

**TAXEIA EKTIMHSH THS ALLOIΩSHS STHN EPIΦANEIA SYNTHPHPMENOY ΦIΛETOU AΠO
STHPΘOΣ KOToΠOYλOY ME THN EΦAPMOΓH ΠOλYΦAΣMATIKHΣ AΠEIKONIΣHPHΣ
(MULTISPECTRAL IMAGE ANALYSIS, MSI)**

E. Σπυρέλλη*, O. Ραφτοπούλου, Δ. Τομάρα, I. Χούμη, E.Z. Πανάγου, Γ-I. E. Νυχάς

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα, Ελλάδα.

(*eugeniespcheng@gmail.com)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υψηλή κατανάλωση κρέατος, ιδιαιτέρως πουλερικών, καθώς και η αυξημένη απώλεια λόγω αλλοίωσής τους επιτάσσουν τη χρήση ταχέων μεθόδων για την εκτίμηση της ποιότητάς τους. Μία εύκολα εφαρμόσιμη κατά την παραγωγή, μη επεμβατική και ταχεία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια στην επιστήμη τροφίμων είναι η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging). Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης σε συνδυασμό με κλασική μικροβιολογική ανάλυση, για την ανάπτυξη ποσοτικών μοντέλων εκτίμησης της αλλοίωσης σε φιλέτο στήθος κοτόπουλου συντηρημένου σε 4 ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10 και 15 °C). Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις επιβεβαιώθηκε ότι η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης (0 °C) παρεμπόδισε την ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας ($\lambda = 115,2$ h και $\mu_{\max} = 0,038$ h⁻¹) καθώς και του κυρίαρχου αλλοιόγονου βακτηρίου *Pseudomonas* spp. ($\lambda = 76,7$ h και $\mu_{\max} = 0,033$ h⁻¹). Επιπλέον, η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLS-R) παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα με τους δείκτες απόδοσης ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE) και συντελεστή συσχέτισης (r , correlation coefficient) να παρουσιάζουν τιμές μεγαλύτερες από 0,834 και 0,830, αντιστοίχως για όλους τους μικροοργανισμούς.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για να αποφευχθεί η άσκοπη απώλεια τροφίμων, η οποία αυξάνεται ραγδαία τα τελευταία χρόνια στην Ευρωπαϊκή Ένωση^[1] και οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αλλοίωσή τους κατά την επεξεργασία, συντήρηση και διανομή στα τελικά σημεία πώλησης, επιβάλλεται η χρήση νέων ταχέων μεθόδων ανίχνευσης της αλλοίωσής των τροφίμων^[2]. Πέρα από τις χημικές και μοριακές αναλύσεις, τα τελευταία χρόνια η επιστήμη τροφίμων έχει στραφεί σε χημειομετρικές μεθόδους όπως είναι η φασματοσκοπία δονήσεων, (NIR-φθορισμού, Raman, FTIR)^[3-5], η υπερ-φασματική και η πολυφασματική απεικόνιση^[6-7] και οι βιομμητικοί αισθητήρες οσμής και γεύσης^[8].

Η πολυφασματική ανάλυση εικόνας συνδυάζει τη φασματοσκοπία του ορατού, τη φασματοσκοπία δονήσεων (Vibrational spectroscopy) και την υπολογιστική όραση (Computer vision)^[8]. Θεωρείται μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, μη καταστροφική και ταχεία. Μπορεί να ενσωματωθεί εύκολα στο πλαίσιο της συνεχούς γραμμής παραγωγής μίας μονάδας επεξεργασίας κρεάτων και συμφέρει οικονομικά, καθώς σε βάθος χρόνου μειώνει το κόστος εκπαίδευσης του προσωπικού, ανάλυσης δειγμάτων, απόσυρσης/ δέσμμευσης παρτίδων κ.α.^[2,7]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μοντέλα μηχανικής μάθησης (γραμμικά και μη) με δεδομένα όπου έχουν συλλεχθεί από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης σε κόκκινο και λευκό κρέας και προϊόντα τους με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό της φρεσκάδας, της υγρασίας, της περιεκτικότητας σε λίπος κ.α.^[6-8]. Στην συγκεκριμένη εργασία, εφαρμόστηκε η γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την εκτίμηση της αλλοίωσης στην επιφάνεια στήθους κοτόπουλου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγματα από φιλέτο στήθος κοτόπουλο (n= 115) συντηρήθηκαν σε τέσσερις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10 και 15 °C, αερόβια συντήρηση) για χρονικό διάστημα 518 ωρών. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, δυο τυχαία δείγματα από κάθε θερμοκρασία επιλέγονταν και αναλύονταν μικροβιολογικά για την απαρίθμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) και των βακτηρίων *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις εφαρμόζοταν η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης για τα μήκη κύματος 405-970 nm.

Από τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι της μικροβιακής αύξησης με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994)^[9]. Επιπλέον, για τη συσχέτιση των φασματοσκοπικών μετρήσεων (x μεταβλητές) με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα του κάθε μικροοργανισμού εφαρμόστηκε η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης (PLS-R).

Α) Μικροβιολογική ανάλυση

Από κάθε τεμάχιο στήθος κοτόπουλου παραλαμβάνονταν ασηπτικά από την επιφάνεια 4 κομμάτια διαμέτρου 2,5 cm² (συνολική διάμετρος 20 cm², πάχος μικρότερο από 2 mm) και τοποθετούνταν σε σακούλα Stomacher. Το δείγμα αραιωνόταν με 100 mL αποστειρωμένο διάλυμα Ringer και ομογενοποιούνταν με τη χρήση συσκευής Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 2 λεπτά. Ακολουθούσε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και ο εμβολιασμός του γενικού καθώς και των επιλεκτικών υποστρωμάτων. Τα εμβολιασμένα τρυβλία επώαστηκαν και ακολούθησε παρατήρηση και καταμέτρηση των αποικιών. Συγκεκριμένα, με ποσότητα 0,1 mL εμβολιάστηκαν τα υποστρώματα για την απαρίθμηση της ΟΜΧ (Tryptic Glucose Yeast Agar - PCA, Biolife, Milano, Italy), του βακτηρίου *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas* Agar Base LAB108, LAB M., U.K.) με την προσθήκη του επιλεκτικού αντιβιοτικού Ceftrimide-Fusidin-Cephaloridine (Modified C.F.C X108, LAB M, UK) και για το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* (Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base, STAA, Biolife, Milano, Italy) με την προσθήκη αντιβιοτικού (Biolife, Milano, Italy). Με 1 mL εμβολιάστηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (de Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS, Biolife, Milano, Italy).

Β) Εφαρμογή της μεθόδου πολυφασματικής απεικόνισης

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης είναι το Videometer-Lab της εταιρίας Videometer A/S (Videometer, 2018), με τη βοήθεια του οποίου ελήφθησαν πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά και μη ομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος στην περιοχή 405-970 nm, και πιο συγκεκριμένα στα 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm^[10]. Για την επεξεργασία των πολυφασματικών εικόνων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Videometer-Lab (Videometer-Lab version 2.12.39, Videometer A/S, Denmark), που απομόνωσε το προς εξέταση δείγμα (main region of interest, ROI) από το περίγραμμα του τρυβλίου, τον περιβάλλοντα χώρο και πιθανό λίπος που υπήρχε στον ιστό του κρέατος μέσω της κανονικής διακριτικής ανάλυσης (Canonical Discriminal Analysis, CDA)^[6]. Εν συνεχεία, για κάθε εικόνα υπολογίστηκε η μέση φασματοσκοπική ανάκλαση σε κάθε μήκος κύματος, όπως αυτή προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI). Παράλληλα, υπολογίστηκε και η τυπική απόκλιση της έντασης των εικονοστοιχείων ανά μήκος κύματος. Τα δεδομένα αυτά αξιοποιήθηκαν για

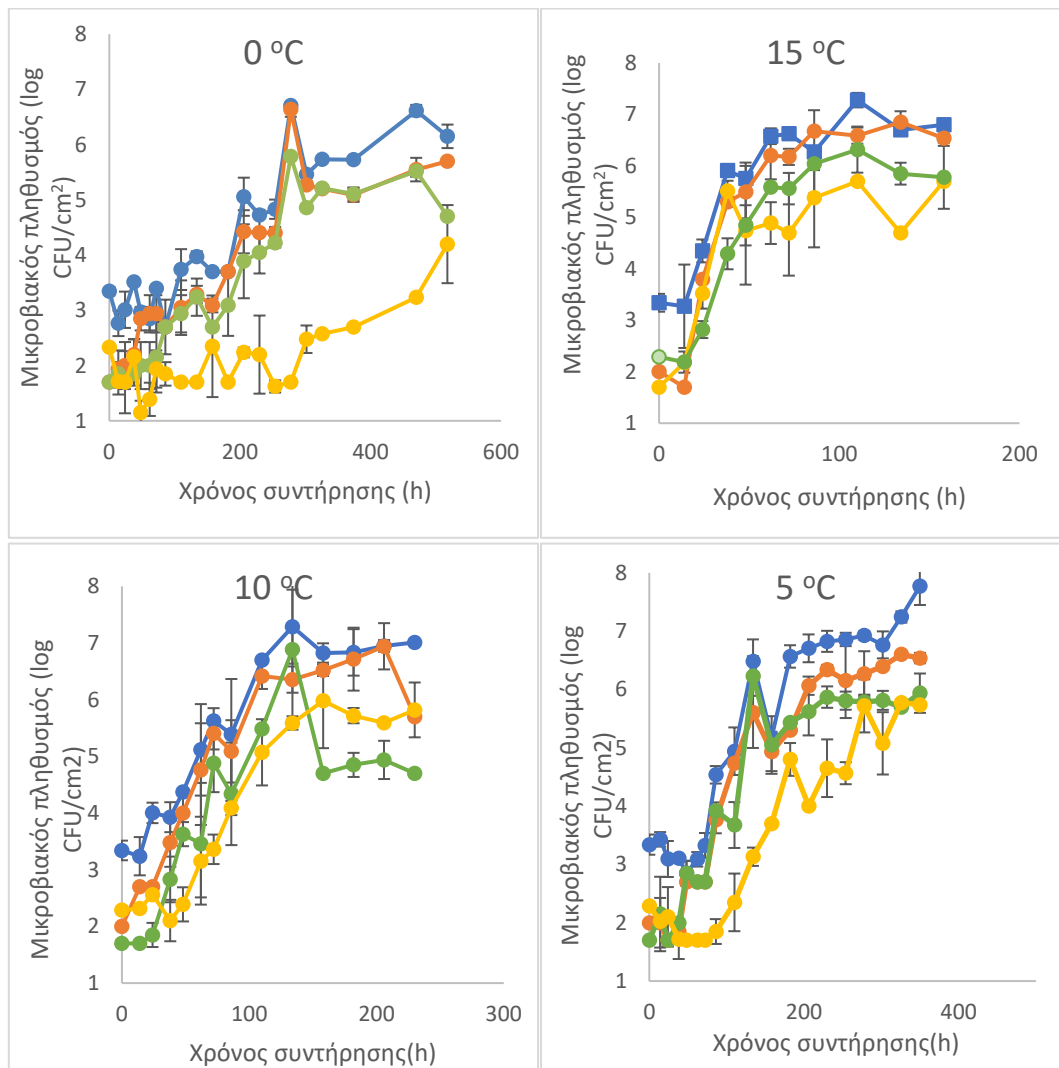
την ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (ανεξάρτητες μεταβλητές) και συσχετίστηκαν με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα (εξαρτημένες μεταβλητές). Πραγματοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μετασχηματισμός των φασματοσκοπικών δεδομένων με τον μετασχηματισμό τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV) (εξίσωση 1), και ακολούθως παρατίθενται τα μοντέλα με την ικανοποιητικότερη απόδοση.

$$S_i^{SNV} = \frac{S_i - \text{mean}(S)}{\text{stdev}(S)} \quad (1)$$

όπου: S: το σύνολο των εικονοστοιχείων (pixels) για τα φάσματα (pixel-wise spectra), S_i : η πληροφορία του συγκεκριμένου φάσματος και S_i^{SNV} : η πληροφορία του μετασχηματισμένου φάσματος^[6,10].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Μικροβιολογικά αποτελέσματα



Σχήμα 1: Καμπύλες ανάπτυξης της μικροχλωρίδας του φιλέτου κοτόπουλου κατά την αερόβια συντήρηση σε θερμοκρασία σε 0, 5, 10, 15 °C (●: OMX, ●: *Pseudomonas* spp, ●: *Brochothrix thermosphacta*, ●: οξυγαλακτικά βακτήρια).

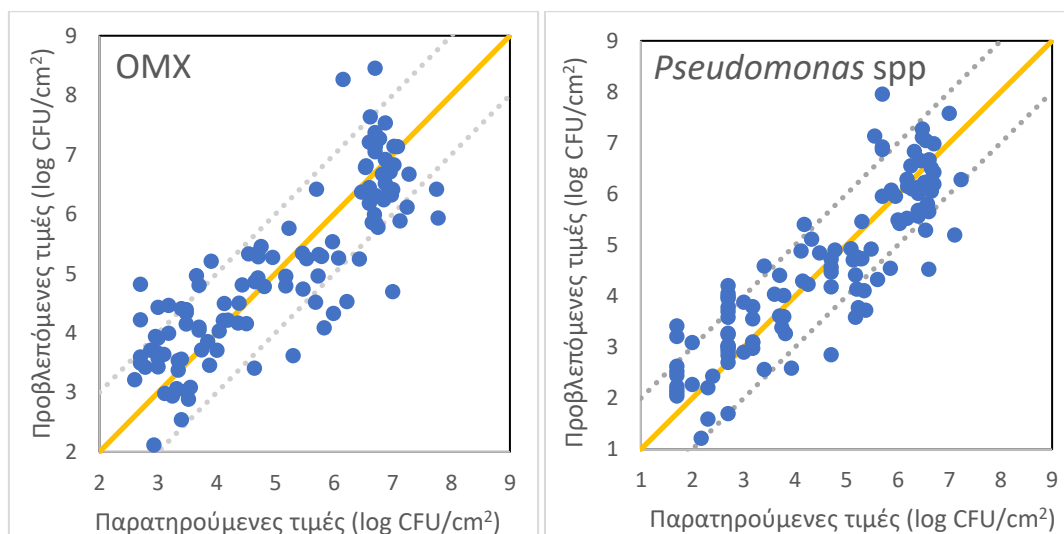
Από τα παραπάνω διαγράμματα και τις κινητικές παραμέτρους της φάσης προσαρμογής (λ) και του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}), κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός και στις τέσσερις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ήταν το βακτήριο *Pseudomonas* spp. με μεγαλύτερη τιμή φάσης προσαρμογής και μ_{\max} σε θερμοκρασία 0 °C (76,7 h και 0,033 h⁻¹ αντιστοίχως). Αντιθέτως, στην υψηλή θερμοκρασία των 15 °C οι τιμές των λ και μ_{\max} ήταν 11,5 h και 0,240 h⁻¹ αντιστοίχως. Παράλληλα, σε θερμοκρασία 5 °C ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός παρουσίασε φάση προσαρμογής και μ_{\max} ίση με 17,4 h και 0,064 h⁻¹ ενώ σε θερμοκρασία 10 °C ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0,102 h⁻¹. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται οι κινητικές παράμετροι της φάσης προσαρμογής και του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, όπως υπολογίστηκαν από το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994)^[9] με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος DMFit (www.combase.cc).

Πίνακας 1.: Κινητικές παράμετροι της OMX και του βακτηρίου *Pseudomonas* spp. βάσει του μοντέλου Baranyi και Roberts (1994) για κάθε θερμοκρασία συντήρησης.

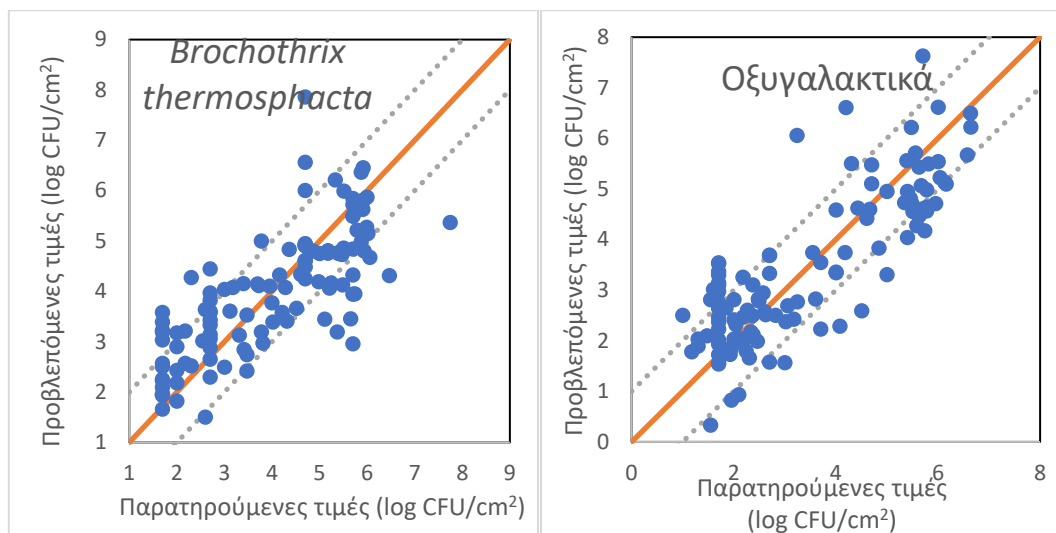
Θερ/σία (°C)	Μικροοργανισμοί	λ (φάση προσαρμογής) (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	R ²
0	OMX	115,2	0,038	0,880
	<i>Pseudomonas</i> spp.	76,7	0,033	0,877
5	OMX	52,8	0,065	0,937
	<i>Pseudomonas</i> spp.	17,5	0,064	0,955
10	OMX	22,7	0,092	0,964
	<i>Pseudomonas</i> spp.	76,7	0,033	0,877
15	OMX	8,9	0,149	0,880
	<i>Pseudomonas</i> spp.	8,7	0,246	0,941

2.Αποτελέσματα των μοντέλων εκτίμησης της μικροχλωρίδας στα δείγματα

Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων με τις παρατηρούμενες τιμές, μετά την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, μέσω του λογισμικού προγράμματος The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway).



Σχήμα 2: Συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων-προβλεπόμενων τιμών για την OMX και το βακτήριο *Pseudomonas* spp.



Σχήμα 3: Συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων-προβλεπόμενων τιμών για το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

Αναλυτικότερα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της OMX, η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE) και ο συντελεστής συσχέτισης (Correlation coefficient, r), κατά τη διαδικασία της εσωτερικής επικύρωσης (full cross validation, FCV) ήταν 0,834 και 0,846 αντιστοίχως. Για την περίπτωση της εκτίμησης του βακτηρίου *Pseudomonas* spp., οι τιμές για τους δύο δείκτες επίδοσης RMSEFCV και rFCV ήταν 0,837 και 0,871, ενώ για τον προσδιορισμό του *Brochothrix thermosphacta* παρουσίασαν τις τιμές 0,920 και 0,843. Επίσης, κατά την εσωτερική επικύρωση του μοντέλου για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι τιμές των παραμέτρων RMSE και r ήταν 0,938 και 0,830 αντιστοίχως.

Τα φάσματα που παρουσίασαν διαφοροποιήσεις από την ανάλυση πολυφασματικής απεικόνισης ήταν μεταξύ του εύρους 630-940 nm, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους συντελεστές παλινδρόμησης των μοντέλων PLS-R για τη μικροχλωρίδα του αλλοιωμένου φιλέτου κοτόπουλου. Πιο αναλυτικά, για την εκτίμηση της OMX του κοτόπουλου σημαντική φάνηκε να είναι η συνεισφορά των μηκών κύματος 630 και 660 nm, που αντιστοιχούν στην μεταμυογλοβίνη κατά τη διαδικασία της οξείδωσης^[11]. Για τον προσδιορισμό του κυρίαρχου αλλοιωγόνου βακτηρίου *Pseudomonas* spp. σημαντικές πληροφορίες εμπεριέχονται στα μήκη κύματος 505, 660 και 910 nm που αντιστοιχούν στις ενώσεις μεταμυογλοβίνη, οξυμυογλοβίνη και σε ενώσεις με δεσμούς C-H (κυρίως πρωτεΐνες). Επιπλέον, για το μοντέλο εκτίμησης του βακτηρίου *Brochothrix thermosphacta* τα μήκη κύματος που έχουν μεγάλο συντελεστή συσχέτισης είναι των 590, 630 nm που αντιστοιχούν στην μεταμυογλοβίνη, καθώς και των 660, 890, 940 nm που σχετίζονται με την οξείδωση και με το λίπος στο κρέας^[10]. Για το μοντέλο των οξυγαλακτικών βακτηρίων, πλην των 435- 570 και 870 nm, τα υπόλοιπα μήκη κύματος συνεισφεραν σημαντικά στη διαμόρφωση του μοντέλου PLS-R.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, για όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης, επιβεβαιώθηκε ότι κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός στην επιφάνεια του συντηρημένου φιλέτου κοτόπουλου ήταν το βακτήριο *Pseudomonas* spp. με ανάπτυξη που ακολουθεί αυτήν της OMX (Σχήμα 1). Η συντήρηση σε διαφορετικές ισοθερμοκρασιακές συνθήκες επηρέασε σε σημαντικό βαθμό στην αλλοίωση των δειγμάτων κοτόπουλου με αισθητή την περίπτωση της συντήρησης σε θερμοκρασία 0 °C, όπου η φάση προσαρμογής της OMX ήταν 115,2 h και στις 22 ημέρες συντήρησης ο πληθυσμός της είχε ανέλθει στην τιμή 6,15 log CFU/cm².

Από την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων, σε όλες τις περιπτώσεις μικροοργανισμών οι δείκτες επίδοσης του μοντέλου για τη διαδικασία της εσωτερικής αξιολόγησης εμφάνισαν ικανοποιητικές τιμές. Οι συντελεστές παλινδρόμησης των μοντέλων έδειξαν ότι τα φάσματα που επέδρασαν περισσότερο κατά την ανάπτυξη των μοντέλων πρόβλεψης σχετίζονται με την μυογλοβίνη, την μεταμυογλοβίνη και την οξειδωση του μυικού ιστού καθώς και του λίπους^[10,11]. Περαιτέρω βελτίωση των συγκεκριμένων μοντέλων είναι δυνατή με την συλλογή περισσότερων δεδομένων από πειράματα αλλοίωσης φιλέτου στήθους κοτόπουλου. Τέλος, απαραίτητη είναι και η διαδικασία της εξωτερικής επικύρωσης των μοντέλων με δεδομένα από ανεξάρτητα πειράματα με άλλη παρτίδα φιλέτου στήθους κοτόπουλου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου:Τ1ΕΔΚ- 04344).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Corrado, S. Sala. *Waste Manag* 79 (2018) 120-131.
- [2] G. J. E Nychas, E. Z. Panagou, F. Mohareb. *Curr Opin Food Sci* 12 (2016) 13-20.
- [3] D. I Ellis, D. Broadhurst, R. Goodacre, *Anal Chim Acta* 514 (2) (2004) 193-201.
- [4] M. S. Ammor, A. Argyri, G. J. E. Nychas, *Meat Sci* 81 (3) (2009) 507-514.
- [5] A. A. Argyri, R. M. Jarvis, D. Wedge, Y. Xu, E. Z. Panagou, R. Goodacre, G. J. E Nychas. *FOOD CONTROL*, 29 (2) (2013) 461-470.
- [6] P. Tsakanikas, D. Pavlidis, E., Panagou, G. J. Nychas. *Talanta*, 161 (2016) 606-614.
- [7] C. H. Feng, Y. Makino, S. Oshita, J. F. G. Martín. *Food control* 84 (2018) 165-176.
- [8] A.I. Ropodi, E.Z. Panagou, G.-J.E. Nychas. *Trends Food Sci Technol*. 50 (2016) 11-15.
- [9] J. Baranyi, T.A. Roberts, *Int. J. Food Microbiol*. 23 (1994) 277-294.
- [10] E.Z. Panagou, O. Papadopoulou, J.M. Carstensen, G.-J.E. Nychas. *Int J Food Microbiol* 174 (2014) 1-11.
- [11] H.H. Li, Q.S. Chen, J.W. Zhao, M.Z. Wu, *LWT - Food Sci Technol* 63 (2015) 268- 274.