicted total viable counts (TVC) during storage of pork meat at different temperatures, atmospheres and time spans. *F* fresh, *SF* semi-fresh, *S* spoiled meat samples

to obtain realistic and generalizable results. The classification accuracy of the models is seen as confusion matrices together with their sensitivity and specificity, and each meat sample analyzed was determined by the bias and accuracy factors (Ross 1996), the mean relative percentage residual, the mean absolute percentage residual (Palanichamy et al. 2008) and finally the root mean squared error of prediction and the standard error of prediction. A classification rate of 73.6 % for overall correct classification as seen in Table 2 was obtained. The sensitivity of the model was found to be 55.5 %, 71.8 % and 84.9 % for fresh, semi-fresh and spoiled meat samples, respectively. This indicates fairly high uncertainty for the fresh samples, which are frequently identified as semi-fresh and vice versa. The sensory labels were based on other organoleptic senses than visual appearance, such as taste and odour, which are very subjective factors. The number of fresh samples compared to the number of semi-fresh and spoiled is very small, which gives a high

probability that even a small subset of semi-fresh samples, which overlaps fresh samples in feature space, will affect the fresh class sensitivity significantly.

It needs to be stressed that the developed model [a partial least square regression (PLS-R) model] was not aware of any conditions that the meat was treated. An unsupervised K-means algorithm was used to find a set of clusters based on the recorded spectral images. These clusters merely describe a spectral grouping, thus completely disregarding packaging conditions and temperature. The number of pixels in the images belonging to the various clusters was counted which showed correlation with spoilage degree. The size of these areas was then used in a regression model with output being spoilage degree. In this sense, when a new spectral image is acquired, all pixels in the new image must be mapped to one of the analysed clusters and counted, and finally the spectral image may be predicted to a spoilage degree.

Table 4 Key values for the predictive performance of the TVC model for all classes, including overall predictive performance

	Expression	Fresh	Semi-fresh	Spoiled	All
Bias factor (B_f)	$10 \sum \log(P/O)/n$	0.923	0.920	0.973	0.940
Accuracy factor (A_f)	$10 \sum \log(P/O) /n$	1.114	1.209	1.103	1.152
Mean relative percentage residual (MRPE %)	$\frac{1}{n} \cdot \sum \frac{100 \cdot (O-P)}{O}$	-3.662	-4.153	-1.331	-3.005
Mean absolute percentage residual (MAPR %)	$\frac{1}{n} \cdot \sum \frac{100 \cdot (O-P) }{O}$	4.821	8.563	4.348	6.337
Root mean square error (RMSE)	$\sqrt{\frac{\sum (O-P)^2}{n}}$	0.348	0.666	0.466	0.551
Standard error of prediction (SEP %)	$\frac{100}{O} \cdot \sqrt{\frac{\sum (O-P)^2}{n}}$	5.842	9.716	5.410	7.478

O observed counts (log₁₀cfu/g), *P* predicted counts (log₁₀cfu/g), *n* number of samples

Microbial vs Colour Measurements vs Sensory Labels

For comparison, the actual microbial counts were likewise used to classify the sensory labels, as seen in Table 3. Slightly better results are seen for this set of predictors with sensitivity of 66.6 %, 71.8 % and 90.4 %. Thus, the same problem of differentiating between fresh and semi-fresh classes exists for these predictors. Cohens kappa value (Cohen 1960) was calculated to be 0.59 and 0.66, meaning that both values lie in the region of substantial agreement between predicted and observed classes. The prediction of total viable counts as seen in Fig. 6a shows very small errors around the line of equality, $y = ax + b$, $a = 1$, $b = 0$, all within ± 1 log unit area shown with dashed lines. However, three samples did fall outside the area of 1 log unit. A partial least squares model was used for TVC prediction, which requires a separate training and test set to select model parameters and to evaluate the model. The selection of parameters was done using leave-one-out cross-validation on 2/3 of randomly selected data from the entire set of 155 samples. The remaining 52 samples were used for validating the model. It is crucial that the data used for selecting model parameters is not used for validating the model, as this will clearly give a biased and over-fitted model. The PLS regression equation between total viable counts (TVC) and image data is given by the following equation:

$$Y = 0.6115 \times 10^{-5} \cdot X_1 - 0.5346 \times 10^{-5} \cdot X_2 + 0.2147 \times 10^{-5} \cdot X_3 - 0.0716 \times 10^{-5} \cdot X_4 + 0.3073 \times 10^{-5} \cdot X_5$$

where Y is the total viable counts (log cfu/g) of the meat samples and $X_1 \dots X_5$ are the five clusters of pixels derived from K-means clustering. The parameters in the above equation represent the beta coefficients of the PLS regression equation and express the relative importance of each cluster with regard to microbial counts.

The predictive performance of the TVC model is furthermore presented in Fig. 6b, where the relative error in per cent is plotted as a function of the observed microbial population. The errors are seen to be distributed equally around 0, with 83 % of the predicted microbial counts included within the ± 10 % zone of relative errors. Further statistical values for the TVC prediction model are presented in Table 4. Ross (1996) introduced bias factor and accuracy factor as interpretable indices for average deviation or the spread of the results about the prediction. Perfect agreement between the predicted and observed values will lead to bias factors of 1. The bias factor shows values slightly below 1, indicating a very small tendency of underestimation for all types of meat, including the overall bias factor. The accuracy factor furthermore shows that on average the predictions were ≈ 11.3 %, ≈ 20.8 % and ≈ 10.3 % above the observed

values for fresh, semi-fresh, and spoiled meat samples, respectively, while in total ≈ 15 %. This is also confirmed by the mean absolute percentage error, representing the average deviation between observed and predicted counts. The mean relative percentage residual index confirmed the under-prediction for all classes, since they are all below 0. The standard error of prediction index is a relatively typical deviation of the mean prediction values and expresses the expected average error associated with future predictions. The model shows good predictive performance, i.e. below 10 % standard error of prediction for all three classes, although especially for spoiled and fresh samples with only a percentage standard error of 5.4 % and 5.8 %.

The multispectral imaging device recorded spectra in the visible and the start of the near-infrared area, and these images can be analysed in conjunction with various machine learning and vision techniques. Features were extracted to evaluate the spoilage process of the meat by predicting total viable counts as well as classifying meat pieces into one of three classes, namely fresh, semi-fresh or spoiled, with ground truth being set by a sensory panel. For the multispectral images, an overall classification performance of 76.1 % was achieved. For the microbial counts an overall classification performance of 80.0 % was achieved. Thus, considering the fact that the electromagnetic area was sampled in only 18 distinct areas, mainly in the visible region, a classification error of 76.1 % is a relatively good performance. A very good discrimination between spoiled and fresh pieces of meat was achieved, while semi-fresh meat caused some misclassification, an issue that can be limited if a significantly larger amount of samples could be introduced for analysis. In conclusion, in contrast with the retrospective and laborious microbiological analysis, the rapid non-invasive equipment that has been used, requiring no sample preparation and in which additional parameters have been included in this work such as time, temperature and atmosphere, provided a rather promising tool for assessing pork spoilage. As indicated in Fig. 6a, b and Table 4, the prediction performance on an unknown test set yielded good results, especially for fresh and spoiled samples (standard error of prediction under 6 %). The values of the bias factor were close to unity, indicating good agreement between predictions and observations. Thus, a setup as the one presented in this paper could in the future be used to satisfactorily predict microbial counts as well as sensory labels of pork meat.

The version of the videometer technology used in this work requires sampling of the product for at-line inspection; however, adaption of the instrument to on-line measurements is possible. An example which comes close to the challenges in food processing is the use of the videometer technology for automatic sorting of mink skins according to length and colour.

Acknowledgments The authors acknowledge the Symbiosis-EU (www.symbiosis-eu.net) project (no. 211638) financed by the European Commission under the 7th Framework Programme for RTD. The information in this document reflects only the authors' views, and the Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

References

- Ammor, S. A., Argyri, A., & Nychas, G.-J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, *81*, 507–514.
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., Tarantilis, P. A., Polysiou, M., & Nychas, G.-J. E. (2010). Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *145*, 146–154.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, *23*, 277–294.
- Brooks, J. C., Alvarado, M., Stephens, T. P., Kellermeier, J. D., Tittor, A. W., & Miller, M. F. (2008). Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *Journal of Food Protection*, *71*, 293–301.
- Byun, J. S., Min, J. S., Kim, I. S., Kim, J. W., Chung, M. S., & Lee, M. (2003). Comparison of indicators of microbial quality of meat during aerobic cold storage. *Journal of Food Protection*, *66*, 1733–1737.
- Carstensen, J. M., & Hansen, J. F. (2003). An apparatus and a method of recording an image of an object. Patent family EP1051660, Issued in 2003.
- Carstensen, J. M., Hansen, M. E., Lassen, N. K., & Hansen, P. W. (2006). Creating surface chemistry maps using multispectral vision technology. In B. Ersbøll, T. M. Jørgensen (Eds.), *9th medical image computing and computer assisted intervention (MICCAI)—workshop on biophotonics imaging for diagnostics and treatment, Institute of Mathematical Modelling. Technical Report-2006-17*. Kgs. Lyngby: IMM.
- Chevallier, S., Bertrand, D., Kohler, A., & Courcoux, P. (2006). Application of PLS-DA in multivariate image analysis. *Journal of Chemometrics*, *20*, 221–229.
- Clemmensen, L. H., Hansen, M. E., Ersbøll, B. K., & Frisvad, J. C. (2007). A method for comparison of growth media in objective identification of *Penicillium* based on multi-spectral imaging. *Journal of Microbiological Methods*, *69*, 249–255.
- Cohen, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, *20*, 37.
- Dainty, R. H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, *33*, 19–34.
- Daugaard, S. B., Adler-Nissen, J., & Carstensen, J. M. (2010). New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat. *Food Control*, *21*, 626–632.
- Dissing, B. S., Clemmensen, L. H., Løje, H., Ersbøll, B. K., & Adler-Nissen, J. (2009). Temporal reflectance changes in vegetables. Proceedings of Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) color and reflectance in imaging and computer vision workshop, Kyoto, Japan.
- Douleraki, A. I., Paramithiotis, S., Kagkli, D. M., & Nychas, G.-J. E. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*, *27*, 1028–1034.
- Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2001). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, *12*, 414–424.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., & Goodacre, R. (2002). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 2822–2828.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., & Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, *514*, 193–201.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. (2006). Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 4663–4671.
- Folm-Hansen, J. (1999). On chromatic and geometrical calibration. Ph.D. thesis, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby.
- Gomez, D. D., Clemmensen, L. H., Ersbøll, B. K., & Carstensen, J. M. (2007). Precise acquisition and unsupervised segmentation of multi-spectral images. *Computer Vision and Image Understanding*, *106*, 183–193.
- Gowen, A., O'Donnell, C., Cullen, P., Downey, G., & Frias, J. (2007). Hyperspectral imaging—an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends in Food Science and Technology*, *18*, 590–598.
- Green, A. A., Berman, M., Switzer, P., & Craig, M. D. (1988). A transformation for ordering multispectral data in terms of image quality with implications for noise removal. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, *26*, 65–74.
- Hansen, M. E., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., & Nielsen, A. A. (2005). Estimation of critical parameters in concrete production using multispectral vision technology. In: Lecture notes in Computer Science, LNCS3540. Kgs. Lyngby: Informatics and Mathematical Modelling, Technical University of Denmark, DTU. pp. 1228–1237.
- Hastie, T., Tibshirani, R., & Friedman, J. (2009). *Elements of statistical learning: data mining, inference and prediction* (2nd ed.). New York: Springer.
- Koutsoumanis, K., & Taoukis, P. (2006). Meat safety, refrigerated storage and transport: modelling and management. In J. Sofos (Ed.), *Improving the safety of fresh meat* (pp. 503–561). Cambridge: Woodhead.
- Koutsoumanis, K. A., Stamatiou, A. P., Skandamis, P., & Nychas, G. J. E. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 124–134.
- Koutsoumanis, K. A., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, *25*, 915–921.
- Nielsen, A. A. (1999). An extension to a filter implementation of a local quadratic surface for image noise estimation. In: 10th international conference on image analysis and processing, ICIAP'99, 119–124.
- Nychas, G. J. E., Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1998). Chemical changes in stored meat. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 288–326). London: Blackie.
- Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, *78*, 77–89.
- Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, *9*, 62–66.

- Palanichamy, A., Jayas, D., & Holley, R. (2008). Predicting survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausage using artificial neural networks. *Journal of Food Protection*, *71*, 6–12.
- Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G.-J. E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, *44*, 3264–3271.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Letters in Applied Bacteriology*, *81*, 501–508.
- Sánchez, A. J., Albarracín, W., Grau, R., Ricolfe, C., & Barat, J. M. (2008). Control of ham salting by using image segmentation. *Food Control*, *19*, 135–142.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G.-J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *79*, 35–45.
- Stien, L. H., Kiessling, A., & Manne, F. (2007). Rapid estimation of fat content in salmon fillets by colour image analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*, 73–79.
- Taghizadeh, M., Gowen, A., Ward, P., & O'Donnell, C. P. (2010). Use of hyperspectral imaging for evaluation of the shelf-life of fresh white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored in different packaging films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*, 423–431.
- Tran, T. N., Wehrens, R., & Buydens, L. M. (2005). Clustering multispectral images: a tutorial. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *77*, 3–17.
- Videometer (2009). Testimonial: Copenhagen Fur, April 19, 2007. <http://www.videometer.com/news/artikler2007/Testimonial_Kopenhagen_Fur.html> Accessed 01.09.09.



Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage

O. Papadopoulou^{a,b}, E.Z. Panagou^{a,*}, C.C. Tassou^b, G.-J.E. Nychas^a

^a Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, GR-11855 Greece

^b Institute of Technology of Agricultural Products, National Agricultural Research Foundation, Sofokli Venizelou 1, Lycovrissi, GR-141 23, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2011

Accepted 14 September 2011

Keywords:

Aerobic storage

FTIR

Meat spoilage

Minced pork meat

PLS

Predictive microbiology

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the feasibility of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to quantify biochemical changes occurring in fresh minced pork meat in the attempt to monitor spoilage. For this reason, partial least squares (PLS) models were constructed to correlate spectral data from FTIR with minced pork meat spoilage during aerobic storage of meat samples at different storage temperatures (0, 5, 10, and 15 °C). Spectral data were collected from the surface of meat samples in parallel with microbiological analysis to enumerate the population of total viable counts, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae*. Qualitative interpretation of spectral data was based on sensory evaluation, using a three point hedonic scale, discriminating meat samples in three quality classes, namely fresh, semi-fresh and spoiled. The purpose of the developed models was to classify minced pork samples in the respective quality class, and also to correlate the population dynamics of the microbial association with FTIR spectra. The obtained results demonstrated good performance in classifying meat samples in one of the three pre-defined sensory classes. The overall correct classification rate for the three sensory classes was 94.0% and 88.1% during model calibration and validation, respectively. Furthermore, PLS regression models were also employed to provide quantitative estimations of microbial counts during meat storage. The performance was based on graphical plots and statistical indices (bias factor, accuracy factor, standard error of calibration, standard error of prediction, and correlation coefficient). The values of the bias factor were close to unity for all microbial groups indicating no systematic bias of the models. Moreover, the calculated values of the accuracy factor showed that the average deviation between predictions and observations was 7.5% and 7.9% for total viable counts and *Pseudomonas* spp. and 10.7% and 11.3% for lactic acid bacteria and *B. thermosphacta*. Finally, correlations above 0.80 between observed and estimated counts were observed for both training and test data sets.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pork meat production amounts to almost 50% of total meat production in Europe and according to a recent survey (FAO, 2007) 75% of consumers choose pork once a week in their diet. In general, minced meat is appreciated by consumers for its convenience, although its shelf-life is limited because of the large exposed surface area that favours spoilage (Limbo, Torri, Sinelli, Franzetti, & Casiraghi, 2010). Currently, more than 50 methods have been employed for the characterization of microbiologically spoiled or contaminated meat (Byun et al., 2003; Ellis & Goodacre, 2001; Nychas, Skandamis, Tassou, & Koutsoumanis, 2008). However, these methods have certain disadvantages as they are time-consuming, destructive, require highly trained personnel, provide retrospective information, and hence are unsuitable for on-line monitoring

(Dainty, 1996; Ellis, Broadhurst, & Goodacre, 2004; Ellis, Broadhurst, Kell, Rowland, & Goodacre, 2002; Liu, Lyon, Windham, Lyon, & Savage, 2004; Nychas, Drosinos, & Board, 1998; Nychas et al., 2008). Consequently, there is a need to develop fast and reliable systems to determine safety and quality of meat products for the benefit of the public and also minimise unnecessary economic losses, as one fourth of global food supply is lost through microbial activity alone (Huis in't Veld, 1996).

In the last decades, lifestyle regarding meat consumption patterns has changed and consumers have become more demanding especially in terms of higher (intrinsic) quality, increased functional and nutritional properties, increased awareness between food and health, better animal welfare and care for the environment (Nychas et al., 2008; Verbeke, Perez-Cueto, de Barcellos, Krystallis, & Grunert, 2009). As a result, meat production systems have changed and the industry faced the need to adopt novel technologies for meat production, packaging, and distribution. To this end, several non-invasive methods based on mechanical, optical, dielectrics, X-rays, spectroscopy, and nuclear magnetic resonance have been researched as potential meat safety/quality sensors depending

* Corresponding author at: Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Iera Odos 75, Athens, GR-11855 Greece. Tel./fax: +30 210 5294693.

E-mail address: stathspanagou@aua.gr (E.Z. Panagou).

on the various meat textural and structural attributes (Ammor, Argyri, & Nychas, 2009; Argyri, Panagou, Tarantilis, Polysiou, & Nychas, 2010; Balasubramanian, Panigrahi, Logue, Gu, & Marchello, 2009; Damez & Clerjon, 2008; Ellis, Broadhurst, Clarke, & Goodacre, 2005; Prieto, Roehe, Lavín, Batten, & Andrés, 2009; Rajamäki et al., 2006). The principle underlying this approach is based on the assumption that the metabolic activity of microorganisms on meat results in biochemical changes with the concurrent development of metabolic by-products which may be indicative of spoilage. The quantification of these metabolites constitutes a characteristic fingerprint of any biochemical substance, thus providing information on the type and rate of spoilage (Ellis & Goodacre, 2001; Nychas et al., 2008).

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy has substantial potential as a quantitative control method in the food industry (Van de Voort, 1992) and it has been successfully employed so far to tackle authentication and adulteration problems in various foods (Edelman, Diewok, Schuster, & Lendl, 2001; He, Rodriguez-Saona, & Giusti, 2007; Kelly, Petisco, & Downey, 2006; Rohman & Che Man, 2010; Vlachos et al., 2006). FTIR analysis is rapid, non-invasive, requires minimum sample pre-treatment, no specific consumables or reagents, and in conjunction with attenuated total reflectance (ATR) technology permits users to collect full spectra in a few seconds, allowing simultaneous assessment of numerous meat properties (Ammor et al., 2009; Ellis et al., 2004, 2002). The integration of FTIR-ATR spectroscopy with an appropriate information platform could result in the development of an expert system that would be able to qualitatively and/or quantitatively discriminate between meat samples based on extracted pre-processing features (Berrueta, Alonso-Salces, & Héberger, 2007). Chemometric methods (e.g. principal components analysis, hierarchical cluster analysis, discriminant function analysis, partial least squares regression) in parallel with computational biology approaches based on soft computing (e.g. artificial neural networks, genetic algorithms, support vector machines) have been applied as data mining techniques in bioprocess data (Cevallos-Cevallos, Reyes-De-Corcuera, Etxeberria, Danyluk, & Rodrick, 2009; Charaniya, Hu, & Karypis, 2008; Goodacre, 2000). These approaches could provide rapid information related to the contribution of the ephemeral spoilage organisms (ESO) in meat or discriminate meat with regard to (i) type of muscle and (ii) spoilage (Balasubramanian et al., 2009; Dainty, 1996; Ellis et al., 2005; Mataragas, Skandamis, Nychas, & Drosinos, 2007; Verouden, Westerhuis, Werf, & Smilde, 2009).

As meat freshness is important to consumers, the meat industry and retailers, the purpose of the present study was to investigate the feasibility of FTIR spectroscopy in conjunction with chemometric analysis to evaluate the quality of minced pork meat stored aerobically at different isothermal conditions (0, 5, 10, and 15 °C). Another aim was to examine possible correlation between FTIR spectral data and population dynamics of different bacterial groups on the surface of meat samples during storage.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation and experimental design

Fresh minced pork (pH 5.6–5.8) obtained from different carcasses was purchased immediately after grinding from the central meat market in Athens and transported under refrigeration to the laboratory within 30 min. The meat was divided in portions of 50 g and packed aerobically in Styrofoam trays which were subsequently wrapped manually with air-permeable polyethylene plastic film. The underlying objective of the treatment was to simulate the pre-packaged meat available in retail outlets. Samples were randomly divided into groups and stored under controlled isothermal conditions at 0, 5, 10, and 15 °C in high precision (± 0.5 °C) incubators (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) for up to 340 h, depending on storage temperature, until spoilage was pronounced (intense discoloration and presence of off-odours). For the analysis, each sample was divided into two portions

(25 g), one portion was used for microbiological analysis and the other for FTIR analysis. It was assumed that the microbial population in the first portion of the meat would be representative of the microbial population in the other portion of the meat subjected to FTIR analysis. Samples stored at 0 and 5 °C were analyzed approximately every 24 and 12 h, respectively, whereas samples stored at 10 and 15 °C were analyzed every 6–7 h. From each sampling occasion, two replicate samples were withdrawn to undergo microbiological and FTIR analysis and two additional samples were employed in sensory evaluation.

2.2. Microbiological analyses

To estimate the number of viable cells, minced meat samples (25 g) were weighed aseptically, added to sterile quarter strength Ringer's solution and homogenized in a stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) for 60 s at room temperature. Serial dilutions were prepared with the Ringer solution and duplicate 0.1 or 1 ml samples of the appropriate dilutions were spread or mixed on the following media: Plate Count Agar (PCA, Biolife 4021452, Milano, Italy) for total viable counts, incubated at 30 °C for 48–72 h; Pseudomonas Agar Base selective supplement (PAB, Biolife 401961, Milano, Italy) for *Pseudomonas* spp., incubated at 25 °C for 48–72 h; Streptomycin Thallous Acetate–Actidione Agar (STAA, Biolife 402079, Milano, Italy) for *Brochothrix thermosphacta*, incubated at 25 °C for 72 h; Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Biolife, 402185, Milano Italy) for *Enterobacteriaceae* counts, overlaid with the same medium and incubated at 37 °C for 18–24 h; de Man–Rogosa–Sharp medium with pH adjusted at 5.7 (MRS, Biolife, 4017282, Milano, Italy) for lactic acid bacteria, overlaid with the same medium and incubated at 30 °C for 48–72 h. Growth data from plate counts were log transformed and fitted to the primary model of Baranyi and Roberts (1994) using the program DMFit (available at www.combase.cc) to determine the kinetic parameters of microbial growth (maximum specific growth rate and lag phase duration). In parallel with microbiological analyses, the pH value of minced pork meat was recorded with a digital pH meter (Metrohm pH Lab, Switzerland), the glass electrode of which was immersed in the homogenised meat sample after the end of microbiological analysis.

2.3. Sensory analysis

Sensory evaluation of pork samples was performed during storage as previously reported (Argyri et al., 2010) by a sensory panel of five members (staff from the laboratory) at the same time intervals as for microbiological analyses. The same trained persons were used in each evaluation and all were blinded to the meat sample tested. Sensory evaluation was carried out under controlled conditions of light, temperature and humidity. Meat samples were left to reach ambient temperature prior to analysis. The descriptors selected were based on the perception of colour, smell, and taste. The first two descriptors were assessed before and after cooking for 20 min at 180 °C in a preheated oven, while the last descriptor was evaluated only after cooking. A freshly thawed and cooked meat sample, stored at –20 °C, was also presented to the panelists as a control sample. A three class evaluation scheme was employed in this experiment. The first class (Fresh) corresponded to the absence of off-flavours, equal to the reference sample; the second class (Semi-fresh) corresponded to the presence of slight off-flavours but not spoiled (still acceptable quality); and the third class (Spoiled) corresponded to clearly off-flavours development (unacceptable quality). Semi-fresh was the first indication of meat spoilage (incipient spoilage) in which the sample was marginally accepted. Putrid, sweet, sour, or cheesy odours were regarded as indicative of microbial spoilage and classified the samples as spoiled. Bright colours typical of fresh oxygenated meat were considered fresh, whereas a persistent dull or unusual colour rendered the sample spoiled (Ammor et al., 2009; Argyri et al., 2010; Skandamis & Nychas, 2002). Overall, 134 minced pork meat samples

were scored by the taste panel and discriminated into the defined groups as fresh (30), semi-fresh (32), and spoiled (72).

2.4. FTIR-ATR spectroscopy

Meat samples (8 cm × 1 cm × 0.5 cm) were analyzed in parallel to the microbiological and sensory analysis. FTIR spectra were collected using a ZnSe 45° ATR (Attenuated Total Reflectance) crystal on a Nicolet 6700 FTIR Spectrometer equipped with a DLaTGS (deuterated L-alanine doped triglycene sulphate) Detector with KBr beamsplitter. The samples were placed on the ZnSe ATR crystal so that the meat sample was in intimate contact with the crystal, and then pressed with the machine's gripper in order to obtain the best possible contact with the crystal. The ZnSe ATR crystal was capable of 12 external reflections, with the evanescent field effecting a depth of 1.01 μm. The spectrometer was controlled by Omnic Software-version 7.3 to collect spectra over the wavenumber range of 4000 to 650 cm⁻¹, by accumulating 100 scans with a resolution of 4 cm⁻¹. The collection time for each sample spectrum was 2 min. Each sample was analyzed in duplicate and results are displayed as mean value of both measurements. Reference spectra were acquired by collecting a spectrum from the cleaned blank crystal prior to the presentation of each sample replicate. At the end of each sampling, the crystal surface was cleaned with detergent, washed with distilled water, dried with lint-free tissue, cleaned with ethanol, and finally dried with lint-free tissue at the end of each sampling interval.

2.5. Data analysis

Data analysis was performed using multivariate methods included in the Unscrambler software (version 9.7, CAMO, Norway). Specifically, FTIR spectral data collected between 1800 and 900 cm⁻¹ were initially standardized using standard normal variate (SNV) transformation. SNV was applied to minimize the effect of baseline shift and other interferences that may impair multivariate calibrations (Sinelli, Barzaghi, Giardina, & Cattaneo, 2005). Subsequently, mean centred and standardized data were subjected to partial least squares (PLS) analysis to investigate the relationships between FTIR spectral data and quality class as well as microbiological data. PLS is a supervised multivariate calibration technique that aims to define the relationship between a set of predictor data **X** (independent variables, FTIR data in this case) and a set of responses **Y** (dependent variables, sensory class or microbial counts). The PLS method projects the initial input–output data down into a latent space, extracting a number of principal components, also known as latent variables (LV) with an orthogonal structure, while capturing most of the variance in the original data. The first LV conveys the largest amount of information, followed by the second LV and so forth. The optimal number of LVs is determined with the help of the residual variances to model useful information and avoid over-fitting of the data (Nielsen, Esaiassen, Heia, & Sigernes, 2002).

For qualitative analysis, PLS-discriminant analysis (PLS-DA) was used to develop models allowing the discrimination of meat samples in the selected sensory classes. For class discrimination, the so-called one-of-many encoding was employed (Berrueta et al., 2007). Specifically, a 'dummy' **Y** matrix was constructed with zeros and ones, containing as many columns as there are classes. A meat sample was assigned the value of 1 for the class it belongs and 0 for the rest. In this way, three PLS-DA models were developed, one for each class. The closer the element of a certain column is to 1 and the elements of the other columns to 0, the more likely a sample is a member of this particular class. Model performance was established by cross-validation using the leave-one-out procedure for the prediction of sensory class of minced meat samples. The classification accuracy was determined by the number of correctly classified samples in each sensory class divided by the total number of samples in the class.

In addition, PLS regression (PLS-R) models were built for the quantitative analysis of the population of total viable counts, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, and lactic acid bacteria, using the FTIR responses of the samples as input variables and the counts of each individual microbial group as output variables. The performance of the PLS-R models were quantified by the calculation of the bias (B_f) and accuracy (A_f) factors (Ross, 1996), the standard error of calibration (SEC), standard error of prediction (SEP), and correlation coefficient (r) between the observed and predicted counts. SEC and SEP were defined as follows (Hernández Gómez, Wang, Hu, & García Pereira, 2007):

$$SEC = \sqrt{\frac{1}{I_c - 1} \sum_{i=1}^{I_c} (\hat{y}_i - y_i)^2} \quad (1)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{I_p - 1} \sum_{i=1}^{I_p} (\hat{y}_i - y_i - bias)^2} \quad (2)$$

where, \hat{y}_i is the predicted value of the i th observation, y_i is the measured value of the i th observation, I_c is the number of observations in the calibration set, and I_p is the number of observations in the validation set. Bias systematic difference between predicted and observed counts is given by (Hernández Gómez et al., 2007):

$$Bias = \frac{1}{I_p} \sum_{i=1}^{I_p} (\hat{y}_i - y_i) \quad (3)$$

In addition, the bias (B_f) and accuracy (A_f) factors were expressed as follows:

$$B_f = 10^{(\sum \log(\hat{y}_i/y_i)/n)} \quad (4)$$

$$A_f = 10^{(\sum |\log(\hat{y}_i/y_i)|/n)} \quad (5)$$

where n is the number of observations.

The database ($n = 134$ spectra) was partitioned into a training and test dataset. The measurements of the first replication of the experiment for each sampling day and storage temperature were gathered in the training dataset ($n = 67$) and the remaining measurements of the second replication were gathered in the test dataset ($n = 67$). Test data were not employed in any step of model development but they were used exclusively to determine its performance. Before the calibration, pre-processed spectral data were subjected to PCA analysis for dimensionality reduction, and the number of PCs (also known as latent variables in PLS analysis) explaining most of the variability in the data set were subsequently used as independent variables (**X**) in model development. This is a standard procedure in PLS analysis. The dependent variable (**Y**) was either the sensory classes for PLS-DA analysis or the counts of the different microbial groups for PLS-R analysis.

3. Results and discussion

3.1. Development of microbial association

The microbiological analysis showed that the initial microbiota of minced pork consisted of *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae*. The population dynamics of these groups and their contribution to the final microbiota were greatly affected by storage temperature, as exemplified by the evolution of total viable counts (Fig. 1). Pronounced lag phase was evident in all microbial groups at 0 °C, the duration of which was greatly reduced or not observed at all at higher temperatures. A progressive increase of maximum specific growth rate (μ_{max}) was observed for all members of the microbial association with increasing storage temperature (Table 1).

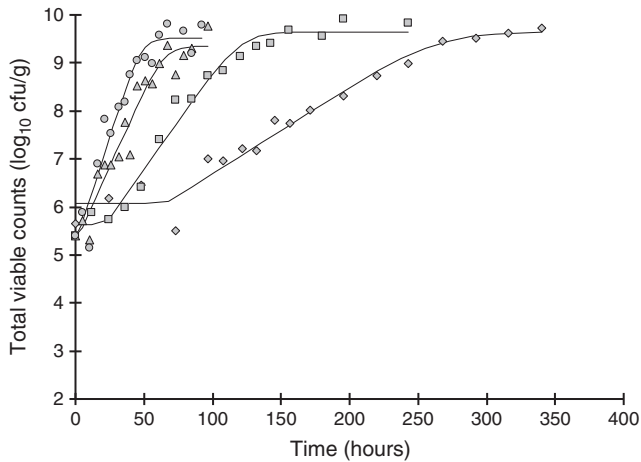


Fig. 1. Changes of total viable counts (tvc) obtained from minced pork stored aerobically at 0 °C (◆), 5 °C (■), 10 °C (▲), and 15 °C (●). Lines represent growth curves fitted with the Baranyi and Roberts primary model.

In general, aerobic storage of minced pork allowed high final population levels regardless of storage temperature, with *Pseudomonas* spp. being the dominant microorganism followed by *B. thermosphacta*, whereas lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae* remained at lower levels. A major effect of storage temperature was observed on the level of *Enterobacteriaceae*, whose growth was greatly retarded at 0, 5, and 10 °C but not at 15 °C (Table 1). Aerobic storage accelerated spoilage due to the fast growth of *Pseudomonas* spp. that became the dominant microorganism at all temperatures. Similar results have been reported previously for beef and pork meat (Ercolini, Russo, Nasi, Ferranti, & Villani, 2009;

Ercolini, Russo, Torrieri, Masi, & Villani, 2006; Sakala et al., 2002; Skandamis & Nychas, 2001, 2002; Tsigarida, Skandamis, & Nychas, 2000).

The time required by the sensory panel to consider a meat sample as semi-fresh or spoiled differed for each temperature. Specifically, the sensory panel judged a sample as semi-fresh after 108, 48, 21.5 and 16 h at 0, 5, 10 and 15 °C respectively. In addition, at the time of sensory rejection (meat characterized as spoiled) the mean value of total viable counts was ca.8 log₁₀cfu/g at all storage temperatures. This observation is in agreement with previous researchers who concluded that bacterial counts of 7–8 log₁₀cfu/g can cause noticeable off-odours and slime (Koutsoumanis, Stamatiou, Drosinos, & Nychas, 2008; Koutsoumanis, Stamatiou, Skandamis, & Nychas, 2006), whereas others have reported that proteolytic changes do not occur until bacterial counts reach approximately 9 log₁₀cfu/cm² (Brooks et al., 2008). No correlation could be established between the pH values and the spoilage detection time and as indicated by previous researchers the use of pH as an indicator of spoilage or remaining shelf-life in meats would be inadequate (Ellis et al., 2004, 2002). In general, pH started to increase only when bacterial counts reached ca.8 log₁₀cfu/g, which is comparable with Ellis et al. (2004). This group reported that in the case of poultry meat pH values fluctuated prior to spoilage and started to increase only when bacterial counts reached 8 log₁₀cfu/g.

3.2. Spoilage monitoring using FTIR spectral data

Typical FTIR spectral data in the range of 1800–900 cm⁻¹ collected from fresh and spoiled meat samples stored at 0 °C are shown in Fig. 2. Spectral data could serve as metabolic snapshots (fingerprints) of minced pork providing information on biochemical changes occurring during meat storage in an attempt to monitor spoilage. Thus a major peak appeared at 1640 cm⁻¹ due to moisture (O–H) and contribution of amide I bands of the proteins. A second peak was observed at 1550 cm⁻¹ due to the absorption of amide II (C–N stretch), followed by a third peak at 1745 cm⁻¹ corresponding to fat (C=O ester carbonyl stretching vibration of triglycerides). Other minor intensity peaks were observed at 1458 cm⁻¹ (fat, CH₂ scissoring), 1398 cm⁻¹ (amides, C–N stretch), 1311 cm⁻¹ and 1246 cm⁻¹ (amines, C–N stretch), 1166 cm⁻¹ and 1090 cm⁻¹ (amines, free amino acids, C–N stretch) (Ammor et al., 2009; Ellis et al., 2002; Osorio et al., 2009). It needs to be noted however, that in Fig. 2 there were no obvious feature peaks to reflect the difference in quality between fresh and spoiled meat samples during storage at 0 °C. Therefore, chemometrics were introduced to analyze the spectra and establish the qualitative and quantitative relationship between FTIR data and meat spoilage.

PLS-discriminant analysis (PLS-DA) was used to set up a calibration model for sensory quality prediction of minced meat samples. The method of full cross-validation, following the leave-one-out procedure, was used to determine the maximum number of latent variables (LVs) to ensure the predictive ability and avoid over-fitting of the data. From a preliminary plotting of the data one sample in the training dataset was characterized as outlier and removed from further analysis (data not shown) resulting in 66 samples of minced pork meat. It is often appropriate in spectroscopy applications to refine the PLS model by selecting wavenumbers and for this reason the b-coefficients (regression coefficients) provide the accumulated picture of the most important wavenumbers contributing to spoilage. Fig. 3 presents the b-coefficients over the entire spectral range 1800–900 cm⁻¹ with open symbols indicating the selected intervals considered in calculations. Therefore, data evaluation focused on the following selected regions in the spectrum: 971–973 (corresponding to P–O bond), 985–997 (corresponding to proteins), 1016–1041 (corresponding to C–O–C, glycosidic linkage), 1292–1371 (corresponding to amines and Amide III group), 1388–1486 (corresponding to C–H bending, fat), 1529–1540 (corresponding to Amide II, protein), and 1697–1726 cm⁻¹, (corresponding to fat, Amide I and H–O–H bending from water) (Ellis et al., 2004; Pedersen, Morel, Andersen, & Engelsen, 2003).

Table 1

Estimated kinetic parameters of different microbial groups in pork minced meat stored aerobically at various temperatures.

Microorganism	T (°C)	Lag phase (h)	y ₀ ^a (log ₁₀ cfu/g)	y _{end} ^b (log ₁₀ cfu/g)	μ _{max} ^c (h ⁻¹)	R ²
Total viable counts	0	46.1	5.81	9.68	0.039	0.953
<i>Pseudomonas</i> spp.		17.3	5.52	9.88	0.036	0.964
<i>B. thermosphacta</i>		48.6	4.20	8.16	0.043	0.945
Lactic acid bacteria		192.4	4.53	6.33	0.071	0.765
<i>Enterobacteriaceae</i>		268.9	3.43	– ^d	0.074	0.825
Total viable counts	5	13.7	5.37	9.66	0.090	0.973
<i>Pseudomonas</i> spp.		2.8	5.17	9.63	0.089	0.971
<i>B. thermosphacta</i>		14.1	3.58	7.90	0.136	0.986
Lactic acid bacteria		–	3.56	7.39	0.061	0.980
<i>Enterobacteriaceae</i>		34.4	3.05	7.55	0.063	0.967
Total viable counts	10	–	5.29	9.36	0.143	0.933
<i>Pseudomonas</i> spp.		–	5.30	9.59	0.132	0.969
<i>B. thermosphacta</i>		–	3.70	7.77	0.163	0.968
Lactic acid bacteria		–	3.69	7.20	0.145	0.875
<i>Enterobacteriaceae</i>		19.8	3.02	7.75	0.156	0.955
Total viable counts	15	–	5.27	9.52	0.200	0.929
<i>Pseudomonas</i> spp.		0.88	5.12	9.52	0.211	0.947
<i>B. thermosphacta</i>		–	3.63	7.75	0.252	0.952
Lactic acid bacteria		–	3.56	7.54	0.229	0.939
<i>Enterobacteriaceae</i>		–	3.30	8.21	0.249	0.977

^{a,b}Initial and final population estimated by the Baranyi model.

^cMaximum specific growth rate.

^dNot observed.

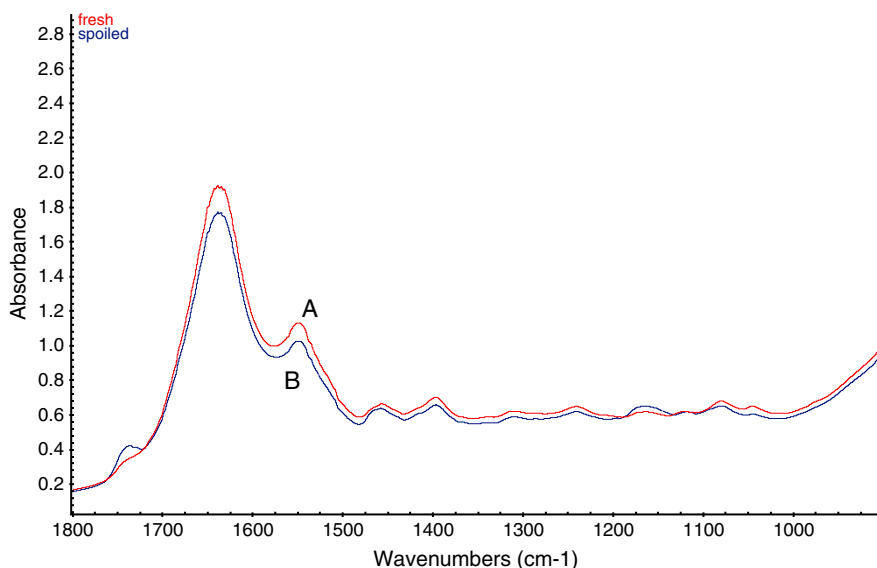


Fig. 2. Typical FTIR-ATR spectra of meat in the range of 1800–900 cm^{-1} stored at 0 °C at the beginning of storage (A: fresh, 24 h) and after 292 h (B: spoiled).

3.3. Sensory class evaluation

Good classification was obtained in all sensory classes demonstrating the effectiveness of the method as a rapid screening technique to monitor minced pork spoilage (Table 2). Specifically, a number of 6 LVs was finally selected as input variables in PLS-DA model development, presenting the highest correct classification (%) in the training (94.0%) and test (88.1%) datasets. For the training dataset, the PLS-DA approach provided 100% correct classification for spoiled samples, whereas for fresh and semi-fresh the respective number was 93.3% and 86.7%, respectively, representing 1 misclassification out of 15 fresh samples and 2 misclassifications out of 15 semi-fresh samples. However, for the test dataset the calculated percentages were lower, which is not unusual as these data were not provided at all in the model during training, but used as unknown cases for prediction. Specifically, classification rate for fresh, semi-fresh and spoiled samples

was 86.7, 87.5, and 88.9%, respectively (Table 2). The percentage of erroneous predictions in the safe side (i.e., fresh meat characterized as semi-fresh or spoiled and semi-fresh meat characterized as spoiled) was 2.98% corresponding to 2 cases out of 67 meat samples. In addition, the misclassified cases in the dangerous side (i.e., semi-fresh or spoiled meat characterized as fresh, and spoiled meat characterized as semi-fresh) was 8.95% corresponding to 6 cases out of 67 meat samples. It needs to be noted however, that no fresh minced meat sample was characterized as spoiled and vice versa, indicating that the biochemical fingerprints provided by FTIR spectral data could discriminate these two classes quite accurately. The lack of complete clustering among the different sensory groups could be due to the uncertainty of sensory evaluation and the variability of the samples. Sensory science employs human senses as instruments of measures, consequently like any other instrument the performance of each panelist could be affected by systematic or random errors (i.e., uncertainty)

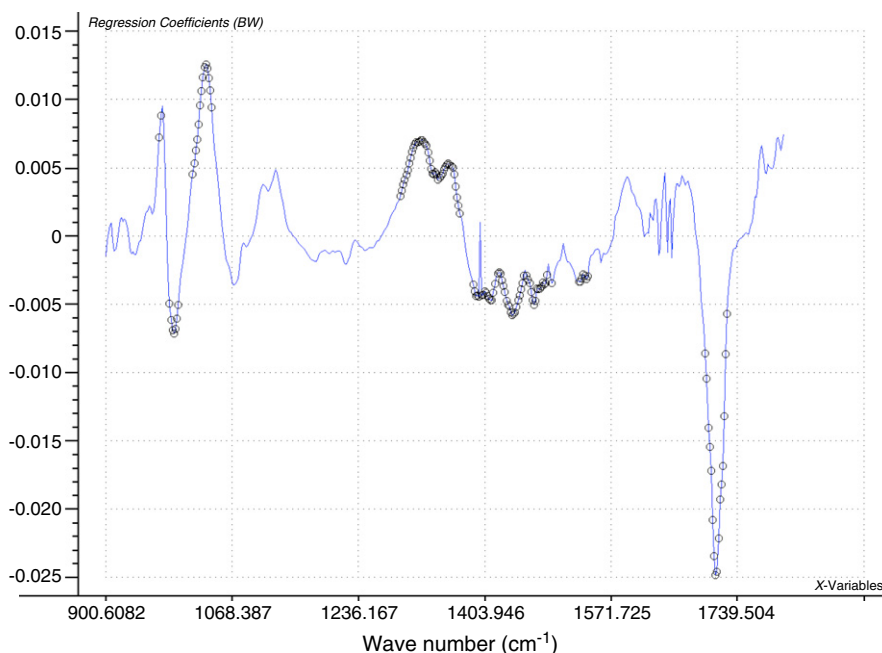


Fig. 3. Plot of b-coefficients (regression coefficients) over the entire spectral range 1800–900 cm^{-1} . The selected intervals of wavenumbers considered in calculations are marked with open circle symbols.

Table 2

Confusion matrix of the PLS-DA model regarding sensory quality discrimination of minced pork meat samples based on FTIR spectral data.

From/to	Fresh	Semi-fresh	Spoiled	Total	Correct (%)
<i>Training (n = 66)</i>					
Fresh	14	1	0	15	93.3
Semi-fresh	2	13	0	15	86.7
Spoiled	0	0	36	36	100.0
<i>Testing (n = 67)</i>					
Fresh	13	2	0	15	86.7
Semi-fresh	2	14	0	16	87.5
Spoiled	0	4	32	36	88.9

Overall correct classification (accuracy) for train and test data sets: 94.0% and 88.1%, respectively. Training of the PLS-DA model was carried out with 66 samples, as one 'semi-fresh' sample was removed from the database as outlier.

that influence the panel agreement (Versari, Parpinello, Chinnici, & Meglioli, 2011). So further improvement on prediction could be based on better training of the taste panel in combination with the development of an improved/standardized protocol for meat assessment. It must also be emphasized that the number of examined samples within each class was not equal due to the different spoilage rate of minced pork at different storage temperatures resulting in a variable number of samples in each class. Thus the number of spoiled samples was greater than twice the number of fresh or semi-fresh samples. This may have affected the training process which is basically a data driven approach, and could thus account for the lower classification accuracies observed in certain classes.

The application of FTIR analysis to monitor meat spoilage is not new and it has been reported by previous researchers (Ellis & Goodacre,

2001; Ellis et al., 2004, 2002). It needs to be noted that in those studies the focus was given on (i) beef and poultry meat, whereas pork has not received so far the same level of attention, and (ii) emphasis was given on spoilage in terms of microbiological analyses based mainly on total viable counts. In the aforementioned cases, meat sample was characterized as spoiled when the counts exceeded a certain threshold, normally 7–8 log₁₀ cfu/g, but no attempt was made to correlate spectral data with quality classes defined by a sensory taste panel. In addition spoilage was monitored in one storage temperature (room temperature), whereas in this work four different storage temperatures (0, 5, 10, and 15 °C) have been assayed including both abuse and chill temperatures. Moreover, the characterization of minced meat samples by the taste panel in three distinct sensory classes is a more realistic approach following consumer perception about meat spoilage. Thus, apart from the well-defined "fresh" and "spoiled" classes, an intermediate class of "semi-fresh" has been determined indicating the early stage of spoilage where the meat has developed slight off-odours but it is still acceptable for consumption.

3.4. Correlation of microbiological data with FTIR spectra

PLS regression (PLS-R) models were built for the counts of tvc, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* and lactic acid bacteria using FTIR responses as input variables and the microbial counts as output variables. It needs to be noted that no regression model was attempted for *Enterobacteriaceae* because this microbial group presented a long lag phase duration (Table 1) at all temperatures and growth was initiated after the samples had been characterized as spoiled by the sensory panel. The models were developed so that the first replication of the experiment was used in the training process and the second replication in

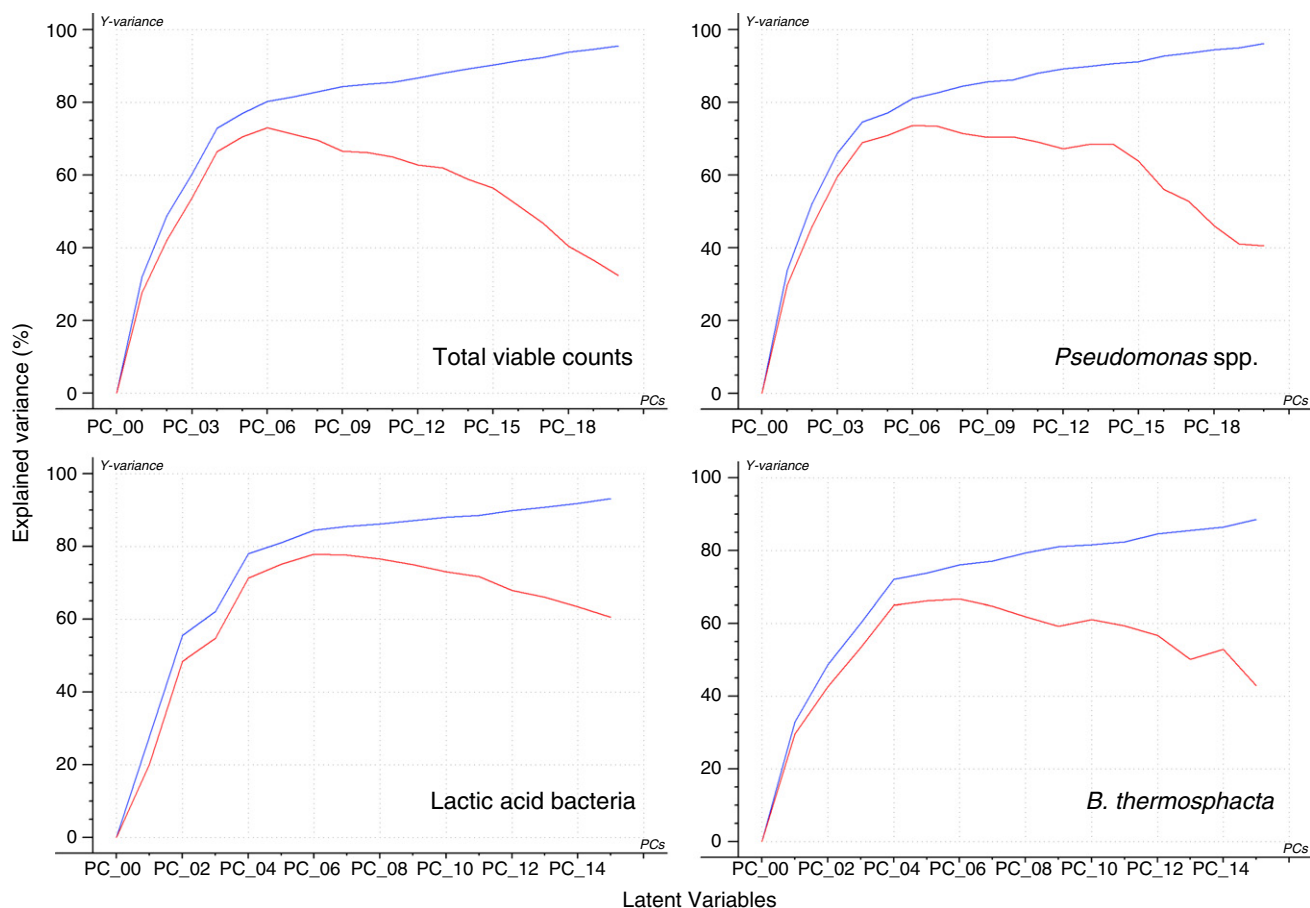


Fig. 4. Optimization of the PLS regression (PLS-R) models using latent variables (LVs) ranging from 1 to 20 for the training (blue line) and test (red line) datasets after leave-one-out cross-validation. For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.

testing. A critical aspect in PLS model development is the determination of the optimum number of LVs. Thus, using too few variables results in insufficient model, but using too many variables unnecessary overfitting occurs (Lin et al., 2004). Fig. 4 illustrates that the explained variance of the test dataset increases sharply within the first six LVs and then starts to decrease progressively. So, a number of 6 LVs was finally selected presenting the highest percentage of explained variance during model development for each individual microbial group. Good relationships were found between the results of FTIR and the microbiological analysis. The performance indices of the PLS-R models for model building and testing are presented in Table 3. The bias factors of the different microbial groups were close to unity indicating no structural deviation of the models, i.e., systematic over or under-prediction of the microbial counts. Moreover, based on the values of the accuracy factor, the average deviation between predictions and observations was 7.5% and 7.9% for total viable counts and *Pseudomonas* spp. and 10.7% and 11.3% for lactic acid bacteria and *B. thermosphacta*. Correlations above 0.80 were also found in the PLS-R models for both training and test data sets. The best correlations between predicted and observed counts for individual microbial groups were found for lactic acid bacteria and *Pseudomonas* spp. These observations were also graphically verified by the comparison of the observed vs. predicted counts plots (Fig. 5). FTIR has been successfully employed in the past to correlate spectral data to microbiological counts (Ellis et al., 2004, 2002) but the efforts have been focused on the prediction of total viable counts, which are not always representative of the microbial dynamics during meat spoilage, whereas no attempt has been undertaken to correlate other microbial groups. In a recent work (Rajamäki et al., 2006), the applicability of

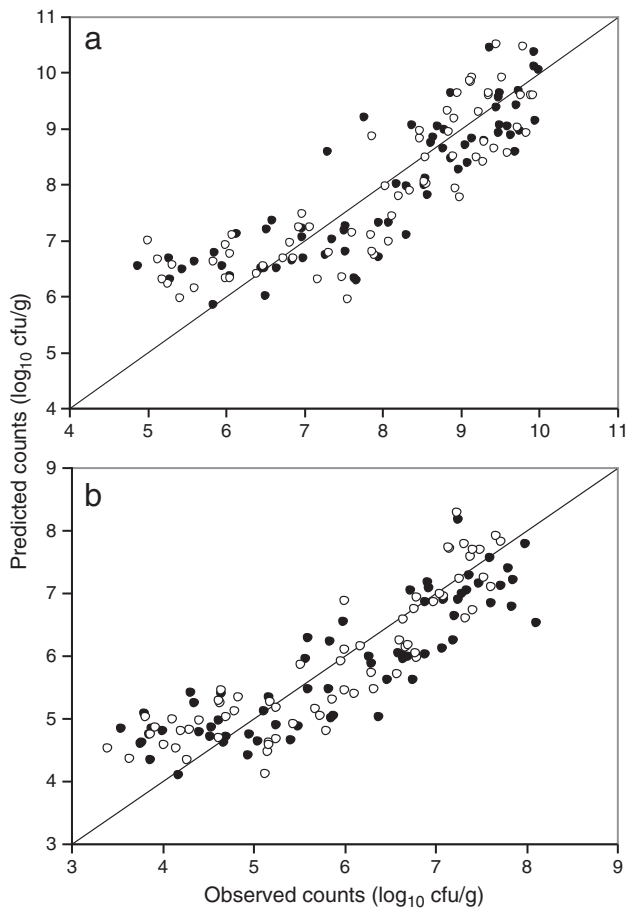


Fig. 5. Comparison between observed and predicted counts of *Pseudomonas* spp. (a) and lactic acid bacteria (b) by the PLS regression model based on FTIR spectral data (open symbols: training data; solid symbols: test data).

Table 3

Performance indices of the PLS regression (PLS-R) model correlating the microbial counts in minced pork meat samples on the basis of FTIR spectral data.

Microorganism	B_f	A_f	SEC	SEP	r_{train}	r_{test}
Total viable counts	0.984	1.075	0.781	0.674	0.895	0.880
<i>Pseudomonas</i> spp.	0.998	1.079	0.764	0.714	0.854	0.865
<i>B. thermosphacta</i>	1.018	1.113	0.834	0.804	0.808	0.826
Lactic acid bacteria	0.990	1.107	0.594	0.670	0.878	0.870

B_f : bias factor; A_f : accuracy factor; SEC: standard error of calibration; SEP: standard error of prediction; r : correlation coefficient.

an electronic nose was investigated to develop PLS models to predict the counts of lactic acid bacteria, aerobic mesophilic bacteria, anaerobic and facultative anaerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* during modified atmosphere packaged poultry meat. The authors reported correlations above 0.70 between observed and predicted counts concluding that an electronic nose analysis could offer a powerful and rapid tool for the quality evaluation of meat products and the microbiological counts of different microbial groups could be predicted on the basis of the electronic nose responses.

4. Conclusion

The results obtained in this study demonstrated that FTIR spectral data could become an interesting tool to monitor minced pork spoilage through the measurement of biochemical changes occurring in meat substrate. The collected spectra could be considered as biochemical fingerprints containing valuable information for the discrimination of meat samples in quality classes corresponding to different spoilage levels, and could also be used to correlate the population of the different microbial groups directly from the sample surface. However, it must be stressed that the developed PLS models can only be as good as the experimental data provided, and errors for example in the sensory or microbiological analysis could result in a poorly functioning model. For this reason, further research is required for the method to be eligible and able to be updated with the novel packaging and preservation techniques that are raising and sequentially change the time course and character of spoilage.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Symbiosis-EU (www.symbiosis-eu.net) project (no.211638) financed by the European Commission under the 7th Framework Programme for RTD. The information in this document reflects only the authors' views and the Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.foodres.2011.09.012](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.012).

References

- Ammor, S. A., Argyri, A., & Nychas, G. J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81, 507–514.
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., Tarantilis, P. A., Polysiou, M., & Nychas, G. J. E. (2010). Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145, 146–154.
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S., Logue, C., Gu, H., & Marchello, M. (2009). Neural networks-integrated metal oxide-based artificial olfactory system for meat spoilage identification. *Journal of Food Engineering*, 91, 91–98.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.

- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196–214.
- Brooks, J. C., Alvarado, M., Stephens, T. P., Kellermeier, J. D., Tittor, A. W., & Miller, M. F. (2008). Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *Journal of Food Protection*, 71, 293–301.
- Byun, J. S., Min, J. S., Kim, I. S., Kim, J. W., Chung, M. S., & Lee, M. (2003). Comparison of indicators of microbial quality of meat during aerobic cold storage. *Journal of Food Protection*, 66, 1733–1737.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 557–566.
- Charaniya, S., Hu, W. S., & Karypis, G. (2008). Mining bioprocess data: Opportunities and challenges. *Trends in Biotechnology*, 26, 690–699.
- Dainty, R. H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 19–34.
- Damez, J. L., & Clerjon, S. (2008). Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science*, 80, 132–149.
- Edelman, A., Diewok, J., Schuster, K. C., & Lendl, B. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1139–1145.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Clarke, S. J., & Goodacre, R. (2005). Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *Analyst*, 130, 1648–1654.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., & Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, 514, 193–201.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., & Goodacre, R. (2002). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2822–2828.
- Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2001). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: Current status and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 414–424.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., & Villani, F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *in vitro* and in beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1990–2001.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. (2006). Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4663–4671.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2007). Consumption of 10 major animal foods. Assessed at: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/fao-statistical-yearbook-2007-2008/d-consumption/en/>
- Goodacre, R. (2000). Applications of artificial neural networks to the analysis of multivariate data. In H. M. Cartwright (Ed.), *Intelligent data analysis in science: a handbook* (pp. 123–152). Oxford: Oxford University Press.
- He, J., Rodriguez-Saona, I. E., & Giusti, M. M. (2007). Mid-infrared spectroscopy for juice authentication—Rapid differentiation of commercial juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4443–4452.
- Hernández Gómez, A., Wang, J., Hu, G., & García Pereira, A. (2007). Discrimination of storage shelf-life for mandarin by electronic nose technique. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 40, 681–689.
- Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 1–18.
- Kelly, J. D., Petisco, C., & Downey, G. (2006). Application of Fourier transform mid-infrared spectroscopy to the discrimination between Irish artisanal honey and such honey adulterated with various sugar syrups. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 6166–6171.
- Koutsoumanis, K. A., Stamatou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25, 915–921.
- Koutsoumanis, K. A., Stamatou, A. P., Skandamis, P., & Nychas, G. J. E. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 124–134.
- Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., & Casiraghi, E. (2010). Evaluation and predictive modeling of shelf-life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science*, 84, 129–136.
- Lin, M., Al-Holy, M., Mousavi-Hesary, M., Al-Qadiri, H., Cavinato, A. G., & Rasco, B. A. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in chicken meat by diffuse reflectance spectroscopy (600–1100 nm). *Letters in Applied Microbiology*, 39, 148–155.
- Liu, Y., Lyon, B. G., Windham, W. R., Lyon, C. E., & Savage, E. M. (2004). Prediction of physical, color, and sensory characteristics of broiler breasts by visible/near infrared reflectance spectroscopy. *Poultry Science*, 83, 1467–1474.
- Mataragas, M., Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E., & Drosinos, E. H. (2007). Modelling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. *Meat Science*, 77, 348–356.
- Nielsen, H., Esaiassen, M., Heia, K., & Sigernes, S. (2002). Visible/near-infrared spectroscopy: A new tool for the evaluation of fish freshness. *Journal of Food Science*, 67, 1821–1826.
- Nychas, G. J. E., Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1998). Chemical changes in stored meat. In R. G. Board, & A. R. Davies (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 288–326). London: Blackie Academic and Professional.
- Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78, 77–89.
- Osorio, M. T., Zumalacarregui, J. M., Alaiiz-Rodriguez, R., Gusman-Martinez, R., Engelsen, S. B., & Mateo, J. (2009). Differentiation of perirenal and omental quality of suckling lambs according to the rearing system from Fourier transforms mid-infrared spectra using partial least squares and artificial neural networks analysis. *Meat Science*, 83, 140–147.
- Pedersen, D. K., Morel, S., Andersen, H. J., & Engelsen, S. B. (2003). Early prediction of water-holding capacity in meat by multivariate vibrational spectroscopy. *Meat Science*, 65, 581–592.
- Prieto, N., Roehle, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83, 175–186.
- Rajamäki, T., Alakomi, H. L., Ritvanen, T., Skyttä, E., Smolander, M., & Ahvenainen, R. (2006). Application of an electronic nose for quality assessment of modified atmosphere packaged poultry meat. *Food Control*, 17, 5–13.
- Rohman, A., & Che Man, Y. B. (2010). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research International*, 43, 886–892.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Letters in Applied Microbiology*, 81, 501–508.
- Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., et al. (2002). Change in the composition of the microflora on vacuum packaged beef during chill storage. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 87–99.
- Sinelli, N., Barzaghi, S., Giardina, C., & Cattaneo, T. M. P. (2005). A preliminary study using Fourier transform near infrared spectroscopy to monitor the shelf-life of packed industrial ricotta cheese. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13, 293–300.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011–1022.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 35–45.
- Tsigarida, E., Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 901–909.
- Van de Voort, F. R. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, 25, 397–403.
- Verbeke, W., Perez-Cueto, F. J. A., de Barcellos, M. D., Krystallis, A., & Grunert, K. G. (2009). European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science*, 84, 284–292.
- Verouden, M. P. H., Westerhuis, J. A., Werf, M. J. V., & Smilde, A. K. (2009). Exploring the analysis of structured metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 98, 88–96.
- Versari, A., Parpinello, G. P., Chinnici, F., & Meglioli, G. (2011). Prediction of sensory score of Italian traditional balsamic vinegars of Reggio-Emilia by mid-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 125, 1345–1350.
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A., & Tegou, E. (2006). Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 573–574, 459–465.



Genotypic characterization of *Brochothrix thermosphacta* isolated during storage of minced pork under aerobic or modified atmosphere packaging conditions

Olga S. Papadopoulou^{a,b}, Agapi I. Doulgeraki^{a,*}, Cristian Botta^c, Luca Cocolin^c, George-John E. Nychas^a

^a Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

^b National Agricultural Research Foundation, Institute of Technology of Agricultural Products, Sofokli Venizelou 1, Lycovrissi 14123, Greece

^c DIVAPRA, Agricultural Microbiology and Food Technology Sector, Faculty of Agriculture, University of Turin, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2012

Received in revised form 18 June 2012

Accepted 19 June 2012

Keywords:

Pork

Brochothrix thermosphacta

PFGE

Rep-PCR

Sau-PCR

ABSTRACT

A total of 306 colonies were isolated from the selective medium for *Brochothrix* spp., during the spoilage of minced pork stored at 0, 5, 10 and 15 °C and packed aerobically and under modified atmosphere packaging conditions (MAP). *Brochothrix* biodiversity was assessed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and representative strains were further analysed by Rep-PCR using primer (GTG)₅ and Sau-PCR with primers SAG₁ and SAG₂. Although, different results were obtained from the different methods, a significant diversity among isolates recovered from aerobic conditions was observed. On the contrary, isolates from MAP showed a lower degree of heterogeneity. The storage conditions affected the *Brochothrix* diversity, the strains isolated in the initial stage being different from the ones present at the final stage of storage at chill temperatures. A representative number of isolates, based on the results of the clustering by molecular methods, were subjected to 16S rRNA gene sequencing, revealing that all belonged to *Brochothrix thermosphacta*.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is generally accepted that bacteria are absent, or at extremely low levels in muscle tissues of healthy animals (Nychas, Skandamis, Tassou, & Koutsoumanis, 2008). As the inherent protective barriers (skins, hides) and the natural antimicrobial defence mechanisms (lysozyme, antimicrobial peptides) of the live animal are destroyed at slaughter, the resulting meat becomes exposed to increasing levels of contamination and depending on various parameters, undergoes rapid microbial decay. Sources of these microorganisms include the gastrointestinal tract and the external surfaces of the animal including the environment with which the animal had contact before or during slaughter. *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., and lactic acid bacteria (LAB) have been found to be major contributors to meat spoilage, depending on product type and conditions surrounding the product (Nychas et al., 2008). For example, it is well established that, *Pseudomonas* spp. is the dominant microbiota of meat stored under aerobic conditions, while *B. thermosphacta* becomes the dominant bacterium along with LAB throughout storage of meat stored under modified atmosphere (Doulgeraki, Paramithiotis, Kagkli, & Nychas, 2010; Nychas et al., 2008; Pennacchia, Ercolini, & Villani, 2011; Russo, Ercolini, Maurelio & Villani, 2006; Xu, Anyogu, Ouoba, & Sutherland, 2010). In particular *B. thermosphacta*, with no proteolytic

activity, has been found to produce a number of compounds e.g. acetoin, acetic, isobutyric, 2-methylbutyric, isovaleric acids, lactic acid, carbon dioxide and ethanol under aerobic or limited oxygen concentration, that contribute to meat a distinct spoilage type (Dainty, 1996; Dainty & Mackey, 1992; Nychas et al., 2008; Russo, Ercolini, Maurelio, & Villani, 2006). Moreover, discoloration and gas production can occur. In comparison with pseudomonads, *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria studies of genotype differences between strains of *B. thermosphacta* have been little studied (Xu et al., 2010).

Nowadays, the application of molecular techniques has become a routine for identification purposes, both in the identification of pathogenic microorganisms (Wang, Li, & Mustapha, 2007) and spoilage bacteria. However, to our knowledge only a few studies in the field of meat/food have focussed on the characterization of *B. thermosphacta*. Pennacchia, Villani, and Ercolini (2009) employed quantitative PCR for the detection, identification and quantification of *B. thermosphacta* from meat in an attempt to shorten the time needed for microbiological analysis. Xu et al. (2010) studied strains of *Brochothrix* spp. isolated from fish, meat and poultry using PCR amplification of 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS-PCR), repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) and 16S rDNA sequencing and their findings showed minor genotypic differences between those strains. In all cases *Brochothrix* spp. was identified as *B. thermosphacta*. Similar results were reported by Pennacchia et al. (2011) in studies on chilled beef packaged under air or vacuum. However, recently (Nowak & Piotrowska, 2012), it was reported that different strains of *B. thermosphacta* produce different hydrolases, which participate in the spoilage of meat and meat products, some strains are capable of protein degradation or produce proteases

* Corresponding author at: Agricultural University of Athens, Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece. Tel./fax: +30 210 5294938.

E-mail addresses: adoulgeraki@aua.gr, gjn@aua.gr (A.I. Doulgeraki).

with different substrate specificities. Thus, the exploration of strains that prevail and contribute in the spoilage of meat would expand knowledge of meat microbial ecology and consequently understanding the meat spoilage process.

The aim of the present study was not only to determine the genotypic diversity of *Brochothrix* isolates recovered from minced pork stored under different packaging and temperature conditions but also to monitor the succession of these strains during different storage conditions. To achieve these goals three methods, namely Repetitive Extragenic Palindrome (Rep)-PCR, Sau-PCR and Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) were used for differentiation of the isolates.

2. Materials and methods

2.1. Sample separation and storage conditions

Fresh minced pork (*Biceps femoris*, pH 5.6–5.8) was purchased immediately after grinding from the central meat market in Athens and transported under refrigeration to the laboratory within 30 min. Minced pork was prepared according to Papadopoulou, Panagou, Tassou, and Nychas (2011). Briefly, the meat was divided in portions of 50 g and placed in Styrofoam trays which were subsequently packed under aerobic modified atmosphere packaging (MAP, 60% CO₂/20% O₂/20% N₂). They were stored at 0, 5, 10 and 15 °C until spoilage was very pronounced. For aerobic storage the trays were wrapped manually with air-permeable polyethylene plastic film, while in the case of MAP, samples were packed and sealed into plastic pouches with gas permeability at 20 °C and 50% relative humidity of ca. 25, 90 and 6 cm³ m⁻¹ per day/10⁵ Pa for CO₂ and N₂ respectively, using a HancoVac 1900 Machine (Howden Food Equipment B.V., The Netherlands).

2.2. Isolation and growth of *Brochothrix* spp.

Colonies were isolated during storage of minced pork meat according to Doulgeraki et al. (2010). In brief, minced pork was sampled at appropriate time intervals, depending on storage temperature and packaging conditions. Under aerobic conditions, the incubation lasted 340, 243, 97 and 92 h, while under MAP it lasted 579.5, 411, 199 and 101 h at 0, 5, 10 and 15 °C, respectively. From different time points (fresh meat, middle and final stage of storage) approximately 40 colonies were selected randomly from the highest dilution of Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar (STAA, Biolife Italiana S.r.l., Milano, Italy). Pure cultures included in this study, were stored at –80 °C in Brain Heart Infusion Broth (BHI, Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 20% (v/v) glycerol (Merck, Darmstadt, Germany). Before further analysis, each isolate was grown twice in BHI broth at 25 °C for 24 h. Purity of the culture was always checked on BHI agar plates before use.

2.3. PFGE

PFGE was performed according to Doulgeraki et al. (2010). The restriction enzyme *Apal* (10 U) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used according to the manufacturer's recommendations for 16 h. Restriction fragments were separated in 1% PFGE grade agarose gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 0.5 mM Tris-Borate buffer on CHEF-DRII (Bio-Rad) equipment with the following running parameters: 6 V cm⁻¹, 4 s initial switching time, 40 s final switching time and 18 h of total run at 14 °C. Gels were then stained with ethidium bromide (0.5 mg mL⁻¹) in water for 1 h and destained for 2 h before being photographed using a GelDoc system (Bio-Rad). Normalization and further analysis were performed using the Pearson coefficient and UPGMA cluster analysis with Bionumerics software, version 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

2.4. DNA extraction from pure cultures

The cells from 1 mL of a 24 h culture in BHI broth (Merck) were collected after centrifugation at 14,000×g for 10 min. DNA was extracted according to Cocolin et al. (2005).

2.5. Rep-PCR analysis

One hundred nanograms of the DNA extracted from isolates was subjected to Rep-PCR analysis using primer (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTG GTGGTG-3') according to Iacumin, Comi, Cantoni, and Cocolin (2006). Reactions were carried out in a final volume of 25 µL containing: 10 mM PCR Gold Buffer 10×, 25 mM MgCl₂, 10 mM mix dNTPs, 10 µM primer (GTG)₅ and 5 U µL⁻¹ Taq-polymerase (Applied Biosystem, Carlsbad, USA). PCR reactions consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 90 °C, 30 s, primer annealing at 40 °C, 1 min and primer extension at 65 °C, 8 min, and concluded by a final extension step at 65 °C for 16 min. Amplicons were separated in a 2% (w/v) agarose gel in TBE 1× at 120 V for 2 h. After the run, gels were stained with ethidium bromide 0.5 µL mL⁻¹ for 30 min. Normalization and further analysis were performed using the Pearson coefficient and UPGMA cluster analysis with Bionumerics software, version 6.1.

2.6. Sau-PCR

One hundred nanograms of the DNA extracted from isolates was subjected to digestion using the *Sau3A* (10 U µL⁻¹) restriction endonuclease (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's recommendation, in a total volume of 20 µL. After an overnight period at 37 °C, 1 µL was transferred into a 25 µL reaction final volume containing PCR-Gold Buffer 10×, 25 mM MgCl₂, 10 mM mix dNTPs, 2 µM each primer SAG1 (5'-CCGCCGATCAG-3'), SAG2 (5'-CCGCCGATCTC-3'), and 5 U µL⁻¹ Taq-polymerase (Corich, Mattiazzi, Soldati, Carraro, & Giacomini, 2005). PCR reactions were carried out using the following amplification conditions: 25 °C for 5 min, ramp to 60 °C at 0.1 °C/s, 60 °C for 30 s, 95 °C for 1 min, 50 °C for 15 s, ramp to 25 °C at 0.1 °C/s, ramp to 50 °C at 0.1 °C/s, 50 °C for 30 s, 35 cycles of 95 °C for 15 s, 46 °C for 1 min, 65 °C for 2 min, and the final extension at 65 °C for 5 min. Amplicons were separated in a 2% (w/v) agarose gel in TBE 1× at 120 V for 2 h. After the run, gels were stained with ethidium bromide 0.5 mg mL⁻¹ for 30 min. Normalization and further analysis were performed using the Pearson coefficient and UPGMA cluster analysis with Bionumerics software, version 6.1.

3. Results and discussion

Spoilage progress of meat and meat products has been reported extensively (see Dainty, 1996; Dainty & MacKey, 1992; Nychas et al., 2008). In these reviews as well as in other studies, the diversity of the microbial population in meat and meat products stored under various conditions has been described in detail (Cocolin et al., 2004; Doulgeraki, Paramithiotis, & Nychas, 2011; Doulgeraki et al., 2010; Ercolini, Russo, Nasi, Ferranti, & Villani, 2009; Ercolini, Russo, Torrieri, Masi, & Villani, 2006; Ercolini et al., 2010; Stanbridge & Davies, 1998; Vasilopoulos et al., 2008, 2010). However, the systematic study of the succession of members of the microbial association as well as the changes occurring at strain level, indicated as Ephemeral Spoilage Organisms (ESO), was only recently taken into account (Doulgeraki et al., 2010; Nychas et al., 2008). *B. thermosphacta* is recognised as a significant portion of the spoilage microbiota of meat (Enfors, Molin, & Ternstroem, 1979; Lambropoulou, Drosinos, & Nychas, 1996; Newton & Gill, 1978; Nychas & Skandamis, 2005; Pennacchia et al., 2011; Russo et al., 2006; Xu et al., 2010), however limited information is available. Similarly, *Brochothrix* was found to be the dominant population, along with LAB in samples stored

under modified atmospheres, while on samples stored under aerobic conditions *Pseudomonas* spp. was the dominant biota followed by *Brochothrix* (detailed description of microbial association is presented in, Papadopoulou et al., 2011). Table 1 summarizes the STAA counts of fresh minced pork and at two different stages of storage (middle and final) for each condition. At chill temperatures (0 and 5 °C), bacterial counts were lower in the final stages of storage when samples were stored under MAP, while at abuse temperatures (10 and 15 °C), counts were similar for both aerobic conditions and MAP.

In the present study the diversity as well as the succession of *B. thermosphacta* at strain level from minced pork stored under different packaging (air and MAP) and temperature (0, 5, 10 and 15 °C) conditions is shown. It is also clear that the methodology used to either enumerate or study the microbial association influences the outcome. Thus, 306 *Brochothrix* isolates were recovered from fresh minced pork at two time intervals (middle, final stage) of the storage period, from all conditions (155 isolates from aerobic conditions and 151 from MAP), differentiated according to their genotypic profile (PFGE, Rep-PCR and Sau-PCR) and identified by sequencing of the V1–V3 variable region of the 16S rRNA gene. The ability of these methods to provide characterization at sub-species or strain level was based on different genomic elements. PFGE is able to produce patterns related to the DNA fragments resulting from the digestion of whole genomic DNAs with rare-cutting restriction endonucleases. Rep-PCR produces profiles related to the presence of repeated sequences within the genomes, while Sau-PCR fingerprints are created based on the presence of the bacterial genome of restriction sites for enzyme *Sau3A*.

Different results were obtained from the different methods, which were mostly attributed to the degree of discrimination of the different techniques. Indeed, the macrorestriction analysis of DNA of *B. thermosphacta* isolates by PFGE resulted in 4 clusters, which were able to distinguish the isolates detected at 0 °C from the rest, as well as the isolates obtained from the different packaging at 0 °C. The efficacy of the latter method to differentiate the isolates based on the specific conditions adopted has been previously reported for minced beef (Doulgeraki et al., 2010, 2011). The results obtained applying the Rep-PCR method were interesting, as after cluster analysis of the different profiles, two clusters consisted of isolates detected under aerobic conditions. Rep-PCR has been found able to form different clusters for isolates recovered from different processing plants (Iacumin, Comi, Cantoni, & Cocolin, 2006) and different food samples (Xu et al., 2010). On the other hand, cluster analysis obtained from Sau-PCR, with a coefficient of similarity of 70% did not give similar results to the two aforementioned molecular techniques. This could possibly be explained by the fact that a total of 33 different fingerprints resulted after image analysis.

The dendrogram obtained after cumulative image analysis of PFGE, Sau-PCR and Rep-PCR patterns using a coefficient of similarity of 86%, resulted in 8 different groups (data not shown). In Table 2, the prevalence of the different groups related to the different storage conditions is summarized. More specifically, group I consisted of

Table 1
STAA populations in minced pork stored under aerobic and MAP conditions.

Temperature °C	Storage period	STAA counts (log CFU g ⁻¹) ^a	
		Air	MAP
0	Initial	4.03 ± 0.70	4.15 ± 0.48
	Middle	6.77 ± 0.01	5.90 ± 0.32
	Final	8.12 ± 0.11	6.10 ± 0.04
5	Middle	7.64 ± 0.15	6.64 ± 0.06
	Final	8.07 ± 0.31	7.00 ± 0.05
10	Middle	6.64 ± 0.13	6.51 ± 0.72
	Final	7.66 ± 0.11	7.17 ± 0.42
15	Middle	7.45 ± 0.64	6.79 ± 0.05
	Final	7.96 ± 0.16	7.46 ± 0.17

^a *Brochothrix* counts are presented as mean ± standard deviation.

Table 2

Distribution of *Brochothrix thermosphacta* isolates during spoilage of minced pork at 0, 5, 10 and 15 °C under aerobic and modified atmospheres.

Packaging	T (°C)	Total isolates	Group ^a								
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
AIR	Fresh meat	39	9	1	–	–	–	–	1	8	20
	0	29	7 ^b /0 ^c	–	0/1	–	3/0	0/10	–	4/4	
	5	30	–	–	–	–	–	1/1	–	14/14	
	10	27	–	0/3	–	–	1/0	7/9	–	6/1	
	15	30	–	–	–	–	–	–	15/4	0/11	
MAP	Fresh meat	38	–	–	–	3	–	12	4	19	
	0	30	–	–	–	8/15	–	1/0	–	6/0	
	5	25	–	–	–	–	–	2/0	8/15	–	
	10	28	–	–	–	–	–	15/4	–	0/9	
	15	30	–	–	–	–	–	–	–	15/15	
Total isolates		306	16	4	1	26	4	63	54	138	

^a According to PFGE, Sau-PCR and Rep-PCR patterns.

^b Middle time of storage.

^c Final time of storage.

isolates recovered from fresh meat and the middle stage of storage at 0 °C under aerobic conditions. Group II consisted of 3 isolates recovered from the final stage of storage at 10 °C and 1 isolate from fresh meat under aerobic conditions. Group III consisted of a single isolate recovered from the middle stage of storage at 0 °C in aerobiosis. Group IV, encompassed strains from the middle and the final stage of storage at 0 °C in MAP, and 3 isolates which were recovered from the portion of fresh meat packaged under modified atmosphere. Group V consisted of 3 strains isolated at the middle stage of storage at 0 °C and 1 strain at 10 °C from aerobic conditions. The next group (VI) consisted of a total of 63 isolates; 29 and 34 recovered from aerobic conditions and MAP, respectively. More specifically under aerobic conditions group VI was detected on fresh meat, at the middle of storage at 5 and 10 °C and final stage of storage at 0, 5 and 10 °C, while in the case of MAP it included isolates from fresh meat, the middle stage of storage at 0, 5 and 10 °C, and the final stage of storage at 10 °C. On the other hand, in group VII, isolates from fresh meat (air and MAP), and isolates from 5 °C and 15 °C under aerobic conditions and MAP, respectively, were clustered. Finally, group VIII was detected in all conditions but one; at 5 °C under MAP. Additionally, this group was the most common one for fresh meat, 5 °C under aerobic conditions, 10 °C under MAP (final stage of storage) and 15 °C under aerobic storage (final stage) and MAP. In the latter case (15 °C, MAP), group VIII was the only Group detected. A representative number of isolates from the above groups were subjected to 16S rRNA gene sequencing, revealing that all groups were assigned to *B. thermosphacta* (data not shown).

A significant diversity among isolates recovered from aerobic conditions was observed while for isolates from MAP, the diversity was lower. These results were not in line with previous studies where MAP was found to increase both species and strain diversity (Doulgeraki et al., 2010, 2011). However, the storage conditions affected the strain diversity, although similar counts were detected. Additionally, the populations recovered from the initial stage were markedly different from the ones at the end of the storage at chill temperatures. Similar observations have been reported for beef (Doulgeraki et al., 2010, 2011; Ercolini et al., 2006). Indeed, cluster VIII, which was the most abundant, was formed from isolates recovered from fresh meat and abuse temperatures (10 and 15 °C). It has to be noted that all isolates detected at 15 °C under MAP were clustered together in the latter group. Furthermore, in the case of chill temperatures, the packaging conditions affected the strain diversity as the isolates were clustered in different groups. Indeed, isolates recovered from 0 °C were clustered in clusters VI and IV under aerobic and MAP conditions, respectively.

The present study provides an insight into *B. thermosphacta* strain diversity in relation to temperature and packaging as it was shown that *B. thermosphacta* strains differ between these conditions. These results are of importance, since they widen our knowledge of meat microbial ecology and specifically contribute to a better understanding of the spoilage process. The strain diversity found, should be further studied e.g. the biochemical characteristics (saccharolytic, lipolytic activity, etc.) of the prevailing species or strains under different conditions. Similar observations and conclusion have been reported with other species and/or strains of e.g. LAB, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* (Doulgeraki et al., 2010, 2011; Ercolini et al., 2006, 2009, 2010; Pennacchia et al., 2011).

Acknowledgements

The authors acknowledge the Symbiosis-EU (www.symbiosis-eu.net) project (no. 211638) financed by the European Commission under the 7th Framework Programme for RTD. The information in this document reflects only the authors' views and the Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

References

- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C., & Comi, G. (2004). Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1883–1894.
- Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., & Comi, G. (2005). Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 167–178.
- Corich, V., Mattiazzi, A., Soldati, E., Carraro, A., & Giacomini, A. (2005). Sau-PCR, a novel amplification technique for genetic fingerprinting of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6401–6406.
- Dainty, R. H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 19–34.
- Dainty, R. H., & MacKey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. In R. G. Board, D. Jones, R. G. Kroll, & G. L. Pettipher (Eds.), *Ecosystems: Microbes: Food. Society for applied bacteriology symposium series, Vol. 73*. (pp. 103–114).
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., Kagkli, D. M., & Nychas, G. -J. E. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*, 27, 1028–1034.
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G. -J. E. (2011). Characterization of the *Enterobacteriaceae* community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 77–83.
- Enfors, S. -O., Molin, G., & Ternstroem, A. (1979). Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen or air on the microbial flora of pork stored at 4 °C. *Journal of Applied Bacteriology*, 47, 197–208.
- Ercolini, D., Ferracino, I., La Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., & Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*, 27, 137–143.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., & Villani, F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *in vitro* and in beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1990–2001.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. (2006). Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4663–4671.
- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., & Cocolin, L. (2006). Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosum* isolated from Italian naturally fermented sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Science*, 74, 281–288.
- Lambropoulou, K. A., Drosinos, E. H., & Nychas, G. -J. E. (1996). The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 281–291.
- Newton, K. G., & Gill, C. O. (1978). The development of an anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 44, 91–95.
- Nowak, A., & Piotrowska, M. (2012). Biochemical activities of *Brochothrix thermosphacta*. *Meat Science*, 90, 410–413.
- Nychas, G. -J. E., & Skandamis, P. (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the safety of fresh meat* (pp. 461–502). Cambridge: CRC/Woodhead Publishing Limited.
- Nychas, G. -J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78, 77–89.
- Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G. -J. E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, 44, 3264–3271.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., & Villani, F. (2011). Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology*, 28, 84–93.
- Pennacchia, C., Villani, F., & Ercolini, D. (2009). Development of a real-time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 230–236.
- Russo, F., Ercolini, D., Maurelio, G., & Villani, F. (2006). Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food Microbiology*, 23, 797–802.
- Stanbridge, L. H., & Davies, A. R. (1998). The microbiology of chill stored meat. In A. R. Davies, & R. G. Board (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 174–219). London: Blackie Academic and Professional.
- Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2010). Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiology*, 27, 77–84.
- Vasilopoulos, C., Ravyis, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2008). Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1341–1353.
- Wang, L., Li, Y., & Mustapha, A. (2007). Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real time PCR and immunomagnetic separation. *Journal of Food Protection*, 70, 1366–1372.
- Xu, Y. Z., Anyogu, A. O., Ouoba, L. I. I., & Sutherland, J. P. (2010). Genotypic characterization of *Brochothrix* spp. isolated from meat, poultry and fish. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 245–251.