



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

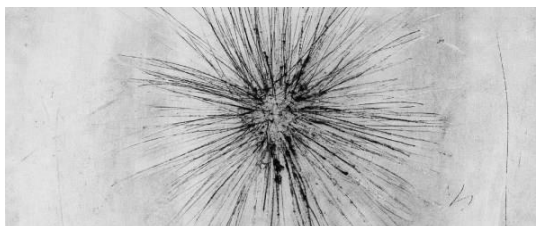
ΠΜΣ «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση: ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΗΚΤΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ
ΤΟΝ ΚΟΙΝΟ ΑΧΙΝΟ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ (PARACENTROTUS
LIVIDUS L.) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ
ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΕΒΔΟΜΑΔΑ
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ**

Μεταπτυχιακή Εργασία

Τρίκοιλας Γ. Νικόλαος



“Ο αχινός του Λόλεκ”



ΑΘΗΝΑ, 2017

**“ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ
ΤΟΝ ΚΟΙΝΟ ΑΧΙΝΟ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ (PARACENTROTUS
LIVIDUS L.) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ
ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΕΒΔΟΜΑΔΑ
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ”**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τρίκολας Γ. Νικόλαος

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΝΑΒΟΥΡΑΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ Γ.Π.Α.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΝΑΒΟΥΡΑΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ Γ.Π.Α.

ΠΑΝΑΓΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α.

ΠΑΠΠΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α.

Αθήνα, 2017

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους, κ. Πανάγου, κ. Μαλλούχο και κ. Παππά, για τις πολύτιμες συμβουλές τους όποτε κτις χρειάστηκα.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ταραντίλη και την κ. Δαφερέρα για την εμπειρία που αποκόμισα δουλεύοντας υπό τις οδηγίες τους στο εργαστήριο χημείας.

Η εργασία αυτή θα ήταν αδύνατη χωρίς την ανιδιοτελή προσφορά της κ. Αθανασοπούλου Κλεοπάτρας, που με βοήθησε σε υπέρμετρο βαθμό.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Γεωργιάδου και τον κ. Σταματίου για την πολύτιμη στήριξή τους και την βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τρίκολας Γ. Νικόλαος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία έγινε ανάλυση των πτητικών συστατικών των γονάδων του κοινού αχινού της μεσογείου *Paracentrotus lividus* L., με την μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης. Η ανάλυση περιλάμβανε την δημιουργία πτητικών προφίλ για τέσσερις ημέρες του προϊόντος στην κοινή εμπορική γυάλινη συσκευασία, προκειμένου να παρατηρηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις, και την ταυτόχρονη πραγματοποίηση μικροβιακών αναλύσεων, ώστε να προσδιοριστεί ο εμπορικός χρόνος ζωής. Παρατηρήθηκε μεγάλη πληθώρα μονοτερπενίων, οξυγονουχων και μη (όπως η ευκαλυπτόλη, το α- και β-πινένιο) καθώς και σεσκιτερπενίων (όπως τα α-Copaene και α-Bourbonene) κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Στο ποσοτικό κομμάτι που μελετήθηκαν οι ουσίες Limonene και Linalool, καθώς και τα παράγωγα τους cis-/trans- Limonene oxide και Linalyl acetate, αντίστοιχα, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της κάθε ουσίας με την πάροδο του χρόνου. Τέλος το μικροβιακό κομμάτι δεν έδειξε σαφή εικόνα για την πρόοδο της αλλοίωσης, ώστε να προσδιοριστεί ο χρόνος ζωής.

Λέξεις κλειδιά: Κοινός Αχινός Μεσογείου, *Paracentrotus lividus* L., μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης, Αέριος Χρωματογράφος.

ABSTRACT

In the present postgraduate diploma thesis, the volatile components of the *Paracentrotus lividus* L., common sea urchin glands were analyzed by the solid phase micro-extraction method. The analysis involved creating volatile profiles for four days in the commercial glass package in order to observe any divergences, and simultaneously microbial analysis were performed in order to determine the commercial lifetime. A large variety of monoterpenes, oxygenated or non-oxygenated (such as Eucalyptol and α - and β -Pinene) and Siscerterpenes (such as α -Copaene and α -Bourbonene) which were found during the reproduction period, have been observed. Limonene and Linalool, as well as their cis- / trans-Limonene oxide and Linalyl acetate derivatives, respectively, were observed to gradually increase the concentration of each substance over time. Finally the microbial analysis did not show a clear picture of the spoilage progress, so the shelf life of the product wasn't determined, but needs more research on the subject .

Keywords: Sea Urchin, *Paracentrotus lividus* L., SPME, Gas Chromatography.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1.	Ο κοινός αχινός της Μεσογείου	9
1.1.1.	Η αλιεία του αχινού στην Ελλάδα.....	10
1.1.2.	Θρεπτική αξία.....	11
1.1.3.	Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	12
1.1.4.	Κίνδυνοι αλλοίωσης	13
1.2.	Συσκευασία με γυάλινα δοχεία σε άλμη	14
1.3.	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)	15
1.4.	Αέρια χρωματογραφία με φασματόμετρο μαζών (GC-MS).....	16
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	17
2.1.	Βιολογική πρώτη ύλη	17
2.1.1.	Περιοχή δειγματοληψίας	17
2.1.2.	Δειγματοληψία με τη χρήση ίνας.....	18
2.1.3.	Αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών (GC-MS)	18
2.1.4.	Μικροβιακές αναλύσεις	19
2.2.	Μέθοδοι	21
2.2.1.	Δειγματοληψία των ουσιών του αρώματος	21
2.2.2.	Επιλογή συνθηκών δειγματοληψίας.....	22
2.2.3.	Μέθοδος μικροβιακών αναλύσεων	24
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	25
3.1.	Επιλογή συνθηκών δειγματοληψίας.....	25
3.1.1.	Λιμονένιο (Limonene)	25
3.1.2.	Πινένιο (Pinene)	26
3.1.3.	Τολουόλιο (Toluene)	27
3.1.4.	Ξυλόλιο (Xylene).....	28
3.2.	Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων	29

3.3.	Προφίλ πτητικών ουσιών	35
3.3.1.	Κυρίως πτητικό προφίλ του αχινού	43
3.3.2.	Δευτερεύον πτητικό προφίλ αχινού	47
3.3.3.	Η πτητική ομάδα των σεσκιτερπενίων.....	50
3.4.	Ποσοτικές μεταβολές πτητικών ουσιών	54
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	57
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.....	69
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II.....	70
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III.....	72
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV	74

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μεταβολή της τιμής (σε ευρώ) των νωπών αχινών στην ιχθυόσκαλα του Πειραιά.....	11
Πίνακας 2: Συστατικά του PCA.....	20
Πίνακας 3: Συστατικά του VRBGA.....	20
Πίνακας 4: Οι τιμές των συνθηκών που δοκιμάστηκαν κατά τη διάρκεια του προκαταρκτικού πειράματος .	23
Πίνακας 5: Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων για το E. coli, για το 2017.	34
Πίνακας 6: Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων για το Salmonella spp., για το 2017.	34
Πίνακας 7: Προφίλ πτητικών ουσιών της πρώτης επανάληψης, εβδομάδα 29-01/05/17-06/2017.	36
Πίνακας 8: Προφίλ πτητικών ουσιών της δεύτερης επανάληψης, εβδομάδα 19-22/05..	37
Πίνακας 9: Το κυρίως πτητικό προφίλ του αχινού, που περιλαμβάνει τις κοινές ουσίες των δύο επαναλήψεων.	43
Πίνακας 10: Το δευτερεύον πτητικό προφίλ των αχινών, το οποίο αποτελείται από ουσίες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε μια από τις δύο δειγματοληπτικές εβδομάδες.	47
Πίνακας 11: Η πτητική ομάδα των σεσκιτερπενίων που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.	52

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα Pareto για το λιμονένιο.	25
Διάγραμμα 2: Οι επιδράσεις των παραμέτρων στη συγκέντρωση του λιμονένιου.....	26
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα Pareto για το πινένιο.	26
Διάγραμμα 4: Οι επιδράσεις των παραμέτρων στη συγκέντρωση του πινένιο.....	27
Διάγραμμα 5 Διάγραμμα Pareto για το τολουόλιο.	27
Διάγραμμα 6 Οι επιδράσεις των παραμέτρων στη συγκέντρωση του τολουόλιο.....	28
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα Pareto για το ξυλόλιο.	28
Διάγραμμα 8: Η κλασική καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης και οι φάσεις της μικροβιακής ανάπτυξης.	30
Διάγραμμα 9: Εξέλιξη του Log(cfu)/g της ΟΜΧ, κατά την πρώτη επανάληψη στις 29/05/17-01/06/17.....	31
Διάγραμμα 10: Εξέλιξη του Log(cfu)/g της ΟΜΧ, κατά τη δεύτερη επανάληψη στις 19-22/06/17.....	31
Διάγραμμα 11: Εξέλιξη του Log(cfu)/g των Enterobacteriaceae, κατά την πρώτη δειγματοληψία στις 29/05/17-01/06/17.....	33
Διάγραμμα 12: Εξέλιξη του Log(cfu)/g των Enterobacteriaceae, κατά την δεύτερη δειγματοληψία στις 19-22/06/17.....	33
Διάγραμμα 13: Ποσοτικές μεταβολές στη συγκέντρωση του λιμονένιου και των οξειδίων του, κατά την πάροδο του χρόνου.....	54
Διάγραμμα 14: Ποσοτικές μεταβολές στη συγκέντρωση της λιναλόλης και του εστέρα της, κατά την πάροδο του χρόνου.	55

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Γονάδες αχινού.....	10
Εικόνα 2: Δειγματοληψία με τη μέθοδο της SPME.....	15
Εικόνα 3: Περιοχή δειγματοληψίας.....	17
Εικόνα 4: Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας με την ίνα.....	18
Εικόνα 5: Η συσκευή αέριας χρωματογραφίας DSQII, Trace GC Ultra, που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα.....	19
Εικόνα 6: Ενδεικτική αλλαγή χρώματος του θαλασσινού νερού λόγω αποσύνθεσης των περιεχόμενων γονάδων την τέταρτη ημέρα.....	32
Εικόνα 7: Χαρακτηριστικό αεριοχρωματογράφημα των πτητικών ουσιών της πρώτης επανάληψης, εβδομάδα 29/05/17-01/06/17.....	38
Εικόνα 8: Χαρακτηριστικό αεριοχρωματογράφημα των πτητικών ουσιών της δεύτερης επανάληψης, εβδομάδα 19-22/05.....	38
Εικόνα 9: Φάσμα μάζας του υδρογονάνθρακα στο χρόνο 23.55.....	39
Εικόνα 10: Φάσμα μάζας του υδρογονάνθρακα στο χρόνο 27.55.....	39
Εικόνα 11: Φάσμα μάζας του υδρογονάνθρακα στο χρόνο 27.80.....	39
Εικόνα 12: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 19.65.....	40
Εικόνα 13: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 20.90.....	40
Εικόνα 14: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 21.25.....	40
Εικόνα 15: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 22.05.....	41
Εικόνα 16: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 23.45.....	41
Εικόνα 17: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 23.70.....	41
Εικόνα 18: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 23.95.....	42
Εικόνα 19: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 24.00.....	42
Εικόνα 20: Η κύρια ανθρακική αλυσίδα της ομάδας των σεσκιτερπενίων που βρέθηκαν στα δείγματα των αχινών της παρούσας εργασίας.....	53

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο αχινός είναι ένας από τους πιο συχνά απαντώμενους βενθικούς οργανισμούς των ελληνικών θαλασσών, ενώ το είδος *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), που θα απασχολήσει την παρούσα μελέτη, είναι το πιο γνωστό ανάμεσά τους (Koukouras et al., 2007).

Αποτελεί τροφή υψηλής διατροφικής αξίας (De la Cruz-Garcia et al., 2000) και διακινείται κυρίως νωπός, ενώ σε μικρότερες ποσότητες ως κονσερβοποιημένος, βρασμένος, κατεψυγμένος και παστός (Kato & Schroeter, 1985). Επιπλέον αλλοιώνεται εύκολα κυρίως λόγω της μικροβιακής δράσης αλλά και της αυτόλυσης, και έχει μικρό χρόνο ζωής (Ashie et al., 1996).

Ο αντίκτυπος αυτών, στη βιομηχανία τροφίμων, είναι η συνήθης διατήρησή τους σε άλμη (θαλασσινό νερό) ή το μαρινάρισμα με ξύδι, λάδι, λεμόνι, ή με προσθήκη οξικού οξέος, ασκορβικού οξέως και κιτρικού οξέως (Fuselli et al., 1994).

Επίσης ο αχινός διαθέτει χαρακτηριστική γεύση, και το άρωμα του είναι έντονο (Míguez & Catoira, 1987), όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Με το έντονο άρωμα του θα ασχοληθεί η παρούσα εργασία, καθώς είναι το κυριότερο, οργανοληπτικό χαρακτηριστικό του προϊόντος του αχινού, και ο σκοπός της είναι η δημιουργία του πτητικού προφίλ των ουσιών του αρώματος του είδους *P. lividus*. που διαβιεί στις ελληνικές θάλασσες, σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης.

Η συσκευασία που εξετάστηκε ήταν η κοινή εμπορική συσκευασία η οποία αποτελείται από αποστειρωμένο θαλασσινό νερό εντός γυάλινου δοχείου. Ταυτόχρονα θεωρήθηκε σκόπιμη η μικροβιακή εξέταση των δειγμάτων προκειμένου να υπάρχει και μια εικόνα εμπορικού χρόνου ζωής.

1.1. Ο κοινός αχινός της Μεσογείου

Το βρώσιμο κομμάτι του αχινού είναι το αναπαραγωγικό του σύστημα, το οποίο είναι σχετικά απλό. Αποτελείται από πέντε γονάδες, στην κοιλιακή χώρα, διατεταγμένες συμμετρικά ως προς το κέντρο της πεντακτινωτής του συμμετρίας (Byrne, 1990), όπως παρατηρείται στην παρακάτω Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Γονάδες αχινού.

Επίσης παρατηρείται ότι το χρώμα της γονάδας είναι συνήθως ένα ανοιχτό πορτοκαλί, χωρίς να αποκλείεται ένα πιο έντονο κόκκινο ή πιο ανοιχτό κίτρινο, ανάλογα τη συγκέντρωση των καροτενοειδών και των παραγώγων τους στις γονάδες, που λαμβάνουν από την τροφή τους (Galasko et. al., 1969).

1.1.1. Η αλιεία του αχινού στην Ελλάδα

Ο *P. lividus*, όπως αναφέρθηκε, είναι ένας οργανισμός με μεγάλη διατροφική αξία, συνεπώς έχει και μεγάλη εμπορική αξία, λόγω της υψηλής ζήτησης σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου (Regis, 1986), και για τον λόγο αυτό αλιεύεται συνεχώς και σε μεγάλες ποσότητες.

Στην χώρα μας παρόλο που παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον τόσο οικονομικό όσο και οικολογικό (Sellem & Guillou, 2007), οι σχετικές πληροφορίες από την ανατολική Μεσόγειο και τις ελληνικές θάλασσες είναι περιορισμένες και αφορούν κυρίως τα πληθυσμιακά χαρακτηριστικά του είδους (Antoniadou & Vafidis, 2009), τη διατροφική του αξία και την περιεκτικότητά του σε λιπίδια, πρωτεΐνες κ.α.

Στις πληθυσμιακές μελέτες παρουσιάζεται μια σημαντική τάση μείωσης των αποθεμάτων των αχινών στις ελληνικές θάλασσες, με αποτέλεσμα το είδος *P. Lividus* να ενταχθεί στο κόκκινο βιβλίο απειλούμενων ειδών της Ελλάδος ως "τρωτό" (Λεγάκης & Μαραγκού, 2009), με άμεσο αποτέλεσμα τα νομοθετικά μέτρα περιορισμού της αλιείας (ΦΕΚ 108/2014) και έμμεσο αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του τελικού προϊόντος. Ενδεικτικά στον παρακάτω Πίνακα 1 φαίνεται η εποχική αυξομείωση της τιμής, σε ευρώ, του αχινού σύμφωνα με τον Οργανισμό Κεντρικών Αγορών Αλιείας (Http¹) για τα τέσσερα τελευταία καταγεγραμμένα έτη

που διαθέτει ο οργανισμός στην επίσημη ιστοσελίδα του, για την κεντρική ιχθυόσκαλα του Πειραιά:

	2013		2014		2015		2016	
	κιλά	Μ. τιμή	κιλά	Μ. τιμή	κιλά	Μ. τιμή	κιλά	Μ. τιμή
Ιαν	-	-	17	8,9	3	28	-	-
Φεβ	9	16,7	5	12	19,1	30,7	-	-
Μαρ	43	11,7	13,5	16,3	1	15	-	-
Απρ	37	14,4	9	18,9	2	27	7	25
Μαι	26	14,3	1	28	-	-	-	-
Ιουν	36	16,5	2	15	-	-	-	-
Ιουλ	73	16,8	1	25	-	-	20	23,7
Αυγ	99,3	21	3,8	54,5	-	-	12	35,7
Σεπτ	64	19,9	-	-	-	-	-	-
Οκτ	35	22,4	-	-	-	-	-	-
Νοε	24	20,5	-	-	-	-	-	-
Δεκ	8	21	1	28	-	-	-	-
Σύν./Μ.Ο.	454,3	17,75	53,3	22,95	25,1	25,17	39	28,13

Πίνακας 1: Μεταβολή της τιμής (σε ευρώ) των νωπών αχινών στην ιχθυόσκαλα του Πειραιά.

Γίνεται εμφανές ότι η μέση τιμή του αχινού σε ευρώ, συνεχώς αυξάνεται ενώ αντιθέτως η αλιευμένη ποσότητα μειώνεται, ιδίως μετά την εφαρμογή του Π.Δ. υπ' αριθμόν 65, του 2014, το οποίο περιορίζει τόσο τις περιόδους αλίευσης όσο και την ποσότητα αλιευμάτων στα 30 άτομα ανά αλιευτικό σκάφος, καθιστώντας έτσι τον ελληνικό αχινό ως είδος *delicatessen*.

1.1.2. Θρεπτική αξία

Παρομοίως με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, σημαντικές διαφοροποιήσεις υπάρχουν και στην θρεπτική αξία των αχινών, αναλόγως τους προαναφερθέντες παράγοντες (Bandarra et. al., 2001).

Η πολυαναφερθείσα υψηλή θρεπτική και διατροφική αξία των αχινών, και γενικά των αλιευμάτων δικαιολογείται και στηρίζεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε ολικές πρωτεΐνες και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Simopoulos, 1999).

Τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα στη σύσταση του αχινού είναι το παλμιτικό οξύ, το εικοσατριενικό, το μυριστικό και το εικοσιπεντενοϊκό. (Serrazanetti et. al., 1995; De la Cruz-Garcia et. al., 2000), τα οποία χαρακτηρίζουν το προϊόν ως ισχνό, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε ολικό λίπος.

Όσον αφορά τις ολικές πρωτεΐνες (N x 6,25), στην έρευνα των Σταμάτη κ. α. (2009), υπολογίστηκαν στα $14,1 \pm 1,4$ g/100 g, για τον ελληνικό εδώδιμο αχινό,

πράγμα που δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό του ως τροφή υψηλής διατροφικής αξίας. Άλλα ευρήματα από την έρευνα των Σταμάτη κ. α. (2009), είναι οι μέσες τιμές υγρασίας ($77,2 \pm 2,0$ g/100g), τέφρας ($3,5 \pm 0,6$ g/100g), χλωριούχου νατρίου ($1,6 \pm 0,6$ g/100g) και λίπους ($4,0 \pm 0,4$ g/100g), τα οποία παρουσίασαν μόνον ασήμαντες εποχικές διακυμάνσεις μεταξύ τους.

Όπως καταλήγουν και οι ίδιοι, ο αχινός διαθέτει τα απαραίτητα ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός εξαιρετού τροφίμου ώστε μπορεί να καταναλώνεται νωπός ως “Delicatessen” αλιευτικό προϊόν. Επιβάλλεται όμως να γίνουν περαιτέρω πειράματα εκτίμησης της διάρκειας ζωής του (shelf life) με σκοπό την ασφαλή διακίνησή του στην αγορά τροφίμων.

1.1.3. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που αναδεικνύουν τον αχινό, ως ένα εύγευστο και προτιμητό από πολλούς καταναλωτές προϊόν, είναι η χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα του (Míguez & Catoira, 1987). Εξίσου σημαντικά χαρακτηριστικά όμως είναι η υφή και το χρώμα, προκειμένου ένα τρόφιμο να είναι ελκυστικό προς τους καταναλωτές (McBride et. al., 2004).

Η γεύση του αχινού, όπως περιγράφηκε από τους Phillips et. al. (2010), χαρακτηρίζεται ως γλυκόπικρη, μεταλλική και γαλακτοκομική, με μεγάλης διάρκειας επίγευση, χωρίς αυτό να είναι απόλυτο, καθώς όπως διαπιστώνεται στην ίδια μελέτη υπάρχουν σημαντικές μεταβολές και διαφοροποιήσεις στη γεύση, που εξαρτώνται από το περιβάλλον, το φύλο, την εποχή, την αναπαραγωγική περίοδο, το είδος κ.α.

Όσον αφορά το άρωμα, οι ουσίες του αρώματος (flavor) θεωρούνται οι σημαντικότεροι παράγοντες γευστικής ποιότητας (Heath & Reineccius, 1986). Ωστόσο υπάρχουν ελάχιστες δημοσιευμένες μελέτες για τις ουσίες του αρώματος των αχινών, παρά το έντονο άρωμα τους (Soliman et. al., 1983).

Σε μια μελέτη των Niimi et. al. (2010) για τις ουσίες του αρώματος των αχινών το άρωμα τους χαρακτηρίσθηκε, από πανελίστες, ως θαλασσινό αλμυρό, γλυκό και μουχλιασμένο. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι Niimi et. al. (2010), όπως και οι Phillips et. al. (2010) παρατήρησαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή και το περιβάλλον που επικρατεί.

Η υφή των αχινών αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό παράγοντα στο τελικό προϊόν, και έχει περιγραφεί από τις παραπάνω μελέτες ως υγρή, στυπτική και όχι τόσο μαλακή κατά την μάσηση.

Το τελευταίο σημαντικό οργανοληπτικό χαρακτηριστικό των αχινών είναι το χρώμα (McBride et. al., 2004). Όπως αναφέρθηκε το χρώμα αποτελείται κυρίως από καροτενοειδή και προϊόντα τους (echinenone, α -carotene, canthaxanthin, astaxanthin κ.α.) (Peng et. al., 2012; Symonds, 2011), τα οποία λαμβάνουν μέσω της τροφής τους (άλγη). Όπως παρατήρησαν οι Suckling et. al. (2011), το χρώμα διαφοροποιείται αναλόγως την διαθέσιμη τροφή και εν γένει το περιβάλλον του αναπτύσσονται.

Από τα παραπάνω προκύπτει ένα ασφαλές συμπέρασμα ότι υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αχινού, λαμβάνοντας υπ' όψη το είδος, το περιβάλλον, την διαθέσιμη τροφή, το φύλο και την γεωγραφική περιοχή. Για το λόγω αυτό και θεωρείται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση ώστε να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

1.1.4. Κίνδυνοι αλλοίωσης

Γενικώς η αλλοίωση των τροφίμων, και δη των αλιευμάτων και των προϊόντων τους, είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο (Gram & Huss, 1996), το οποίο χρειάζεται πολύπλευρη μελέτη προκειμένου να εξηγηθεί, καθώς έχει μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον (Ashie et. al., 1996).

Το βρώσιμο κομμάτι του αχινού (γονάδες), όπως αναφέρθηκε, είναι ένα εξαιρετικά ευαλλοίωτο προϊόν, και αλλοιώνεται κυρίως λόγω της μικροβιακής δράσης της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), και στη συνέχεια λόγω της αυτόλυσης, δηλαδή της ενζυμικής δραστηριότητας (Pineiro-Sotelo et. al., 2002).

Η μικροβιακή αλλοίωση προκαλείται από ένα αρχικά χαμηλό αριθμό βακτηρίων (OMX), τα οποία αυξάνονται σε αριθμό μετά το θάνατο του οργανισμού, λόγω απώλειας της άμυνας του οργανισμού (Ashie et. al., 1996) και παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι επιδρούν αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (άρωμα, γεύση, χρώμα, υφή) του προϊόντος (Huis in't Veld, 1996).

Προκειμένου να θεωρηθεί ένα τρόφιμο (αχινός) μη αποδεκτό για κατανάλωση θα πρέπει οι μεταβολίτες των βακτηρίων να παραχθούν σε σημαντικά μεγάλες ποσότητες. Αυτό συμβαίνει όταν το πλήθος των μικροοργανισμών φθάσει σε ένα ορισμένο μέγεθος πληθυσμού, το οποίο ονομάζεται επίπεδο αλλοίωσης. Το επίπεδο αυτό εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων που κυριαρχούν στο τρόφιμο, και αυτό με τη σειρά του εξαρτάται από το προϊόν, το περιβάλλον που συλλέχθηκε και τις συνθήκες αποθήκευσής του (Huis in't Veld, 1996)

Αφού η ενδογενής χλωρίδα που συναντάται στον αχινό, εξαρτάται από το περιβάλλον στο οποίο διαβίει, σε ένα μεσογειακό περιβάλλον, όπως οι ελληνικές

θάλασσες, και υπό κανονικές συνθήκες (υδάτινη στήλη χωρίς μόλυνση), η ενδογενής χλωρίδα κυριαρχείται από βάκιλους, Gram θετικούς κυρίως του γένους *Bacillus*, αλλά και από Gram αρνητικούς ψυχρότροφους όπως αυτοί των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* και *Alcaligenes*., (ICMSF, 2000; Huss, 1995). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται, για τον αχινό στις ελληνικές θάλασσες, από τους Σάββα κ. α. (2009).

Ο δεύτερος παράγοντας που αναφέρθηκε, τα ενδογενή ένζυμα και η αυτόλυση που προκαλούν στις γονάδες, λαμβάνουν χώρα άμεσα μετά τον θάνατο του οργανισμού, ωστόσο είναι πιο ήπιας μορφής (Ashie et. al., 1996).

Τα ένζυμα αυτά συμβάλλουν περισσότερο στην απώλεια της φρεσκότητας (Ashie et. al., 1996) απ' ό τι στην αλλοίωση, αφ' ενός γιατί από ένα σημείο και μετά οι αντιδράσεις καταβολισμού γίνονται πιο αργές, σε σχέση με την ταχύτητα καταβολισμού των βακτηρίων (Kennish & Kramer, 1987), και αφ' ετέρου γιατί υπάρχουν πολλοί παράγοντες που παίζουν άριστο ρόλο στην δράση των ενζύμων, όπως ο τρόπος με τον οποίο θανατώθηκε ο οργανισμός (στρες) ή η θερμοκρασία αποθήκευσης, που επηρεάζει διαφορετικά τη δράση του κάθε ενζύμου κ. α. (Yamada et. al., 1983).

1.2. Συσσκευασία με γυάλινα δοχεία σε άλμη

Όπως ειπώθηκε ήδη οι αχινόι συσκευάζονται ποικιλοτρόπως: ολόκληροι, μόνο οι γονάδες ή τα αυγά τους, σε γυάλινα βαζάκια, πλαστικές συσκευασίες ή κονσέρβες, μαριναρισμένοι, σε άλμη, κερωμένοι, κατεψυγμένοι, νωποί, υπό κενό ακόμα και ολόκληροι (Kalogeropoulos et. al., 2012; Nordin & Kramer, 1979; Kato & Schroeter, 1985). Στην παρούσα εργασία θα αναλυθεί προϊόν που συντηρείται σε γυάλινες συσκευασίες με αποστειρωμένη άλμη (θαλασσινό νερό).

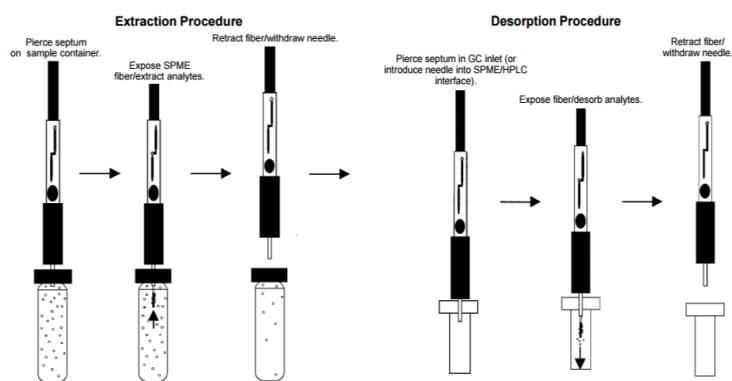
Η συγκεκριμένη συσκευασία προτιμάται ευρέως από τους ντόπιους αλιείς της Ελλάδας, λόγω οικονομίας αλλά και περιορισμένης αλιείας. Η παραμονή του προϊόντος αχινού σε άλμη, αλατότητας 3,5% σε χλωριούχο νάτριο (NaCl), προσδίδει χρόνο ζωής περίπου 20 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20°C) και 2 περίπου ημερών σε θερμοκρασία ψυγείου (2°C), όπως διαπίστωσαν και αναφέρουν οι Nordin & Kramer (1979) αλλά και οι Σάββα κ. α. (2009), για τον ελληνικό εδώδιμο αχινό, ενώ σε περίπτωση παραμονής του προϊόντος σε ακατάλληλη θερμοκρασία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, η άλμη θολώνει και παράγονται δυσάρεστες οσμές (Nordin & Kramer, 1979).

Περισσότερος χρόνος ζωής θα μπορούσε να προστεθεί στο προϊόν, μέσω μαριναρίσματος του αχινού με φυσικό ξύδι ή συνθετικό οξικό οξύ, μέσω της

διατήρησης του σε λάδι, αντί άλμης, με προσθήκη συντηρητικών ουσιών όπως κινικό οξύ ή διαλύματος οργανικού οξέος και χλωριούχου νατρίου (Fuselli et. al., 1994). Αυτό όμως αυξάνει το κόστος της συσκευασίας, συνεπώς και η τιμή του τελικού προϊόντος, η οποία ούτως ή άλλως αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου όπως αναφέρθηκε, με αποτέλεσμα ένα αρκετά ακριβό τελικό προϊόν που δεν προτιμάται σε τοπικές αγορές, από τον ντόπιο πληθυσμό.

1.3. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) είναι, σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εξαγωγής είναι μια γρήγορη και εναλλακτική μέθοδος απομόνωσης πτητικών ουσιών χωρίς διαλύτες. Η SPME βασίζεται στο ότι οι πτητικές ουσίες του δείγματος βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ του ίδιου του δείγματος και του κενού χώρου εντός του φιαλιδίου δειγματοληψίας (headspace), και κατά συνέπεια σε ισορροπία με την επικάλυψη της ίνας (πολικής, διπολικής και μη πολικής, ανάλογα το είδος των ουσιών-στόχο) όταν αυτή εισέλθει στο φιαλίδιο του δείγματος, έχοντας ως αποτέλεσμα την ομοιόμορφη απορρόφηση πτητικών ουσιών-στόχων (H_{tp}^2). Επειδή δεν υπάρχει διαλύτης γίνεται κατανοητό ότι οι αναδύμενες ουσίες του δείγματος απορροφούνται ταχέως από την ίνα, βελτιώνοντας έτσι τα ελάχιστα όρια ανίχνευσης και την καθαρότητα της ανάλυσης, σε σχέση με τις υπάρχουσες τεχνικές απλής εκχύλισης. Η SPME είναι χρήσιμη σε πολλές και διαφορετικές αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένου του χαρακτηρισμού των συστατικών γεύσης στα τρόφιμα και στα ποτά και τις ενώσεις του αρώματος σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων (H_{tp}^3). Ο τρόπος δειγματοληψίας με τη χρήση της ίνας SPME φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 2:



Εικόνα 2: Δειγματοληψία με τη μέθοδο της SPME.

1.4. Αέρια χρωματογραφία με φασματόμετρο μαζών (GC-MS)

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι διαχωρισμού ουσιών χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλία τεχνικών με ένα κοινό χαρακτηριστικό, ότι τα συστατικά προς διαχωρισμό κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων. Η μία εκ των οποίων είναι η στατική, η οποία διαθέτει και μεγάλη επιφάνεια, και η δεύτερη η κινητή φάση, η οποία διαπερνά με εξαναγκασμένη διέλευση τη στατική (Grob, 1995).

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography) είναι απλή, γρήγορη και εφαρμόζεται στο διαχωρισμό πολλών πτητικών συστατικών. Μέσω της αέριας χρωματογραφίας είναι δυνατό να αναλυθούν τα οργανικά και ανόργανα υλικά, με μοριακά βάρη που μπορούν να κυμανθούν από 2 ως πάνω από 1.000 Daltons (Mc Nair et. al., 2009).

Όταν η αέρια χρωματογραφία (GC) συνδυαστεί με τη φασματομετρία μαζών (MS), γίνεται ένα ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Τότε το εκάστοτε υπό εξέταση δείγμα, αφού διαχωριστεί στα συστατικά του, περνώντας από τη στήλη του χρωματογράφου, εισέρχεται σε αέρια κατάσταση στο φασματόμετρο μαζών όπου και βομβαρδίζεται από ηλεκτρόνια μεγάλης κινητικής ενέργειας (κουτσογιάννη, 2012). Με αυτόν τον τρόπο, προκαλείται ιονισμός των μορίων του δείγματος, που οδηγεί σε διάσπαση ώστε να δημιουργηθούν ιόντα μικρότερης μάζας. Μόλις αυτά δημιουργηθούν, επιταχύνονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και ακολούθως αποκλίνουν της αρχικής τους πορείας ανάλογα με το λόγο μάζας/ηλεκτρικό φορτίο (m/z). Το ρεύμα το οποίο παράγεται μετράται με τη βοήθεια ενός κατάλληλου ανιχνευτή και το διάγραμμα που θα προκύψει από την ένταση του μετρούμενου ρεύματος συναρτήσει του λόγου m/z , αποτελεί το φάσμα μαζών.

Η ποιοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος, δηλαδή η ταυτοποίησή τους, γίνεται είτε με τη χρήση πρότυπων δειγμάτων, είτε με τη σύγκριση των φασμάτων μάζας των συστατικών του δείγματος με αντίστοιχα φάσματα της βιβλιογραφίας και των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών φασμάτων (Adams, Wiley, NIST κ.ά.) που υπάρχουν στο λογισμικό των φασματόμετρων μαζών (Κουτσογιάννη 2012) σε συνδιασμό με τον χρόνο κατακράτησης της κάθε ουσίας.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

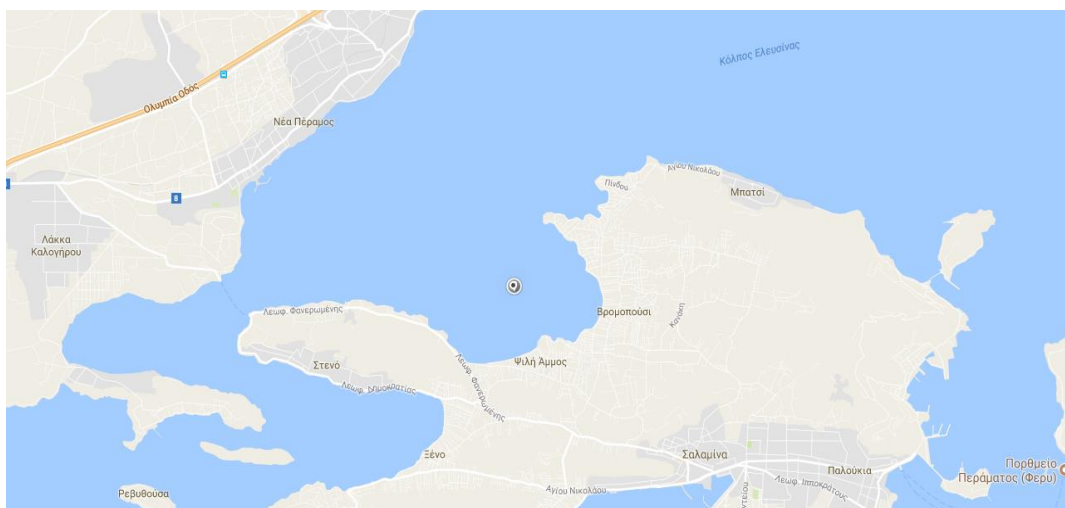
Με σκοπό να μελετηθούν οι πτητικές ουσίες των αχινών του είδους *P. Lividus*., επιλέχθηκε η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης ή SPME (solid phase micro extraction), αφ' ενός λόγω της οικονομίας χρόνου που προσέφερε σε σχέση με τη μέθοδο εκχύλισης των Niimi et. al. 2010 ή των Fahmy et. al. (1983), και αφ' ετέρου λόγω της απλότητάς της σε σχέση με τη μέθοδο «Dynamic Headspace Sampling» των Rodríguez et. al. 2001.

2.1. Βιολογική πρώτη ύλη

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε ο εδώδιμος αχινός της Μεσογείου *P. lividus*, ο οποίος αλιεύθηκε από την κ. Αθανασοπούλου Κλεοπάτρα και τον σύζυγο της, που διατηρούν το κατάστημα εμπορίας οστρακοειδών "Όστρακα ο Βαγγέλης" και προσφέρθηκαν ανιδιοτελώς για την κάλυψη των εργαστηριακών αναγκών της παρούσας εργασίας.

2.1.1. Περιοχή δειγματοληψίας

Η περιοχή από την οποία πάρθηκαν τα δείγματα είναι η ζώνη παραγωγής Φανερωμένης (Ζώνη Ι) η οποία ορίζεται στη θαλάσσια περιοχή της νήσου Σαλαμίνας, από τον κάβο του Μάκρη μέχρι την Μονή της Φανερωμένης, με συντεταγμένες 37° 98' 65.4"N, 23° 46' 33.6", όπως φαίνεται στον χάρτη:



Εικόνα 3: Περιοχή δειγματοληψίας.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν, αποκελυφώθηκαν και προσφέρθηκαν από την κ. Κλεοπάτρα, όπως αναφέρθηκε, και μεταφέρθηκαν σε γυάλινα βάζα με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, τα οποία συντηρούνταν σε σακούλα με πάγο (7-8 °C), μέχρι το εργαστήριο γενικής χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

2.1.2. Δειγματοληψία με τη χρήση ίνας

Η ίνα που επιλέχθηκε ήταν η 50/30 μm Divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane σε StableFlex/SS fiber (γκρί ίνα), της εταιρείας Supelco, στην επίσημη ιστοσελίδα της οποίας, ο οδηγός που υπάρχει, προτείνει την συγκεκριμένη ίνα για την ανίχνευση πτητικών ουσιών του αρώματος (Http⁴).

Προκειμένου να γίνει η δειγματοληψία με την ίνα, το δείγμα τοποθετήθηκε σε ένα γυάλινο φιαλίδιο 40 mL, που διέθετε κατάλληλο πώμα με τρύπα (pre-drilled septum), εντός ενός ποτηριού ζέσεως γεμάτο με 200 mL νερού, το οποίο στη συνέχεια θερμάνθηκε σε ένα μάτι. Η θερμοκρασία ελεγχόταν συνεχώς, μέσω ενός μόνιμα βυθισμένου θερμόμετρου στο νερό του υδατόλουτρου. Η διαδικασία της δειγματοληψίας αλλά και το υδατόλουτρο που χρησιμοποιήθηκε μαζί με τα προαναφερθέντα υλικά, φαίνονται στην Εικόνα 4 παρακάτω:



Εικόνα 4: Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας με την ίνα.

2.1.3. Αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Για την επιλογή των συνθήκων δειγματοληψίας αλλά και για τις δυο επαναλήψεις της δειγματοληπτικής διαδικασίας των ουσιών του αρώματος,

χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος του εργαστηρίου γενικής χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, DSQII, Trace GC Ultra, της εταιρείας Thermo Electron Corporation (Εικόνα 5), στον οποίο προστέθηκαν το κατάλληλο Liner για την SPME, καθώς και η στήλη Thermo-5MS (30m×0,25mm×0,25μm), για να γίνει η ανάλυση. Τέλος το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο (He), το οποίο αγοράστηκε από τον οίκο Linde group.



Εικόνα 5: Η συσκευή αέριας χρωματογραφίας DSQII, Trace GC Ultra, που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα.

2.1.4. Μικροβιακές αναλύσεις

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν το "tryptic glucose yeast agar" ή "plate count agar" (PCA) του οίκου Biolife, Monza, Italy, για τις καλλιέργειες της OMX, και για το οποίο χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, ενώ για τις καλλιέργειες των εντεροβακτηριδίων χρησιμοποιήθηκε το "violet red bile glucose agar" (VRBGA), επίσης του οίκου Biolife, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης. Οι ουσίες που περιέχονταν στα θρεπτικά υλικά, καθώς και η διαδικασία παραγωγής τους, αναφέρεται στους Πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα, ενώ οι τεχνικές επίστρωσης και ενσωμάτωσης αναλύονται στο παράρτημα I:

Typical formula	g/L
<i>Tryptone</i>	5
<i>Yeast Extract</i>	2,5
<i>Glucose</i>	1
<i>Agar</i>	15

Πίνακας 2: Συστατικά του PCA.

Typical formula	g/L
<i>Peptone</i>	7
<i>Yeast Extract</i>	3
<i>Sodium Chloride</i>	5
<i>Bile Salts No 3</i>	1,5
<i>Glucose</i>	10
<i>Neutral Red</i>	0,03
<i>Crystal Violet</i>	0,002
<i>Agar</i>	15

Πίνακας 3: Συστατικά του VRBGA.

Η παρασκευή του PCA ξεκίνησε τοποθετώντας 23,5 g σε 1000 g κρύου απεσταγμένου νερού. Εν συνεχεία το διάλυμα θερμάνθηκε με συνεχόμενη ανάδευση μέχρι το να γίνει διαυγές, έπειτα ακολούθησε αποστείρωσή του στους 121 °C για 15 min και τέλος, μόλις η θερμοκρασία έπεσε στους 45-50 °C, έγινε διανομή του σε τρυβλία και αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

Η παρασκευή του VRBGA γίνεται τοποθετώντας 41,5 g σε 1000 mL κρύου απεσταγμένου νερού. Εν συνεχεία ακολουθήθηκε θέρμανση μέχρι το σημείο βρασμού του με ταυτόχρονη και συνεχή ανάδευση, έως ότου το διάλυμα έγινε διαυγές. Έπειτα διατηρήθηκε στο δοχείο παρασκευής του, και χρησιμοποιήθηκε όταν η θερμοκρασία του έπεσε στους 45-50 °C.

Οι μικροβιακές αναλύσεις για το *Escherichia coli* διενεργήθηκαν από το τμήμα Υγιεινής των Τροφίμων της Διεύθυνσης Κτηνιατρικών Κέντρων Αθηνών για τη

Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Νήσων Περιφέρειας Αττικής στο πλαίσιο του προγράμματος ελέγχου και παρακολούθησης ζωνών παραγωγής ζώντων δίθυρων μαλακίων.

Οι ταμπλέτες του διαλύματος Ringer που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου IABM, Lancashire, UK, ενώ τα τρυβλία αγοράστηκαν από την εταιρία Metrolab A. E.. Τέλος έγιναν πέντε διαδοχικές αραιώσεις, από την πρώτη έως την τέταρτη ημέρα αλλοίωσης, από τρεις επαναλήψεις η κάθε αραιώση.

2.2. Μέθοδοι

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεν υπήρχε αντίστοιχο πείραμα πτητικών ουσιών αχινού με SPME, συνεπώς θεωρήθηκε σκόπιμη η διενέργεια προκαταρκτικού πειράματος με σκοπό την επιλογή των συνθήκων της δειγματοληψίας με την ίνα, προκειμένου να διερευνηθούν οι ιδανικές συνθήκες δειγματοληψίας, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

2.2.1. Δειγματοληψία των ουσιών του αρώματος

Για κάθε ανάλυση των δειγμάτων του προκαταρκτικού πειράματος, αλλά και των δειγμάτων της δειγματοληπτικής διαδικασίας που διήρκησε δύο εβδομάδες, ζυγίστηκαν 5 g. δείγματος, όπως στην μελέτη των Rodríguez et. al. (2001) και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο, 40 mL, το οποίο διέθετε κατάλληλο πώμα με τρύπα (pre-drilled septum). Στη συνέχεια το φιαλίδιο με το δείγμα προθερμάνθηκε σε υδατόλουτρο για 10 min προκειμένου να αναδείξει τις πτητικές ουσίες του αρώματος του. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, το υδατόλουτρο, παρέμεινε σε σταθερή θερμοκρασία 45 °C και μετά την εισαγωγή της ίνας, η οποία είχε ενεργοποιηθεί στους 220 °C για 30 min. Η αναλογία δείγματος προς ωφέλιμου κενού στο φιαλίδιο ήταν περίπου της τάξης του 1/6, ενώ η ίνα ήταν τοποθετημένη στο γεωμετρικό κέντρο του φιαλιδίου, και χωρίς να ακουμπάει το δείγμα.

Μετά το πέρας 40 min δειγματοληψίας η ίνα τοποθετούνταν σε κατάλληλη υποδοχή του αέριου χρωματογράφου, όπου παρέμενε για 4 min, αφού είχε ξεκινήσει η ανάλυση, προκειμένου να απελευθερώσει όλες τις πτητικές ουσίες που συνέλεξε.

Οι συνθήκες δειγματοληψίας με τη χρήση ίνας προέκυψαν από το προκαταρκτικό πείραμα, ενώ το πρόγραμμα του αέριου χρωματογράφου που ακολουθήθηκε περιλάμβανε αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 40 °C με παραμονή σε αυτή τη θερμοκρασία για 2 min, και με ρυθμό 6 °C/min, η

θερμοκρασία κατέληγε στους 250 °C, όπου και παρέμενε για 20 min, ενώ η παροχή ηλίου (He) ήταν 1 mL/min. Ο συνολικός χρόνος που διήρκεσε η κάθε ανάλυση ήταν 57 min ενώ η καταγραφή του φάσματος γινόταν από το 3^ο min και μετά, προς αποφυγή ανίχνευσης της ακετόνης, που χρησιμοποιούταν για τον καθαρισμό του φιαλιδίου.

Μετά από κάθε ανάλυση γινόταν καθαρισμός της στήλης με παρόμοιο πρόγραμμα, το οποίο περιλάμβανε αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 40 °C χωρίς αρχικό χρόνο παραμονής, και με ρυθμό 32 °C/min, κατέληγε στους 250 °C, ενώ η παροχή ηλίου (He) ήταν επίσης 1 mL/min.

Η πρώτη επανάληψη της δειγματοληψίας των ουσιών του αρώματος, ξεκίνησε στις 29/05/17 με τη δημιουργία πτητικών προφίλ στην κοινή εμπορική συσκευασία, η οποία αποτελείται από γυάλινα βαζάκια με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, και έλαβε τέλος έπειτα από τέσσερις ημέρες

Μετά το πέρας της πρώτης επανάληψης, τη δημιουργία του αρχικού πτητικού προφίλ, αλλά και την παρατήρηση της αλλοίωσης κατά την διάρκεια της συντήρησης, έγινε μια δεύτερη επανάληψη στις 19-22/05/17 προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα, επίσης πρέπει να ειπωθεί ότι το δείγμα κάθε ημέρας επαναλαμβάνονταν τρεις φορές. Τέλος οι βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι xCaliber και Adams (2007), οι οποίες περιείχονταν στο υπολογιστικό πρόγραμμα του αέριου χρωματογράφου xCalibur, της εταιρείας Thermo Electron Corporation.

2.2.2. Επιλογή συνθηκών δειγματοληψίας

Προκειμένου να βρεθούν κατάλληλες συνθήκες δειγματοληψίας με την ίνα, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικό πείραμα, στο οποίο δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνοι προθέρμανσης του δείγματος και δειγματοληψίας. συνοπτικά δοκιμάστηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί που προέκυψαν από το στατιστικό πρόγραμμα Statgraphics (Centurion XVII) της εταιρείας Statpoint Technologies Inc, με τη μέθοδο screening και τον σχεδιασμό «box behnken», όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 4:

<i>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ</i>	<i>ΔΟΚΙΜΗ Α</i>	<i>ΔΟΚΙΜΗ Β</i>	<i>ΔΟΚΙΜΗ Γ</i>
<i>Θερμοκρασία υδατόλουτρου</i>	35 °C	45 °C	-
<i>Χρόνος προθέρμανσης δείγματος</i>	10 min	20 min	-
<i>Χρόνος παραμονής της ίνας</i>	20 min	30 min	40 min

Πίνακας 4: Οι τιμές των συνθηκών που δοκιμάστηκαν κατά τη διάρκεια του προκαταρκτικού πειράματος .

Έγιναν τρεις δοκιμές κάθε πιθανού συνδυασμού προκειμένου να εξαχθεί ένα στατιστικά ασφαλές συμπέρασμα για το ποιες συνθήκες είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθούν.

Οι τιμές θερμοκρασίας του υδατόλουτρου (35 °C και 45 °C) επιλέχθηκαν βάσει της εργασίας των Rodríguez et. al. (2001), οι οποίοι είχαν θερμάνει το δείγμα στους 40 °C, παρέχοντας σταθερή ροή αζώτου, μέσω του δείγματος, κατευθείαν στον αέριο χρωματογράφο.

Οι τιμές χρόνου προθέρμανσης και χρονικής διάρκειας δειγματοληψίας επιλέχθηκαν βάσει των μελέτων των Phillips et. al. (2010) και των Rodríguez et. al. (2001), οι οποίοι θεώρησαν ότι 30 min είναι αρκετά για να αναδείξει ο αχινός τα αρώματα του. Στην προκειμένη περίπτωση όμως δεν ήταν δυνατή η αντιστοιχία χρόνου προθέρμανσης του δείγματος και χρόνου δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας την ίνα, με τα προαναφερθέντα πειράματα, συνεπώς οι χρόνοι διαχωρίστηκαν αναλόγως και σύμφωνα με τον Πίνακα 2 παραπάνω.

Προκειμένου το προκαταρκτικό πείραμα να έχει ικανοποιητικό αποτέλεσμα επιλέχθηκαν προς σύγκριση κάποιες πτητικές ουσίες που προέκυψαν από την ανάλυση με τον αέριο χρωματογράφο, όπου πληρούσαν τις εξής προδιαγραφές:

- Να ήταν κοινές σε όλα τα δείγματα,
- Να έχουν βρεθεί και σε άλλες εργασίες ουσιών του αρώματος σε αχινούς,
- Οι κορυφές τους να ήταν ευδιάκριτες και χωρίς προσμίξεις με άλλες ουσίες,
- Να αναγνωρίζονται σε ικανοποιητικό ποσοστό.

Από τις κορυφές (πηητικές ουσίες) που επιλέχθηκαν, έγινε σύγκριση των εμβαδών του φάσματος, σε όλες τις περιπτώσεις του Πίνακα 2, ώστε να επιλεχθεί η αποδοτικότερη μέθοδος δειγματοληψίας.

2.2.3. Μέθοδος μικροβιακών αναλύσεων

Ταυτόχρονα με το κυρίως πείραμα, που διήρκησε δυο εβδομάδες έγιναν και μικροβιακές αναλύσεις, που ήταν συμπληρωματικές με σκοπό την διαπίστωση της προόδου της αλλοίωσης των γονάδων του αχινού ανά ημέρα, αλλά και την επιβεβαίωση του πέρατος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής, αρχικά πάρθηκε 1 g συσκευασμένου δείγματος γονάδων και τοποθετήθηκε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με 9 mL διαλύματος Ringer (1/4 strength). Έπειτα έγινε ελαφριά ανακίνηση με vortex για δυο λεπτά ώστε να αποκολληθούν οι μικροοργανισμοί από τη γονάδα και να εισέλθουν στο διάλυμα. Από αυτό το διάλυμα και σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων έγινε επίστρωση και ενσωμάτωση σε τρυβλία με PCA και VRBGA, αντίστοιχα.

Έπειτα από την επώαση, στους 25 °C για 48 h για το PCA, και στους 37 °C για 24 h για το VRBGA, έγινε καταμέτρηση των αποικιών, και τέλος ο υπολογισμός του log(cfu)/g. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να υπολογιστεί το cfu/mL πριν λογαριθμηθεί ήταν η:

$$N = \frac{C_1 + C_2}{n_1 + (n_2/10)} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{1}{d_1}$$

Όπου:

N=cfu/mL

C₁: το συνολικό άθροισμα των αποικιών (cfu) στα n₁ τρυβλία της αραιώσης d₁

C₂: το συνολικό άθροισμα των αποικιών (cfu) στα n₂ τρυβλία της αραιώσης d₂

V: είναι ο όγκος του εμβολίου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

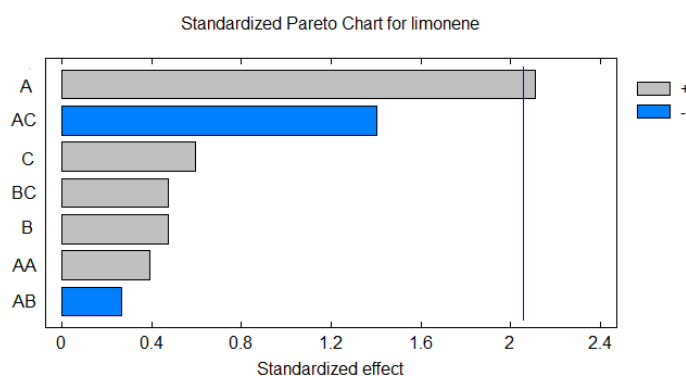
Τα αποτελέσματα που θα συζητηθούν παρακάτω αφορούν το προκαταρκτικό πείραμα, κατά το οποίο έγινε η επιλογή των συνθηκών δειγματοληψίας με τη χρήση της ίνας τις μικροβιακές αναλύσεις που έγιναν προκειμένου να προσδιοριστεί ο χρόνος ζωής του αχινού, αλλά και το κυρίως πείραμα, το οποίο χωρίζεται σε επιμέρους παραγράφους όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

3.1. Επιλογή συνθηκών δειγματοληψίας

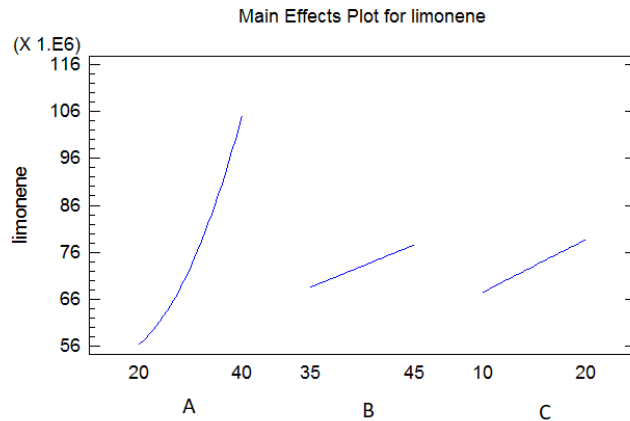
Όπως αναλύθηκε στην παραπάνω ενότητα έγιναν συνολικά 36 δοκιμές προκειμένου να βρεθεί μια βέλτιστη μέθοδος παραλαβής πτητικών από την ίνα. Οι δοκιμές που έγιναν αφορούσαν το χρόνο προθέρμανσης του δείγματος, το χρόνο παραμονής της ίνας στο φιαλίδιο και τη θερμοκρασία του υδατόλουτρου. Μετά τις αναλύσεις επιλέχθηκαν τέσσερις ουσίες, το Toluene (Τολουόλιο) (06.05), το Xylene (ξυλόλιο) (08.50), το α -Pinene (πινένιο) (11.00) και το Limonene (λιμονένιο) (13.10), οι οποίες κάλυπταν τις προϋποθέσεις που είχαν τεθεί αρχικά. Εν συνεχεία υπολογίστηκαν τα εμβαδά των ουσιών από το χρωματογράφημα κάθε δοκιμής και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Statgraphics, προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα των διάφορων δοκιμών, τα οποία και φαίνονται στα παρακάτω Διαγράμματα 1 έως 8:

3.1.1. Λιμονένιο (Limonene)

Τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού πειράματος που αφορούν το λιμονένιο φαίνονται στα παρακάτω Διαγράμματα 1 και 2:



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα Pareto για το λιμονένιο.



Διάγραμμα 2: Οι επιδράσεις των παραμέτρων στη συγκέντρωση του λιμονένιου.

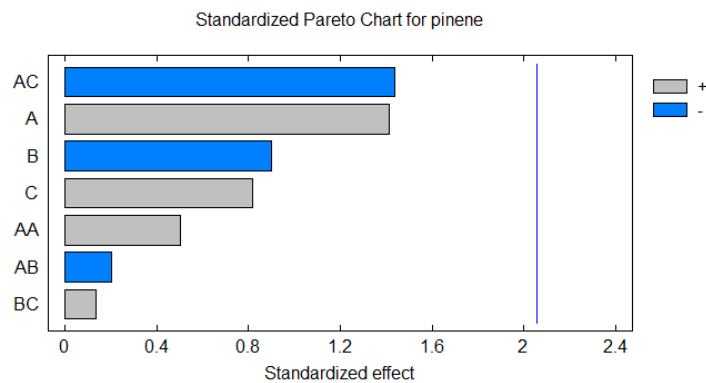
Όπου:

- A:** χρόνος παραμονής της ίνας στο δείγμα
- B:** χρόνος προθέρμανσης του δείγματος
- C:** θερμοκρασία.

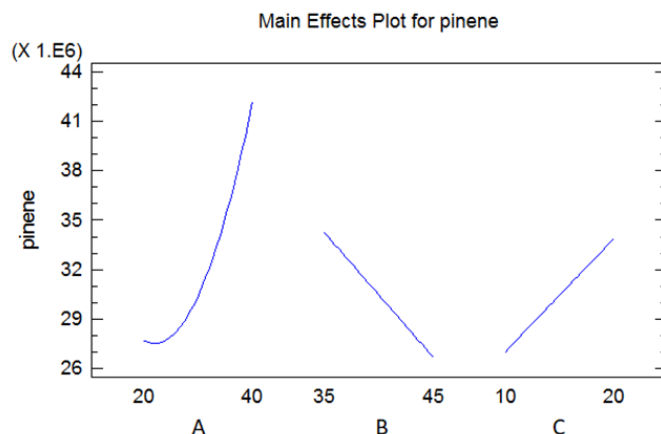
Παρατηρείται ότι υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική επίδραση του χρόνου παραμονής της ίνας (A), ενώ αντιθέτως, αρνητικά φαίνεται να επιδρά ο χρόνος προθέρμανσης του δείγματος (C) σε συνδυασμό με το χρόνο παραμονής της ίνας (A), όχι όμως σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο. Στο Διάγραμμα 2 φαίνεται η θετική επίδραση των (A): χρόνος παραμονής της ίνας, (B): θερμοκρασίας, και (C): χρόνος προετοιμασίας του δείγματος, στη συλλογή του Limonene από την ίνα.

3.1.2. Πινένιο (Pinene)

Όσον αφορά το Pinene τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω Διαγράμματα 3 και 4:



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα Pareto για το πινένιο.

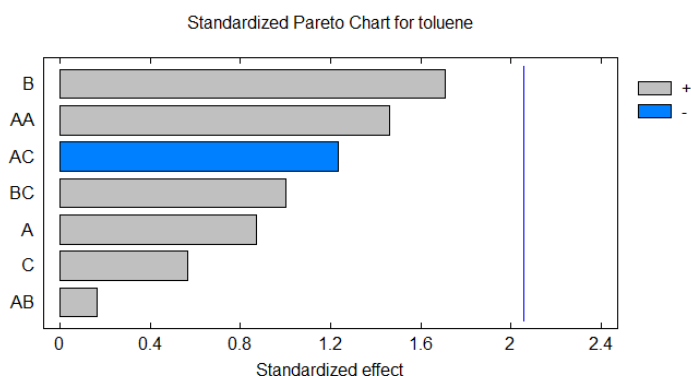


Διάγραμμα 4: Οι επιδράσεις των παραμέτρων στη συγκέντρωση του πινένιο.

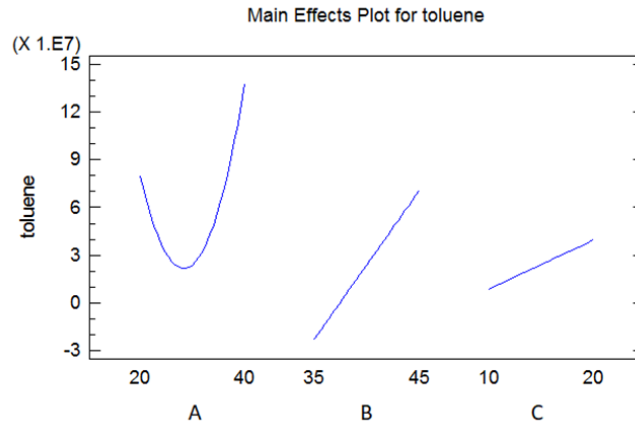
Στο Διάγραμμα 3 δεν παρατηρείται κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση, παρ' ολ' αυτά παρουσιάζεται ακόμα μια αρνητική συσχέτιση του χρόνου παραμονής της ίνας (A), και του χρόνου προθέρμανσης του δείγματος (C), ενώ με θετική επίδραση παρουσιάζεται ο χρόνος παραμονής της ίνας (A). Αρνητική επίδραση, όχι σημαντική όμως, φαίνεται να έχει η θερμοκρασία (B), ενώ θετική επίδραση έχει ο χρόνος προθέρμανσης του δείγματος (C). Αναλυτικότερα οι επιδράσεις φαίνονται στο Διάγραμμα 4, στο οποίο και φαίνεται η αρνητική επίδραση της θερμοκρασίας (B), ενώ οι άλλες παράμετροι ευνοούν την ίνα στη συλλογή του Pinene.

3.1.3. Τολουόλιο (Toluene)

Για την επίδραση των δοκιμαζόμενων συνθηκών στο Toluene προέκυψαν τα εξής Διαγράμματα 5 και 6:



Διάγραμμα 5 Διάγραμμα Pareto για το τολουόλιο.

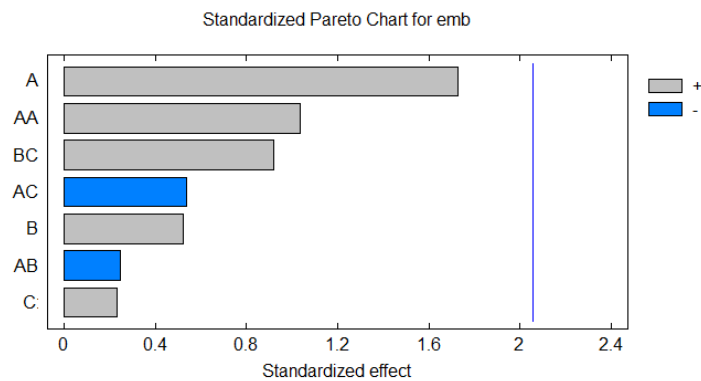


Διάγραμμα 6 Οι επιδράσεις των παραμέτρων στη συγκέντρωση του τολουόλιο.

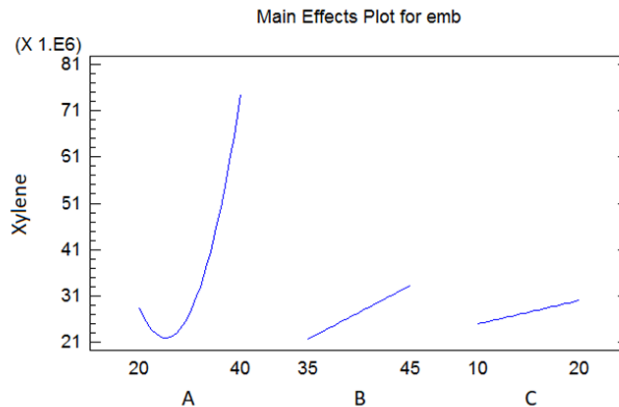
Στα οποία παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση. Θετική είναι η επίδραση της θερμοκρασίας (B), και ο χρόνος παραμονής της ίνας (A), ενώ για μία ακόμα φορά αρνητική παραμένει η συσχέτιση του χρόνου παραμονής της ίνας (A) και του χρόνου προθέρμανσης του δείγματος (C). Συγκεκριμένα στο Διάγραμμα 7 παρατηρείται η θετική επίδραση της θερμοκρασίας (B) και του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος (C). Επίσης παρατηρείται μια κυμαινόμενη επίδραση του χρόνου παραμονής της ίνας (A), με τη θετική επίδρασή της να βρίσκεται στα άκρα, δηλαδή στα 40 Min και στα 20 min.

3.1.4. Ξυλόλιο (Xylene)

Τέλος τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού πειράματος που αφορούν το Xylene, παρουσιάζονται στα παρακάτω Διαγράμματα 8 και 9:



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα Pareto για το ξυλόλιο.



Διάγραμμα 8: Οι επιδράσεις των παραμέτρων στη συγκέντρωση του ξυλόλιου.

Σε αυτά τα διαγράμματα παρατηρείται μια θετική επίδραση του χρόνου παραμονής της ίνας (A) με την ποσότητα Xylene που απορροφάται από την ίνα. Θετική επίδραση φαίνεται να έχει η θερμοκρασία του υδατόλουτρου (β), ενώ για μία ακόμη φορά αρνητική επίδραση έχει ο συνδυασμός χρόνου παραμονής της ίνας (A) και χρόνου προετοιμασίας του δείγματος (C), ενώ θετική επίδραση έχει η θερμοκρασία (B). Συγκεκριμένα στο Διάγραμμα 9 που φαίνεται αναλυτικότερα οι επιδράσεις κάθε μιας συνθήκης στη ποσότητα του Xylene που ανιχνεύεται, παρατηρείται θετική επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας (A), στα άκρα των τιμών, 20 min και 40 min, ενώ θετικές επιδράσεις έχουν όσο αυξάνονται ο χρόνος προθέρμανσης του δείγματος (C), και η θερμοκρασία (B).

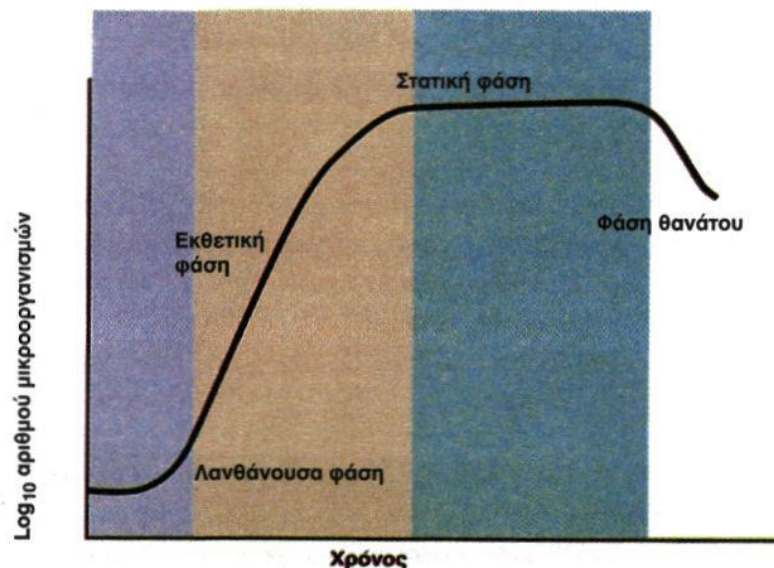
Από το προκαταρκτικό πείραμα συμπεραίνεται ότι οι καταλληλότερες συνθήκες δειγματοληψίας είναι 10 min προθέρμανση του δείγματος στους 45 °C, και μετά εισαγωγή της ίνας και η παραμονή της για 40 λεπτά στο δείγμα επίσης τους 45 °C, πριν εισαχθεί η ίνα στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση. Οι συνθήκες αυτές επιδέχονται περαιτέρω διερεύνησης, η οποία λόγω οικονομίας χρόνου δεν ήταν εφικτή.

3.2. Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων

Τα δείγματα λόγω της μεγάλης ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε, συλλέχθηκαν την προηγούμενη ημέρα (ημέρα 0), κατά τις απογευματινές ώρες πριν από κάθε δειγματοληπτική εβδομάδα. Συνεπώς, όπως θα φανεί και στα παρακάτω διαγράμματα η ανάπτυξη των μικροοργανισμών βρίσκεται ήδη σε προχωρημένο στάδιο πριν ξεκινήσουν οι αναλύσεις των πτητικών ουσιών (ημέρα 1).

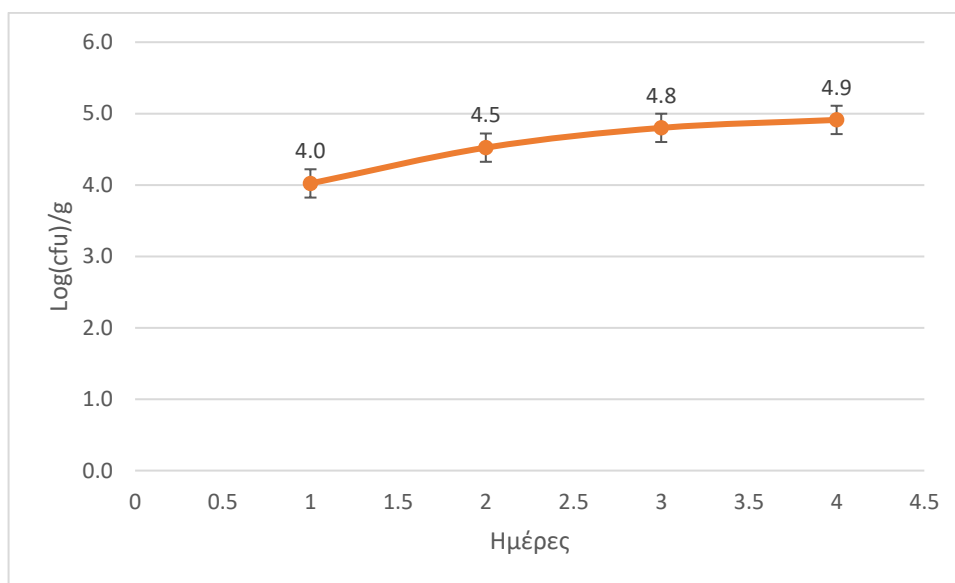
Όπως αναφέρθηκε, οι μικροβιακές αναλύσεις έγιναν με σκοπό την παρακολούθηση του εμπορικού χρόνου ζωής, ώστε ο πληθυσμός της OMX να μην ξεπεράσει το νομοθετικά θεσπισμένο όριο των 7 log(cfu)/g που αφορά γενικώς τα αλιεύματα (ICMSF 1986), ή το προτεινόμενο όριο που σύμφωνα με τον Codex Alimentarius και την προτεινόμενη οδηγία περί υγιεινής πρακτικής μαλάκιων και διθύρων (Codex Alimentarius Commission's Recommended International Code of Hygienic Practice for Molluscan and Shellfish) (FAO/WHO 1978), είναι όταν ο μικροβιακός πληθυσμός φτάσει τα 5×10^5 Cfu/g (5,6 log(cfu)/g), για την ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX), ενώ αναφορικά με τα εντεροβακτήρια και συγκεκριμένα με το E. coli, σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs), και την ενσωμάτωση του στην ευρωπαϊκή νομοθεσία με τις οδηγίες 853 και 854 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αλλά και τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, απαιτείται συγκέντρωση όχι μεγαλύτερη των 230 E. coli (Most Probable Number, MPN).

Στο παρακάτω Διάγραμμα 9 παρουσιάζεται η κλασική καμπύλη εξέλιξης του log(cfu)/g (ανάπτυξης μικροοργανισμών), με την οποία θα γίνει η σύγκριση των ευρημάτων των μικροβιακών αναλύσεων της παρούσας μελέτης, στα επόμενα Διαγράμματα 10 έως 13:

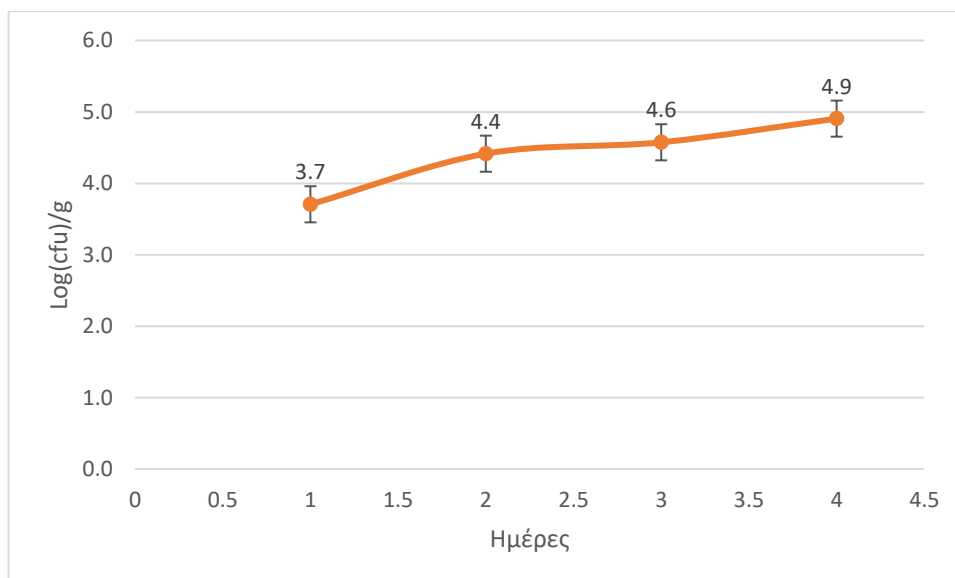


Διάγραμμα 8: Η κλασική καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης και οι φάσεις της μικροβιακής ανάπτυξης.

Τα παρακάτω δυο Διαγράμματα 10 και 11 αποτελούν τα αποτελέσματα των μικροβιακών αναλύσεων για την ΟΜΧ, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα ΙΙ της παρούσας μελέτης, για τις τέσσερις ημέρες που διήρκεσε το κυρίως πείραμα:



Διάγραμμα 9: Εξέλιξη του Log(cfu)/g της ΟΜΧ, κατά την πρώτη επανάληψη στις 29/05/17-01/06/17.



Διάγραμμα 10: Εξέλιξη του Log(cfu)/g της ΟΜΧ, κατά τη δεύτερη επανάληψη στις 19-22/06/17.

Σε αυτά τα διαγράμματα παρατηρείται, όπως αναφέρθηκε, ότι τα δείγματα δεν είναι ολόφρεσκα, καθώς όπως παρατήρησαν οι Σταμάτης κ.α. (2004), στην περίπτωση που οι γονάδες είναι φρεσκοαλιευμένες, το Log(cfu)/g κυμαίνεται ανάμεσα στο 0 και το 2,9. Οι τιμές που απεικονίζονται στα διαγράμματα είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.

Επίσης παρατηρείται ότι κατά τις τέσσερις ημέρες της συντήρησης, οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί βρίσκονταν στο τέλος της λανθάνουσας φάσης και στην αρχή της στατικής, όπως συμπεραίνεται από την κλίση της καμπύλης, σε σύγκριση με την κλασική καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης.

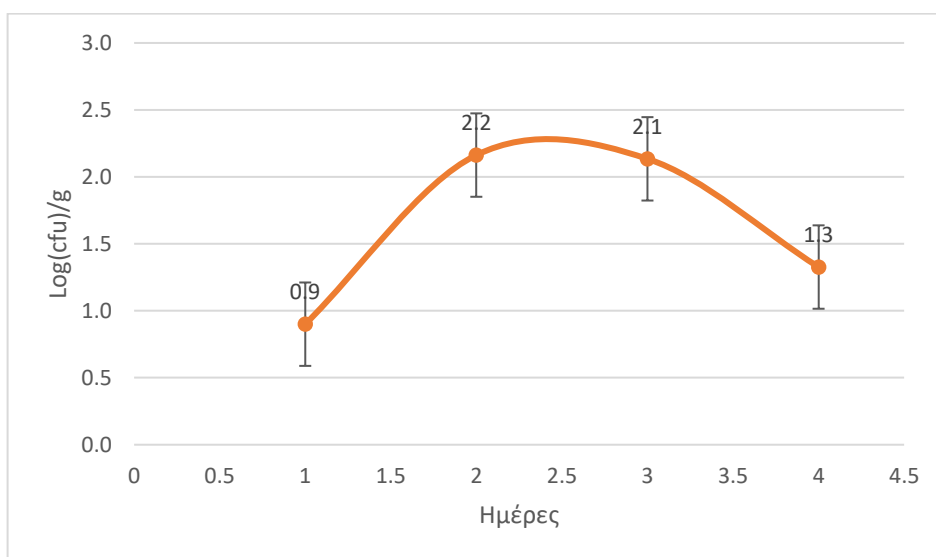
Στην στατική φάση, όπου παρουσιάζεται και ο μέγιστος αριθμός μικροβιακής ανάπτυξης, παρατηρείται ένα μέγιστο 4,9 Log(cfu)/g κατά την τέταρτη ημέρα, και στις δυο επαναλήψεις της δειγματοληπτικής διαδικασίας των ουσιών του αρώματος, ενώ περαιτέρω ημέρες αναλύσεων δεν θεωρήθηκαν σκόπιμες καθώς το προϊόν θεωρήθηκε μη αποδεκτό για κατανάλωση εφόσον το θαλασσινό νερό εντός της συσκευασίας είχε γίνει πορτοκαλί λόγω της αποσύνθεσης των γονάδων (Εικόνα 6) και λόγω της δυσάρεστης οσμής η οποία θα αναλυθεί παρακάτω.



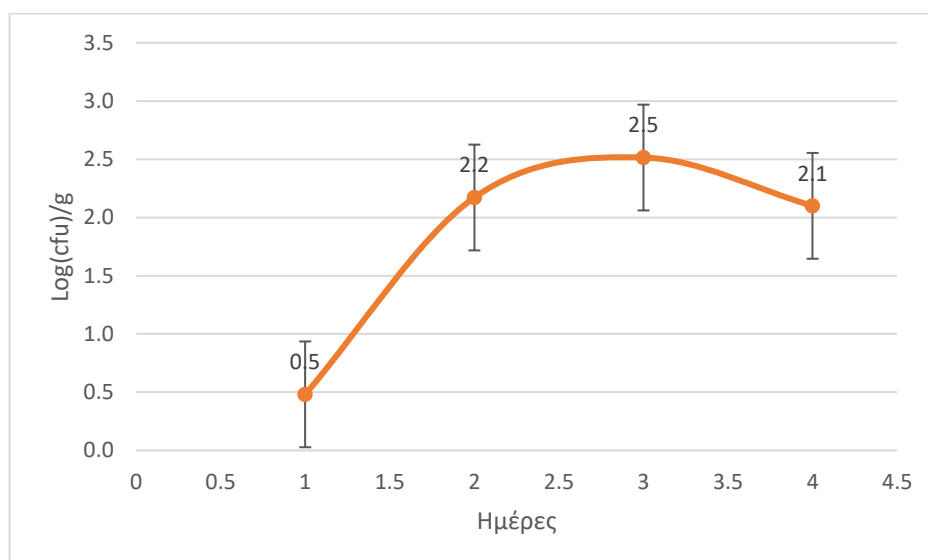
Εικόνα 6: Ενδεικτική αλλαγή χρώματος του θαλασσινού νερού λόγω αποσύνθεσης των περιεχόμενων γονάδων την τέταρτη ημέρα.

Οι μικροδιαφορές που παρατηρούνται στα παραπάνω διαγράμματα πιθανώς να οφείλονται σε ασήμαντες εποχικές διαφοροποιήσεις στη σύνθεση του μικροβιακού φορτίου των γονάδων και στη σύσταση των ίδιων των γονάδων, όπως έχει παρατηρηθεί από τους Σταμάτη κ. α. 2004.

Στα επόμενα δύο Διαγράμματα 12 και 13, παρατηρείται η εξέλιξη της ανάπτυξης του Log(cfu)/g των *enterobacteriaceae*, των οποίων τα πλήρη αποτελέσματα αποτυπώνονται στο παράρτημα II της παρούσας εργασίας, και οι τιμές οι οποίες παρουσιάζονται στα διαγράμματα αυτά αποτελούν τον μέσο όρο των μετρήσεων:



Διάγραμμα 11: Εξέλιξη του Log(cfu)/g των *Enterobacteriaceae*, κατά την πρώτη δειγματοληψία στις 29/05/17-01/06/17.



Διάγραμμα 12: Εξέλιξη του Log(cfu)/g των *Enterobacteriaceae*, κατά την δεύτερη δειγματοληψία στις 19-22/06/17.

Στα διαγράμματα αυτά παρατηρείται μια πιο πλήρης καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης σε σχέση με τις καμπύλες της ΟΜΧ στα Διαγράμματα 10 και 11, που ομοιάζει της κλασσικής καμπύλης μικροβιακής ανάπτυξης του Διαγράμματος 9. Την πρώτη ημέρα παρατηρείται η εκθετική φάση ανάπτυξης, η οποία διατηρείται μέχρι το μέσο περίπου της δεύτερης ημέρας. Η στατική φάση που ακολουθεί φαίνεται να διαρκεί περίπου μία ημέρα, πριν ξεκινήσει η φάση της μικροβιακής θανάτωσης μετά από τρεισήμισι ημέρες και στις δυο επαναλήψεις.

Οι μικροδιαφορές που παρατηρούνται στα συγκεκριμένα διαγράμματα ίσως να οφείλονται, όπως και στα διαγράμματα της ΟΜΧ, σε εποχικές διαφοροποιήσεις, αλλά και μικροβιακού ανταγωνισμού.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι Πίνακες 5 και 6 που αφορούν τους μικροοργανισμούς *E. coli* και *Salmonella spp.*, αντίστοιχα, τα οποία σύμφωνα με την έρευνα του τμήματος Υγιεινής των Τροφίμων της Διεύθυνσης Κτηνιατρικών Κέντρων Αθηνών για τη Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Νήσων Περιφέρειας Αττικής, βρέθηκε σε επίπεδα χαμηλότερα από τα όρια που ορίζει η νομοθεσία (οδηγίες 853 και 854 της Ε.Ε.), και τα οποία είναι 230 MPN και απουσία στα 25 g, όπως φαίνεται:

1 ^{ος} του '17	<18MPN/100gr
2 ^{ος} του '17	20MPN/100gr
3 ^{ος} του '17	<18MPN/100gr
4 ^{ος} του '17	<18MPN/100gr
5 ^{ος} του '17	20MPN/100gr
6 ^{ος} του 17	40MPN/100gr

Πίνακας 5: Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων για το *E. coli*, για το 2017.

1 ^{ος} του '17	απουσία σε 25 g
2 ^{ος} του '17	απουσία σε 25 g
3 ^{ος} του '17	απουσία σε 25 g
4 ^{ος} του '17	απουσία σε 25 g
5 ^{ος} του '17	απουσία σε 25 g
6 ^{ος} του '17	απουσία σε 25 g

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων για το *Salmonella spp.*, για το 2017.

Παρατηρείται ότι καθ' όλη τη διάρκεια των δειγματοληψιών τα μικροβιακά όρια για τους ενδιαφερόμενους μικροοργανισμούς, ήταν συμβατά με τα θεσπισμένα όρια της Ευρωπαϊκής ένωσης, όπως αυτά αναφέρονται στις οδηγίες 853 και 854 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αλλά και τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.

Συμπερασματικά, αναφέροντας τη μέγιστη τιμή του $\text{Log}(\text{cfu})/\text{g}$ της OMX, της παρούσας εργασίας, η οποία, παρόλο που το προϊόν ήταν εμφανώς αποχρωματισμένο και άρα μη αποδεκτό από τον καταναλωτή, δεν προσεγγίζει το νομοθετημένο γενικό όριο των $7 \text{ log}(\text{cfu})/\text{g}$ που αφορά γενικώς τα αλιεύματα (ICMSF 1986), αλλά ούτε και το προτεινόμενο όριο των $5,6 \text{ Log}(\text{cfu})/\text{g}$ που αφορά τα δίθυρα και τα μαλάκια ειδικότερα, κατηγορία στην οποία νομοθετικά εμπίπτει ο αχινός, και που αναφέρεται στον Codex Alimentarius, Commission's Recommended International Code of Hygienic Practice for Molluscan and Shellfish (FAO/WHO 1978), και λαμβάνοντας υπόψιν την εργασία των Σάββα κ. α. (2009), οι οποίοι μελέτησαν τον μικροβιακό χρόνο ζωής των γονάδων του αχινού σε παρόμοια θερμοκρασία σε σχέση με την παρούσα μελέτη ($5 \text{ }^\circ\text{C}$), χωρίς χρήση συσκευασίας, καταλήγοντας μετά από 3 ημέρες συντήρησης σε ένα $\text{log}(\text{cfu})$ μεγαλύτερο από το 7 που ορίζει η νομοθεσία, αλλά και την εργασία των Tragantzopoulos et. al. (2008), οι οποίοι μαρινάροντας τις γονάδες και συσκευάζοντάς τες υπό κενό, κατάφεραν να τις διατηρήσουν για 120 ημέρες χωρίς το μικροβιακό φορτίο να ξεπεράσει το όριο των $7 \text{ Log}(\text{cfu})/\text{g}$, βγαίνει το συμπέρασμα ότι τα υπάρχοντα νομοθετικά όρια μικροβιακής αλλοίωσης δεν είναι ενδεικτικά για το κάθε προϊόν αχινού.

3.3. Προφίλ πτητικών ουσιών

Τα προφίλ των πτητικών ουσιών, κατά τις δυο επαναλήψεις, συνοψίζονται στους Πίνακες 7 και 8, για τις 29/05/17-01/06/17 και 19-22/05/2017 αντίστοιχα:

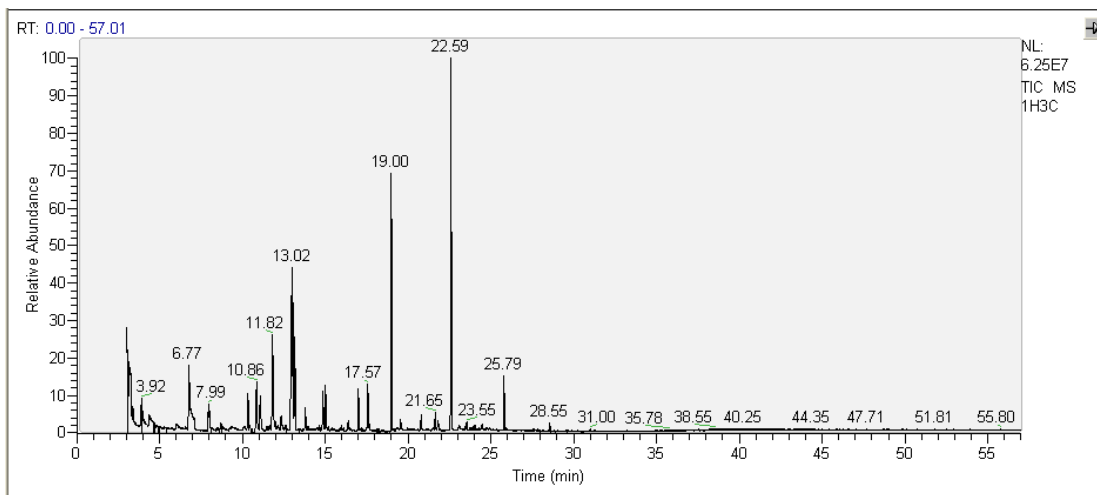
RT (±)	COMPOUND
03.95	1-Butanol
06.00	Toluene
07.95	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone
08.45	Ethylbenzene
08.70	p-Xylene
09.25	Nonane
10.35	α-Pinene
10.85	Camphene
11.65	β-Pinene
11.80	6-Methyl-5-hepten-2-one / β-Myrcene
12.00	Decane
12.15	1,2,4-trimethyl-Benzene
12.35	Octanal
12.95	p-Cymene
13.00	Limonene
13.15	Eucalyptol
13.80	γ-Terpinene
14.65	Undecane
14.85	Linalool
15.55	Fenchol
15.85	cis-Limonene oxide
15.95	trans-Limonene oxide
16.40	Camphor
17.00	1-Dodecene
17.15	Dodecane
17.55	Decanal
18.45	Linalyl acetate
19.55	Menthyl acetate
19.95	Tridecane
21.65	1-Tetradecene
21.80	Tetradecane
23.10	6,10-dimethyl-5,9-Undecadien-2-one (geranyl acetone)
23.55	Hydrocarbon
24.50	2,6,11,15-tetramethyl hexadecane (crocetane)
27.55	Hydrocarbon
27.80	Hydrocarbon

Πίνακας 7: Προφίλ πτητικών ουσιών της πρώτης επανάληψης, εβδομάδα 29-01/05/17-06/2017.

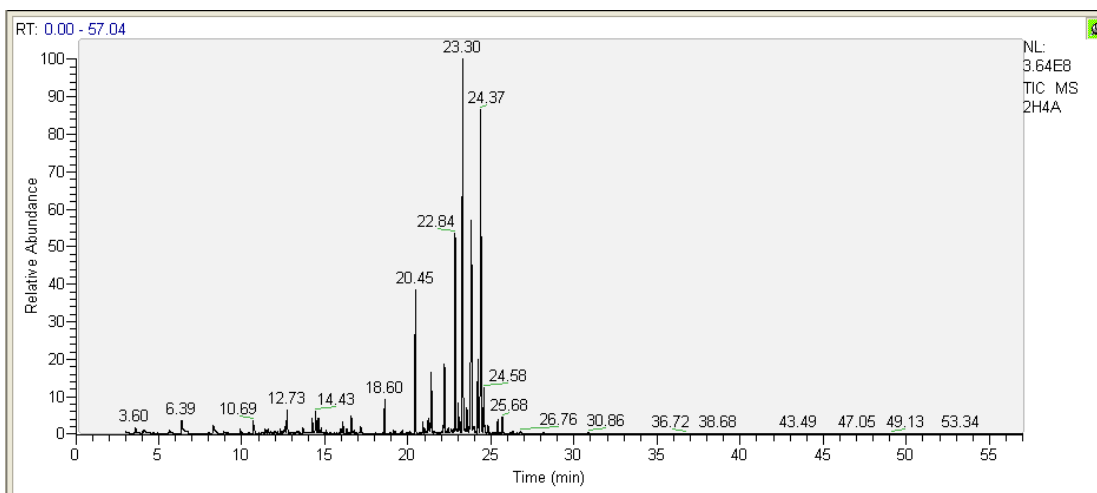
RT (±)	COMPOUND
03.60	1-Butanol
05.65	Toluene
07.55	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone
08.05	Ethylbenzene
08.35	p-Xylene
08.90	Benzene,1,2-dimethyl-
09.15	Methane tribromo (tribromoacetic acid)
09.90	α-Pinene
10.45	Camphene
11.20	β-Pinene
11.40	6-Methyl-5-hepten-2-one
11.60	Decane
11.70	1,2,4-trimethyl-benzene
12.30	3,7-dimethyl-2,4-octadiene
12.50	p-Cymene
12.60	Limonene
12.75	Eucalyptol
13.35	γ-Terpinene
13.70	Dihydromyrcenol
14.25	Undecane
14.45	Linalool
14.80	α-Thujone
15.10	β-Thujone
15.95	Camphor
16.10	Menthone
16.35	iso-Menthone
16.60	1-Dodecene
16.75	Dodecane
17.15	Decanal
19.15	Menthyl acetate
19.65	Unidentified compound
20.45	α-Cubebene
20.90	Unidentified compound
21.00	α-Ylangene
21.15	α-Copaene / α-Bourbonene
21.25	Unidentified compound
21.40	β-Bourbonene
22.05	Unidentified compound
22.10	Rotundene
22.45	β-Copaene
22.60	Neryl acetone
22.75	cis-Muurola-3,5-diene
22.85	trans-Muurola-3,5-diene
23.00	cis-Cadina-1(6),4-diene
23.15	cis-Murolo-4(14),5-diene
23.30	trans-Cadina-1(6),4-diene
23.45	Unidentified compound
23.55	Germacrene D
23.70	Unidentified compound
23.80	trans-Murolo-4(14),5-diene
23.95	Unidentified compound
24.00	Unidentified compound
24.20	δ-Cadinene
24.35	cis-Calamenene (Zonarene)
24.60	trans-Cadina-1,4-diene
24.65	α-Cadinene
24.80	α-Calacorene
25.25	β-Calacorene
25.70	Gleenol

Πίνακας 8: Προφίλ πτητικών ουσιών της δεύτερης επανάληψης, εβδομάδα 19-22/05.

Στις παρακάτω Εικόνες 7 και 8 φαίνονται τα χαρακτηριστικά αεριοχρωματογραφήματα των δυο επαναλήψεων της δειγματοληπτικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε, 29/05/17-01/06/17 και 19-22/05/2017 αντίστοιχα:



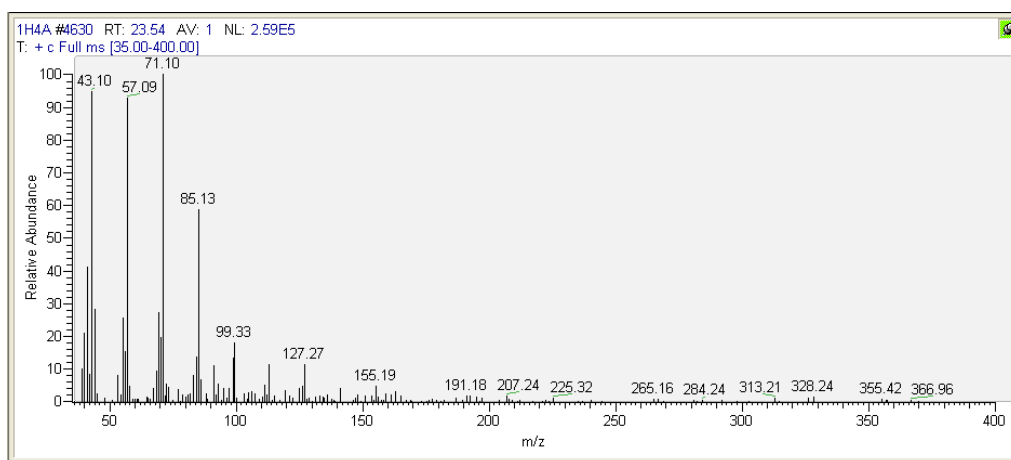
Εικόνα 7: Χαρακτηριστικό αεριοχρωματογράφημα των πτητικών ουσιών της πρώτης επανάληψης, εβδομάδα 29/05/17-01/06/17.



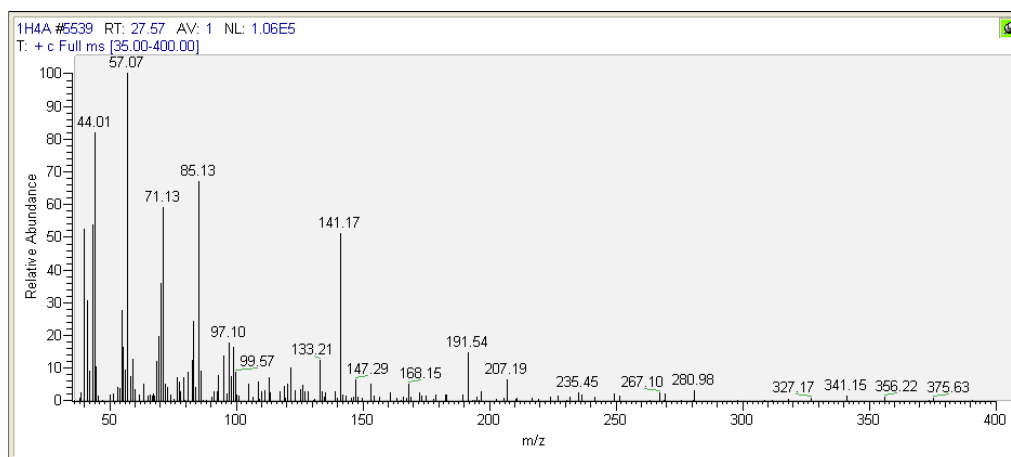
Εικόνα 8: Χαρακτηριστικό αεριοχρωματογράφημα των πτητικών ουσιών της δεύτερης επανάληψης, εβδομάδα 19-22/05.

Με μια πρώτη ανάγνωση των Πινάκων 5 και 6, αλλά και των Εικόνων 5 και 6, παρατηρείται μια σχετική ομοιομορφία των πτητικών ουσιών κατά τις δυο επαναλήψεις μέχρι το εικοστό περίπου λεπτό, η οποία επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία σε ένα σημαντικό ποσοστό, ενώ έπειτα, και κατά τη δεύτερη επανάληψη παρατηρήθηκε μια ομάδα σεσκιτερπενίων με χαρακτηριστική αλυσίδα δεκαπέντε ανθράκων ($C_{15}H_{24}$), να κυριαρχεί των υπόλοιπων πτητικών ουσιών.

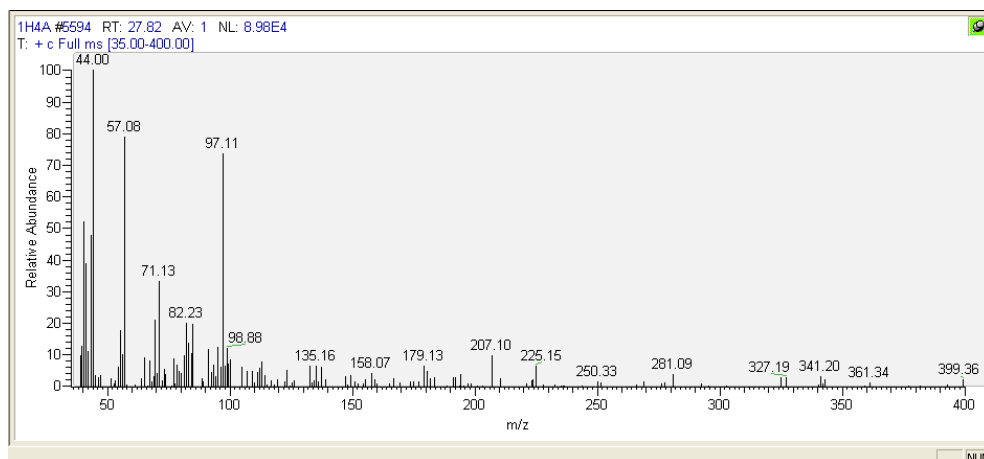
Για τους υδρογονάνθρακες που δεν ταυτοποιήθηκαν από τις βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, παρατίθενται τα φάσματα μαζών τους στις Εικόνες 9 έως 11:



Εικόνα 9: Φάσμα μάζας του υδρογονάνθρακα στο χρόνο 23.55.

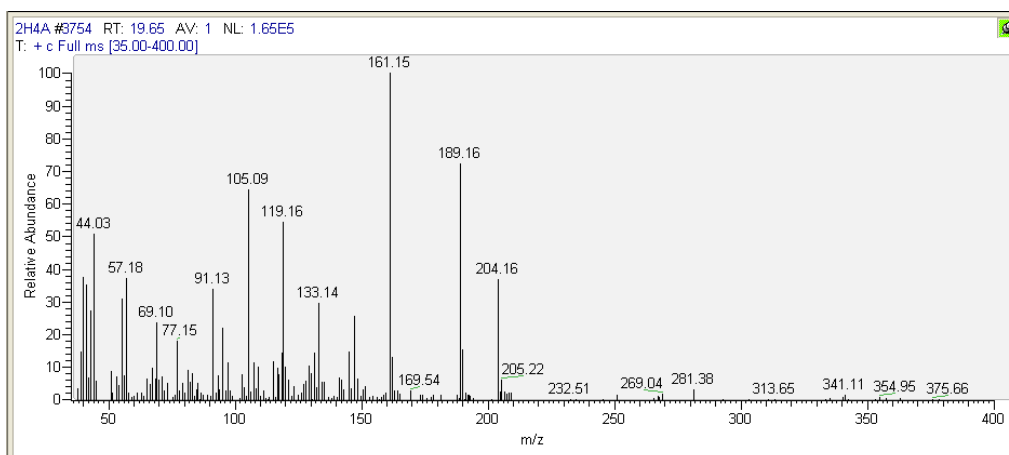


Εικόνα 10: Φάσμα μάζας του υδρογονάνθρακα στο χρόνο 27.55.

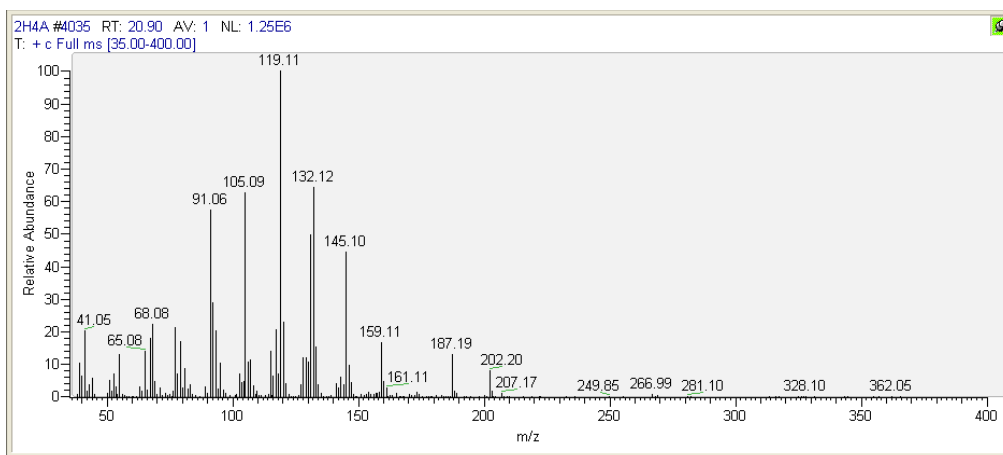


Εικόνα 11: Φάσμα μάζας του υδρογονάνθρακα στο χρόνο 27.80.

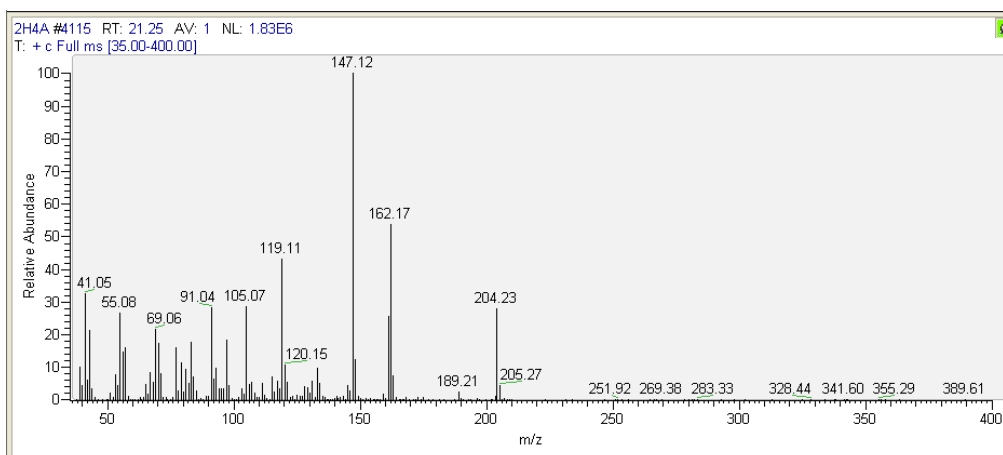
Για τις "μη ταυτοποιημένες ουσίες" (unidentified compounds) παρατίθενται τα φάσματα μάζων τους στις Εικόνες 12 έως 19:



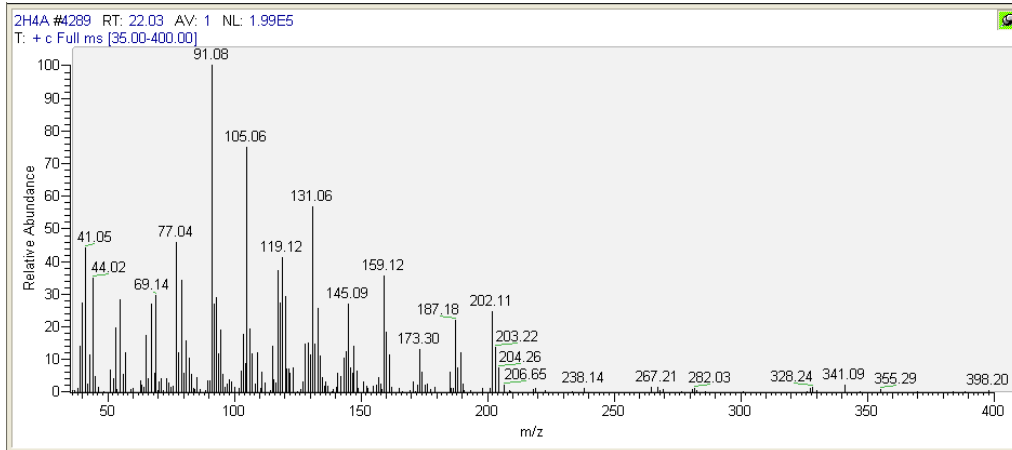
Εικόνα 12: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 19.65.



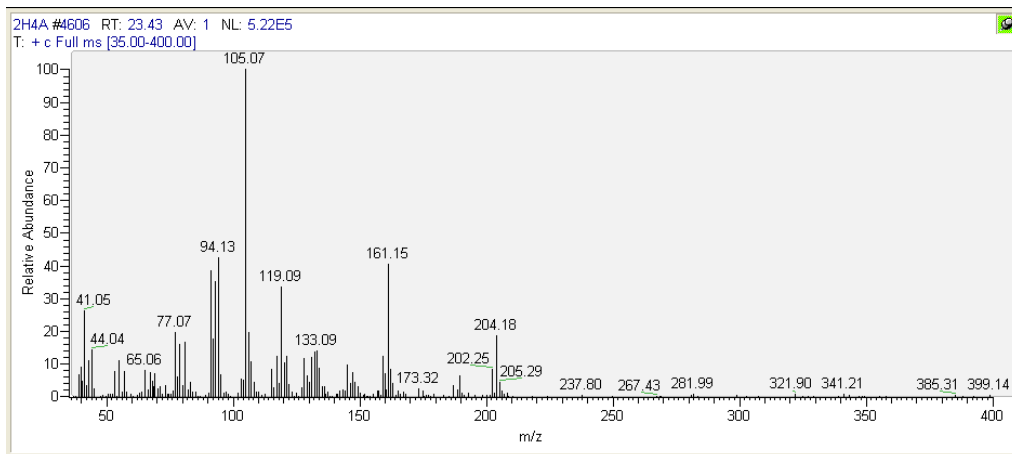
Εικόνα 13: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 20.90.



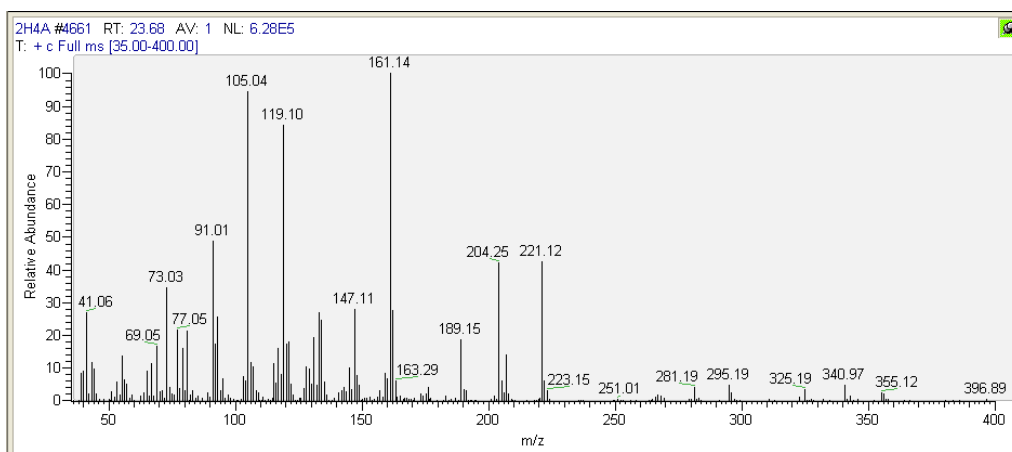
Εικόνα 14: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 21.25.



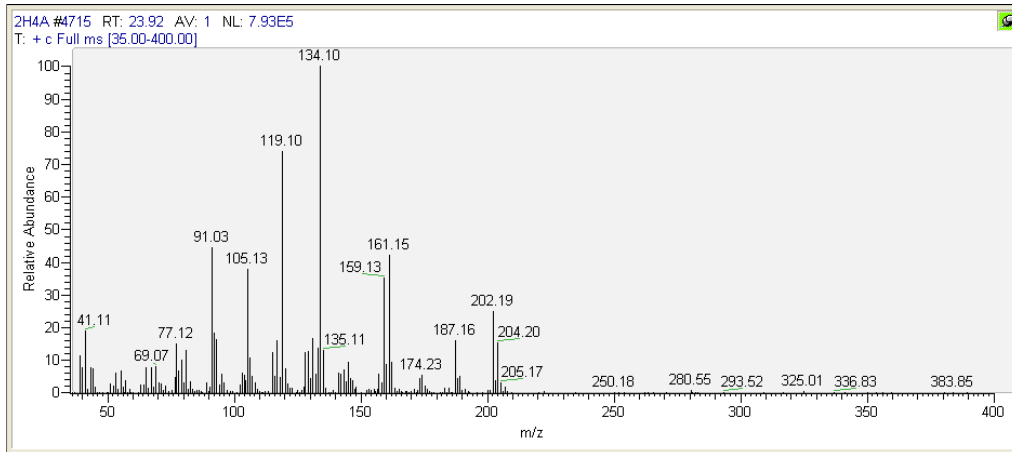
Εικόνα 15: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 22.05.



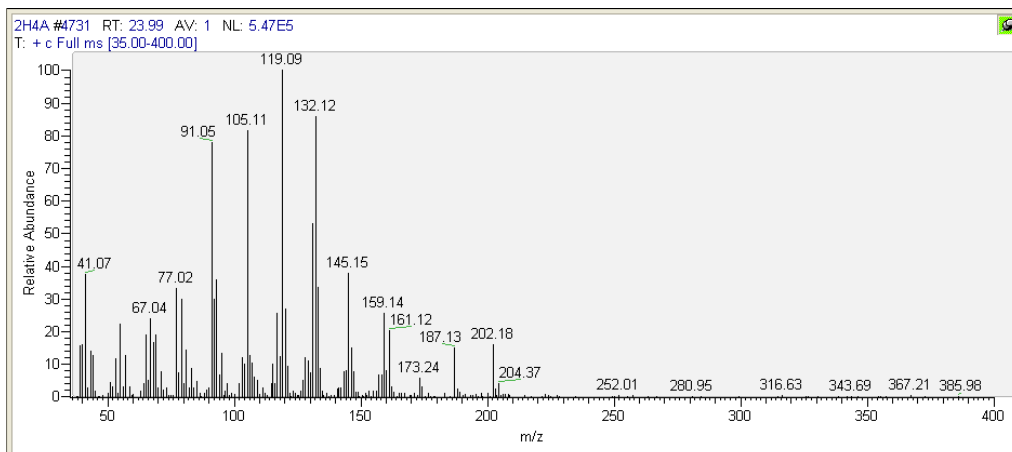
Εικόνα 16: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 23.45.



Εικόνα 17: Φάσμα μάζας της "μη ταυτοποιημένης ουσίας" στο χρόνο 23.70.



Εικόνα 18: Φάσμα μάζας της “μη ταυτοποιημένης ουσίας” στο χρόνο 23.95.



Εικόνα 19: Φάσμα μάζας της “μη ταυτοποιημένης ουσίας” στο χρόνο 24.00.

Με σκοπό την αποδοτικότερη και σε βάθος ανάλυση των αποτελεσμάτων, οι πτητικές ουσίες θα εξετασθούν χωριστά και σε τρία κομμάτια. Το πρώτο κομμάτι θα αφορά τις κοινές ουσίες των δύο επαναλήψεων των δύο δειγματοληπτικών εβδομάδων και αποτελούν το κύριο πτητικό προφίλ, το δεύτερο κομμάτι θα αποτελείται από τις μη κοινές πτητικές ουσίες των δυο επαναλήψεων, και το τρίτο θα αφορά την ομάδα των σεσκιτερπενίων (3 μονάδων ισοπρενίου) που ανιχνεύτηκαν κατά τη δεύτερη δειγματοληψία.

Τέλος για το ποσοτικό κομμάτι των αναλύσεων θα επιλεγθούν κάποιες ουσίες οι οποίες έδειξαν σημαντικές ποσοτικές διαφοροποιήσεις κατά την πάροδο της συντήρησης, και θα εξετασθούν προκειμένου να συσχετισθούν με την πρόοδο της αλλοίωσης.

3.3.1. Κυρίως πτητικό προφίλ του αχινού

Το πρώτο κομμάτι, στο οποίο χωρίστηκαν οι πτητικές ουσίες, το κυρίως πτητικό προφίλ των ουσιών, αποτελείται από τις κοινές ουσίες που βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα, σε όλες τις επαναλήψεις, και τις δυο βδομάδες που διήρκησε το κυρίως πείραμα, και συνοψίζεται στον παρακάτω Πίνακα 9:

RT (±)	COMPOUND
03.93	1-Butanol
06.02	Toluene
07.93	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone
08.44	Ethylbenzene
08.70	p-Xylene
10.33	α-Pinene
10.85	Camphene
11.64	β-Pinene
11.81	6-Methyl-5-hepten-2-one / β-Myrcene
11.99	Decane
12.14	1,2,4-trimethyl-Benzene
12.93	p-Cymene
13.01	Limonene
13.16	Eucalyptol
13.79	γ-Terpinene
14.65	Undecane
14.85	Linalool
16.99	1-Dodecene
17.17	Dodecane
17.57	Decanal
19.55	Menthyl acetate

Πίνακας 9: Το κυρίως πτητικό προφίλ του αχινού, που περιλαμβάνει τις κοινές ουσίες των δύο επαναλήψεων.

Η 1-Butanol (1-βουτανόλη) είναι μια αλκοόλη, και όπως οι περισσότερες αλκοόλες, έτσι και αυτή αποτελεί ένδειξη οξείδωσης των ιστών του αχινού (Oliás et. al., 1993). Επίσης έχει βρεθεί στις καρβίδες (Vejarham et. al., 1988) αλλά και στους αχινούς (Rodríguez-Bernaldo et. al., 2001).

Το Toluene (τολουόλιο) ή Methylbenzene, είναι ένας αρωματικός υδρογονάνθρακας ο οποίος πιθανώς να μην προέρχεται καθαυτός από τον αχινό, ως προϊόν μεταβολισμού ή αλλοίωσης, αλλά από το περιβάλλον του, καθώς χρησιμοποιείται ως διαλύτης σε καύσιμα και βαφές (Jörg et. al., 2005), ενώ προέρχεται από το μαζούτ και γενικώς την επεξεργασία πετρελαιοειδών. Έχει

βρεθεί ξανά στον αχινό από τους Phillips et. al. το 2010, και πιθανότατα προέρχεται από κάποια ανθρώπινη δραστηριότητα, όπως για παράδειγμα κάποιο παρακείμενο ναυπηγείο κοντά στη ζώνη δειγματοληψίας.

Η 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone ή Diacetone alcohol (διακετοναλκοόλη), χρησιμοποιείται κυρίως ως διαλύτης σε προϊόντα καθαρισμού μεταλλικών ή συντήρησης ξύλινων επιφανειών, αλλά και σε βαφές (Http⁵), συνεπώς, όπως και το τολουόλιο, πιθανώς να βρέθηκαν στα δείγματα λόγω των παρακείμενων ναυπηγείων. Έχει βρεθεί σε αχινού από τους Rodríguez-Bernaldo et. al. το 2001.

Οι ίδιοι είχαν ταυτοποιήσει το Ethylbenzene (αιθυλοβενζόλιο) στα δείγματα τους, έναν αρωματικό υδρογονάνθρακα (κυκλικός), ο οποίος βρίσκεται ως ενδιάμεσο προϊόν στην παραγωγή του πλαστικού polystyrene, που επίσης μπορεί να παρασκευαστεί και από το τολουόλιο (Yashima et. al., 1972). Και αυτό συναντάται στις βαφές και στα μελάνια (ATSDR, 2010).

Μια άλλη ουσία που ταυτοποίησαν οι Rodríguez-Bernaldo et. al. (2001), είναι το Xylene (ξυλόλιο). Το p-ξυλόλιο που ταυτοποιήθηκε στην πρώτη επανάληψη ή το ισομερές του, 1,2-Dimethylbenzene ή o-Xylene (o-ξυλόλιο), που ταυτοποιήθηκε κατά τη δεύτερη επανάληψη, βρίσκεται όπως και το τολουόλιο και το αιθυλοβενζόλιο στο μαζούτ, ενώ είναι πρόδρομος των μονομερών που συντελούν στην κατασκευή του polyethylene terephthalate ή PET (Clark & Luthy, 1955), συνεπώς ούτε αυτή η ουσία αποτελεί προϊόν μεταβολισμού ή αλλοίωσης των ιστών του αχινού.

Το α-Pinene (α-πινένιο), όπως και το β-Pinene (β-πινένιο) που συναντάται παρακάτω στον Πίνακα 9, ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων. Έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους φυτικούς οργανισμούς σε κάποια δάση, καθώς επίσης και στα πεύκα και στους φλοιούς των πορτοκαλιών και των λεμονιών, ενώ υπάρχει αξιοσημείωτη ποσότητά τους στην ατμόσφαιρα (Neuenschwander, 2010; Neuenschwander, 2011).

Το Camphene (καμφένιο) είναι και αυτό ένα τερπένιο, καθώς πρόκειται προϊόν καταλυτικού ισομερισμού του α-πινένιο. Μαζί με τα δυο ισομερή του πινένιου, το καμφένιο, προσδίδει μια μυρωδιά που έχει χαρακτηριστεί ως ξύλινη, πεύκου, μέντας και φλούδας πορτοκαλιού και λεμονιού (Http⁶), ενώ χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων.

Στην επόμενη θέση του Πίνακα 9, βρίσκονται μαζί δυο ουσίες, η 6-Methyl-5-hepten-2-one (6-Μέθυλο-5-επτέν-2-ονη) και το β-Myrcene (β-μυρκένιο). Τοποθετήθηκαν μαζί καθώς κατά τη διάρκεια της πρώτης επανάληψης υπήρχε ταυτόχρονη παρουσία των δυο ουσιών. Πιο συγκεκριμένα κατά την πρώτη ημέρα ανάλυσης μέχρι τα μισά της δεύτερης, το β-μυρκένιο επικρατούσε σε

συγκέντρωση της 6-Μέθυλο-5-επτάνιο-2-ονης, ενώ με την πάροδο του χρόνου αντιστράφηκε, και η 6-Μέθυλο-5-επτάνιο-2-ονη κατέληξε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με το β-μυρκένιο. Κατά την δεύτερη επανάληψη το β-μυρκένιο ήταν απόν ή πλήρως επικαλυπτόμενο από τη 6-Μέθυλο-5-επτάνιο-2-one.

Η 6-Μέθυλο-5-επτάνιο-2-one, όπως και τα ισομερή του πινένιου και του καμφένιου, είναι τερπένιο και βρίσκεται στα εσπεριδοειδή (Http⁷), καθώς επίσης χρησιμοποιείται και αυτό στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο γεύσης. Έχει βρεθεί σε δείγματα αχινού το 2001 από τους Rodríguez-Bernaldo et. al.

Το β-μυρκένιο, ή σκέτο μυρκένιο, ακόμα ένα τερπένιο και ουσία του αρώματος, έχει βρεθεί σε φυτικούς οργανισμούς εκτός υδάτινης στήλης (Behr & Johnen, 2009). Παρόλα αυτά παράγεται φυσικά στους ιστούς φυτικών οργανισμών μέσω της διαδικασίας παραγωγής του Geranyl pyrophosphate ή GPP (Dewick, 2002). Συγκεκριμένα τα Dimethylallyl pyrophosphate και Isopentenyl pyrophosphate ενώνονται και σχηματίζουν το GPP, το οποίο ισομερίζεται σε Linalyl pyrophosphate (OPP). Κατά τον ισομερισμό αυτόν απελευθερώνεται το pyrophosphate και κατά τη δημιουργία του διπλού δεσμού απελευθερώνεται το μυρκένιο (Dewick, 2002), το οποίο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία αρωμάτων.

Το Decane (δεκάνιο) είναι ακόμα μια ουσία που βρίσκεται στα πετρελαιοειδή (Http⁸) και έχει βρεθεί επίσης ως ουσία του αρώματος στα καφέ φύκη (Awad et. al., 2009). Η παρουσία τους στις γονάδες του αχινού πιθανώς να προέρχεται από την τροφή του αχινού ή να σχετίζεται με ανθρώπινες δραστηριότητες στην περιοχή δειγματοληψίας.

Ο επόμενος αρωματικός υδρογονάνθρακας είναι το 1,2,4-τριμεθυλοβενζόλιο. Βρίσκεται στη λιθανθρακόπισσα και στο αργό πετρέλαιο (Griesbaum et. al., 2002) και μπορεί να παραχθεί μέσω μεθυλίωσης του τολουόλιου και του ξυλένιου. συνιστά μια ουσία που πιθανώς οφείλεται επίσης σε ανθρώπινη δραστηριότητα και όχι φυσική ουσία του αρώματος του αχινού.

Το p-Cymene (κυμένιο) που ακολουθεί στον Πίνακα 9, είναι μια ουσία που έχει βρεθεί σε αρκετά φυτικά έλαια, όπως του κυμίνου και του θυμαριού, ενώ σημαντικές ποσότητες εκλύονται στην ατμόσφαιρα από τα τερπένια που περιέχονται στα ξύλα κατά τη διάρκεια της πολυτοποίησης τους (Bennett et. al., 1982).

Το Limonene (λιμονένιο) που ακολουθεί είναι ένας υδρογονάνθρακας που κατατάσσεται στα τερπένια. Έχει άρωμα πορτοκαλιών και λεμονιών (Fahlbusch et. al., 2003) και παράγεται από τα εσπεριδοειδή, ενώ χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων, σε καθαριστικά προϊόντα αλλά και στην αρωματοποιία ως αρωματικό

πρόσθετο. Έχει ξαναβρεθεί ως ουσία του αρώματος στον αχινό σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις (Rodríguez-Bernaldo et. al., 2001; Phillips et. al., 2010; Niimi et. al., 2010).

Η επόμενη ουσία, η Eucalyptol (ευκαλυπτόλη) είναι κυκλοεθαίρας και μονοτερπένιο. Βρίσκεται ως ουσία του αρώματος σε πάρα πολλούς φυτικούς οργανισμούς, όπως ο ευκάλυπτος και το τσάι. Όπως και τα υπόλοιπα τερπένια που έχουν αναφερθεί χρησιμοποιούνται γενικά στη βιομηχανία ως αρωματικά πρόσθετα (Boland et. al., 1991). Η ευκαλυπτόλη έχει εντοπιστεί ξανά σε δείγματα αχινών από τους Niimi et. al. το 2010.

Το γ-Terpinene (τερπινένιο) βρίσκεται σε μια ποικιλία φυτικών ιστών. Είναι ένα τερπένιο, το οποίο μαζί με τα ισομερή του χρησιμοποιούνται ευρέως ως αρωματικά πρόσθετα σε διάφορα προϊόντα όπως τρόφιμα και φάρμακα (Dewick, 2009).

Η Undecane (ενδεκάνιο) που ακολουθεί είναι ένας υδρογονάνθρακας που σε αντίθεση με τις παραπάνω ουσίες δεν συναντάται ούτε στα πετρελαιοειδή, ούτε σε φυτικούς οργανισμούς της ξηράς. Έχει βρεθεί ότι εκλύεται από διάφορα έντομα, όπως τα μυρμηγκία και τους σκώρους (Hölldobler, 1990), αλλά και τα καφέ φύκη που μπορεί να αποτελούν τροφή του εξεταζόμενου είδους (Awad et. al., 2009).

Η Linalool ή Linalyl alcohol (λιναλοόλη), είναι επίσης ένα τερπένιο που συναντάται ευρέως στο φυτικό βασίλειο, από τα εσπεριδοειδή έως τη μέντα και τη κανέλλα (Http⁹). Παράγεται από ένζυμα, τις λεγόμενες συνθετάσες μονοτερπενίων (LIS) σε φυτικούς ιστούς ανωτέρων φυτών, κατά τη διάρκεια παραγωγής GPP. Χρησιμοποιείται όπως τα υπόλοιπα τερπένια, ως φυσικό αρωματικό πρόσθετο, σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες (Http⁹).

Η επόμενη ουσία προέρχεται από το αιθυλένιο, και είναι το 1-Dodecene (δωδεκένιο). Χρησιμοποιείται ευρέως σε σκευάσματα λιπαντικών ουσιών αλλά και καθαριστικών (Http¹⁰) και η παρουσία του στα δείγματα αχινών μπορεί να συσχετισθεί με ανθρωπογενή δραστηριότητα.

Το Dodecane (δωδεκάνιο) που ακολουθεί είναι ένας υδρογονάνθρακας που χρησιμοποιείται ως διαλύτης στη βιομηχανία χαρτιού και ξύλου (Rydberg et. al., 2004). Επίσης έχει αναφερθεί ως πτητική ουσία σε διάφορα πράσινα και καφέ άλγη από τους Yamamoto et. al. το 2014 και τους Awad et. al. το 2009, αντίστοιχα.

Η Decanal (δεκανάλη) που είναι επόμενο στον Πίνακα 9, έχει εντοπισθεί ξανά σε δείγματα αχινών από τους Niimi et. al. το 2010, και από τους Rodríguez-Bernaldo et. al. το 2001. Είναι η πιο απλή μορφή αλδεΐδης και συναντάται σε μεγάλες ποσότητες στα εσπεριδοειδή μαζί με την οκτανάλη, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω (Janes et. al., 2008). Έχει ταυτοποιηθεί στα είδη *Padina ravnoria* και *Hydroclathrus clathratus*, που αποτελούν καφε φύκη (Awad et. al., 2009).

Τέλος το Menthyl acetate (οξικό μενθύλιο), είναι ένας εστέρας και συναντάται σε φυτικούς οργανισμούς, όπως η μέντα. Χρησιμοποιείται επίσης ως πρόσθετο γεύσης και αρώματος (Egan et. al., 2015).

Τελειώνοντας το πρώτο κομμάτι της ανάλυσης, παρατηρείται, ότι οι ουσίες που ταυτοποιήθηκαν βρίσκονται είτε σε προϊόντα που προέρχονται από πετρελαιοειδή, και των οποίων η παρουσία δεν συσχετίζεται με τις βιολογικές διεργασίες του αχινού, είτε σε φυτικούς οργανισμούς, που πιθανών να αποτελούν τροφή του εξεταζόμενου είδους, όπως τα πράσινα και τα καφέ φύκη. Παρακάτω αναλύονται οι ουσίες που βρέθηκαν στην πρώτη, ή στη δεύτερη επανάληψη.

3.3.2. Δευτερεύον πτητικό προφίλ αχινού

Το δευτερεύον πτητικό προφίλ των αχινών αποτελείται από ουσίες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε μια από τις δύο επαναλήψεις. Συνοπτικά οι ουσίες παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 10:

RT (±)	COMPOUND	WEEK
09.15	Methane tribromo (tribromoacetic acid)	2 nd
09.23	Nonane	1 st
12.30	3,7-dimethyl-2,4-octadiene	2 nd
12.34	Octanal	1 st
13.70	Dihydromyrcenol	2 nd
14.80	α-Thujone	2 nd
15.10	β-Thujone	2 nd
15.57	Fenchol	1 st
15.86	cis-Limonene oxide	1 st
15.97	trans-Limonene oxide	1 st
16.10	Menthone	2 nd
16.35	iso-Menthone	2 nd
16.39	Camphor	1 st
18.46	Linalyl acetate	1 st
19.96	Tridecane	1 st
21.64	1-Tetradecene	1 st
21.79	Tetradecane	1 st
22.60	6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one (Neryl acetone)	2 nd
23.08	6,10-dimethyl-5,9-Undecadien-2-one (geranyl acetone)	1 st
23.53	Hydrocarbon	1 st
24.49	2,6,11,15-tetramethyl hexadecane (crocetane)	1 st
27.57	Hydrocarbon	1 st
27.81	Hydrocarbon	1 st

Πίνακας 10: Το δευτερεύον πτητικό προφίλ των αχινών, το οποίο αποτελείται από ουσίες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε μια από τις δύο δειγματοληπτικές εβδομάδες.

Οι τρεις αλειφατικοί υδρογονάνθρακες (Aliphatic Hydrocarbon) που υπάρχουν στο τέλος του Πίνακα 10, έχουν ήδη παρουσιαστεί παραπάνω μέσω των φασμάτων μάζας τους (Εικόνες 8-10). Ο λόγος που παρατέθηκαν σε εκείνο το σημείο, όπως αναφέρθηκε, είναι η αδυναμία που υπήρχε στις βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών του εργαστηρίου να τα αναγνωρίσει και να τα ταυτοποιήσει. Συνεπώς δε θα υπάρξει αναφορά τους σε αυτό το σημείο ή παρακάτω.

Η πρώτη ουσία της λίστας είναι το Methane tribromo (τριβρωμομεθάνιο), το οποίο αποτελεί ένα ενδιαφέρον εύρημα, όσον αφορά τον αχινό, καθώς οι Oshiro et. al. το 1999 συσχέτισαν την ουσία αυτή με την αναπαραγωγική περίοδο των αχινών του είδους *Stroglyocentrotus nudus*. Η ουσία αυτή βρέθηκε στην δεύτερη επανάληψη, 19-22/05/2017, που σε συμφωνία με τη Σταμούλη (2012) τοποθετείται η αναπαραγωγική περίοδος του εξεταζόμενου είδους. Επίσης το τριβρωμομεθάνιο εκλύεται από διάφορα φύκια τα οποία πιθανώς αποτελούν τροφή του εξεταζόμενου αχινού.

Η ουσία Nonane (εννεάνιο) βρέθηκε στην πρώτη επανάληψη. Είναι ένας υδρογονάνθρακας που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των καυσίμων, είτε ως καύσιμη ύλη σε σόμπες είτε ως καύσιμο jet (Http¹¹). Παρόλα αυτά έχει ταυτοποιηθεί από τους Awad et. al. το 2009, σε καφέ φύκη.

Επόμενη ουσία είναι το 3,7-dimethyl-2,4-octadiene (3,7-διμέθυλο-2,4-οκταδιένιο) που βρέθηκε κατά τη δεύτερη επανάληψη. Έχει βρεθεί σε δείγματα σταφυλιών (Http¹⁷) και είναι υδρογονανθρακας.

Η Octanal (οκτανάλη) που αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι μια αλδεΐδη που βρίσκεται, όπως και η δεκανάλη, στα εσπεριδοειδή. Βρέθηκε κατά την πρώτη επανάληψη, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο και έχει ξαναβρεθεί σε δείγματα αχινού από τους Fahmy et. al. το 1983.

Η Dihydromyrcenol (διυδρομυρκενόλη) που ακολουθεί χρησιμοποιείται επίσης ως πρόσθετο γεύσης στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στα αρώματα. Βρέθηκε κατά τη δεύτερη επανάληψη και είναι ακόμα μια τερπενοειδής αλκοόλη που συναντάται στα εσπεριδοειδή (Http¹²).

Τα ισομερή α- και β- της Thujone (θουγιόνη) που ακολουθούν, βρέθηκαν επίσης στη δεύτερη επανάληψη, είναι κετόνες, και βρίσκονται σε διάφορους φυτικούς οργανισμούς, όπως το φασκόμηλο (Perry et. al., 1999).

Ένα ακόμα τερπένιο που ταυτοποιήθηκε είναι το Fenchol ή 1,3,3-trimethyl-2-norbornanol (1,3,3-τριμέθυλο-2-νοβορνανόλη). Βρέθηκε στην πρώτη επανάληψη των αναλύσεων ενώ συνήθως συναντάται στον βασιλικό (Http¹³).

Οι επόμενες δύο ουσίες που ταυτοποιήθηκαν είναι τα ισομερή cis- και trans-Limonene oxide (cis- και trans- οξειδία του λιμονένιου) τα οποία βρέθηκαν στην

πρώτη επανάληψη. Αποτελούν οξειδία του λιμονένιου που βρέθηκε και στις δυο δειγματοληπτικές εβδομάδες, και πιθανώς η ύπαρξη τους οφείλεται στην αλλοίωση του προϊόντος του αχινού, καθώς δεν εντοπίστηκαν αρχικά αλλά κατά τη διάρκεια της αντίστοιχης εβδομάδας, όπως θα αναλυθεί στο ποσοτικό κομμάτι αργότερα. Χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα γεύσης και έχουν άρωμα μέντας (Http¹⁴).

Οι ουσίες Menthone (μενθόνη) και iso-Menthone (ισο-μενθόνη) είναι ισομερή μονοτερπένια και κετόνες που χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία λόγω της έντονης μυρωδιάς μέντας που έχουν (Read 1930). Έχουν βρεθεί στη μέντα, στο καλαμπόκι και σε άλλους φυτικούς οργανισμούς, ενώ στο προκείμενο πείραμα εντοπίστηκαν στην δεύτερη επανάληψη.

Επόμενη ουσία στον Πίνακα 10, είναι το Camphor (καμφορά). Είναι επίσης μονοτερπένιο και βρέθηκε κατά τη πρώτη επανάληψη. Συναντάται σε φυτικούς οργανισμούς και χρησιμοποιείται ως φυσικό αρωματικό πρόσθετο (Lincoln & Lawrence, 1984).

Η ουσία Linalyl acetate (οξικός λιναλυλεστέρας) που ακολουθεί είναι εύρημα της πρώτης επανάληψης, το οποίο συναντάται σε διάφορα λουλούδια και μπαχαρικά (Http¹⁵). Αποτελεί ακόμα μια ουσία που πιθανώς εμφανίζεται λόγω αλλοίωσης, μαζί με τα οξειδία του λιμονένιου, καθώς είναι εστέρας της λιναλόλης που ταυτοποιήθηκε και τις δυο δειγματοληπτικές εβδομάδες και αναλύθηκε παραπάνω. Όπως και τα οξειδία του λιμονένιου, ο οξικός λιναλυλεστέρας, δεν εμφανίστηκε από την αρχή της δειγματοληπτικής εβδομάδας όταν το προϊόν ήταν φρέσκο, αλλά μετέπειτα στην πορεία των δειγματοληψιών. Περισσότερη ανάλυση του θα γίνει στο ποσοτικό κομμάτι παρακάτω.

Οι παρακάτω ουσίες, ταυτοποιήθηκαν μόνο κατά την πρώτη εβδομάδα δειγματοληψιών, καθώς τη δεύτερη εβδομάδα η παρουσία της ομάδας των σεσκιτερπενίων ($C_{15}H_{24}$), υπερκάλυπτε όποια άλλη πτητική ουσία θα μπορούσε να βρεθεί. Συνεπώς δεν αποκλείεται η παρουσία των ουσιών αυτών και κατά τη δεύτερη δειγματοληπτική εβδομάδα, παρ' όλο που δεν εντοπίστηκαν.

Η πρώτη ουσία είναι το Tridecane (δεκατριάνιο). Είναι ένας υδρογονάνθρακας που συναντάται ως συστατικό αρκετών καυσίμων, καθώς επίσης και ως αμυντικός μηχανισμός σε κάποια είδη εντόμων (Davidson, 2002). Έχει αναφερθεί και ως πτητική ουσία σε κάποια είδη φυκών που αποτελούν τροφή του αχινού (Yamamoto et. al., 2014).

Επόμενη ουσία στον Πίνακα 10 είναι το 1-Tetradecene (1-δεκατετρένιο), το οποίο ανήκει στις ακυκλικές αλεφίνες. Χρησιμοποιείται σε λιπαντικά και ως ρυθμιστής ρευστότητας (Http¹⁶). Προέρχεται από το αιθυλένιο, συνεπώς η

παρουσία του πιθανώς σχετίζεται με την ανθρωπογενή δραστηριότητα της περιοχής.

Το Tetradecane (δεκατετράνιο) έχει αναφερθεί ως ουσία του αρώματος σε κάποια είδη πράσινων αλλά και καφέ φυκών που αποτελούν τροφή του εξεταζόμενου είδους (Yamamoto et. al. 2014; Awad et. al., 2009).

Επόμενες ουσίες στον Πίνακα 10 είναι δυο ισομερή, η Neryl acetone και η Geranyl acetone ή 6,10-dimethyl-5,9-Undecadien-2-one (6,10-διμέθυλο-5,9-ενδεκαδιένιο-2-ονη). Είναι δυο ισομερή που βρίσκονται στα καρότα και την πιπερόριζα, είναι και οι δύο ακετόνες και έχουν φρουτώδες άρωμα. Επίσης χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των τροφίμων ως πρόσθετα αρώματος (Http¹⁸).

Τελευταία ουσία στον Πίνακα 10 είναι το 2,6,11,15-tetramethyl hexadecane ή crocetane (2,6,11,15-τετραμέθυλο δεκαεξάνιο). Είναι ένας υδρογονάνθρακας που βρίσκεται σε ιζήματα και γεωλογικά δείγματα, ενώ χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης που συνδέεται με την αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (Robson & Rowland 1993). Αποτελεί ακόμα ένα πιθανό προϊόν της αλλοίωσης που προκαλείται στον αχινό, καθώς ούτε αυτή η ουσία εμφανίζεται εξ αρχής, που το προϊόν ήταν φρέσκο, αλλά κατά την πορεία της συντήρησης.

Όπως και στο πρώτο κομμάτι της ανάλυσης, έτσι και στο δεύτερο που μόλις ολοκληρώθηκε, τα τερπένια είχαν σημαντική παρουσία στις πτητικές ουσίες, πιθανώς λόγω τροφής, ενώ υπήρχαν και κάποιες ουσίες οι οποίες βρίσκονται σε πετρελαιοειδή, και πιθανώς να προέρχονται από την ανθρωπογενή δραστηριότητα της περιοχής. Τα τερπένια που ταυτοποιήθηκαν, είτε κετόνες είτε αλκοόλες, που αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δυο πρώτα μέρη των αποτελεσμάτων, ως επί το πλείστον συναντώνται σε φυτικούς οργανισμούς, της ξηράς, παρόλα αυτά δεν αποκλείεται η παρουσία τους σε υδρόβιους φυτικούς οργανισμούς, όπως τα πράσινα και τα καφέ άλγη, τα οποία, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν προτιμητή τροφή του εξεταζόμενου είδους, αλλά δεν υπάρχουν αναφορές που να υποδεικνύουν ύπαρξη τους στην αλιευτική ζώνη Ι, από όπου πάρθηκαν οι αχίνοι που μελετήθηκαν.

3.3.3. Η πτητική ομάδα των σεσκιτερπενίων

Η συγκεκριμένη πτητική ομάδα τοποθετήθηκε στο τρίτο ξεχωριστό κομμάτι της ανάλυσης των αποτελεσμάτων, καθώς υπερκαλύπτει όποια άλλη πτητική ουσία θα μπορούσε να υπάρχει μετά το εικοστό λεπτό της ανάλυσης κατά τη δεύτερη δειγματοληπτική εβδομάδα των ουσιών του αρώματος. Η ομάδα αυτή αποτελείται από μια πληθώρα ισομέρων με χαρακτηριστική αλυσίδα τριών ομάδων ισοπρενίου

C₁₅H₂₄. Στον παρακάτω Πίνακα 11 παρουσιάζονται όλες οι ουσίες της ομάδας αυτής, καθώς και η σχηματική τους απεικόνιση, με εξαίρεση τις ουσίες που αναφέρονται ως "μη ταυτοποιημένες ουσίες" (Unidentified compound). Αυτές οι ουσίες που δεν ήταν δυνατό να αναγνωριστούν και να ταυτοποιηθούν παρατέθηκαν με τα φάσματα μαζών τους στην αρχή των αποτελεσμάτων, συνεπώς δε θα υπάρξει ανάλυση τους παρακάτω.

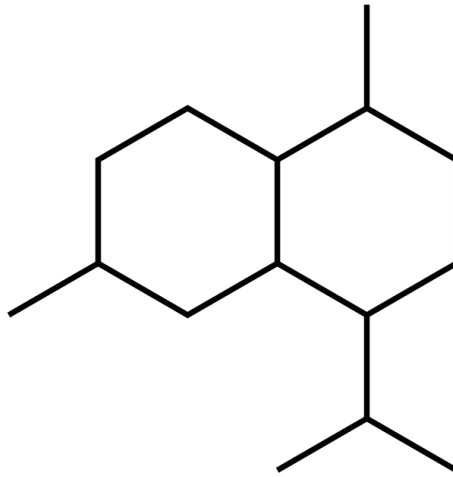
RT (±)	COMPOUND	STRUCTURE
19.65	Unidentified compound	
20.45	α-Cubebene	
20.90	Unidentified compound	
21.00	α-Ylangene	
21.15	α-Copaene / α-Bourbonene	
21.25	Unidentified compound	
21.40	β-Bourbonene	
22.05	Unidentified compound	
22.10	Rotundene	
22.45	β-Copaene	
22.75	cis-Muurolo-3,5-diene	
22.85	trans-Muurolo-3,5-diene	
23.00	cis-Cadina-1(6),4-diene	
23.15	cis-Muurolo-4(14),5-diene	
23.30	trans-Cadina-1(6),4-diene	

23.45	Unidentified compound		
23.55	Germacrene D		
23.70	Unidentified compound		
23.80	trans-Murolo-4(14),5-diene		
23.95	Unidentified compound		
24.00	Unidentified compound		
24.20	δ -Cadinene		
24.35	cis-Calamenene (Zonarene)		
24.60	trans-Cadina-1,4-diene		
24.65	α -Cadinene		
24.80	α -Calacorene		
25.25	β -Calacorene		
25.70	Gleenol		
26.30	α - Corocalene		

Πίνακας 11: Η πτητική ομάδα των σεσκιτερπενίων που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Η ομάδα αυτή θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί χωριστά, διότι καθ' όλο το χρόνο που διήρκησε η δειγματοληπτική διαδικασία, συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών, του προκαταρκτικού πειράματος και των δύο δειγματοληπτικών εβδομάδων, δεν βρέθηκε, ή ταυτοποιήθηκε καμία παρόμοια ουσία, και θεωρήθηκε ότι οι ουσίες αυτές ίσως σχετίζεται με το αναπαραγωγικό στάδιο του αχινού. Η ομάδα αυτή συναντάται στα έλαια μιας πληθώρας φυτικών οργανισμών. Είναι δικυκλικά σεσκιτερπένια (Borg-Karlson et. al., 1981), σε αντίθεση με τα έως τώρα

ευρήματα που αποτελούνταν από μονοτερπένια, οξυγονουχα ή μη, καθώς και παράγωγα πετρελαίου. Η κύρια ανθρακική αλυσίδα που αποτελείται από 15 άνθρακες φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 20:



Εικόνα 20: Η κύρια ανθρακική αλυσίδα της ομάδας των σεσκιτερπενίων που βρέθηκαν στα δείγματα των αχινών της παρούσας εργασίας.

Τα σεσκιτερπένια είναι μια κατηγορία τερπενίων που αποτελείται από τρεις μονάδες ισοπρενίου και έχουν τον μοριακό τύπο $C_{15}H_{24}$. Όπως και τα μονοτερπένια, τα σεσκιτερπένια μπορεί να είναι ακυκλικά ή να περιέχουν δακτυλίους, συμπεριλαμβανομένων πολλών μοναδικών συνδυασμών. Βιοχημικές τροποποιήσεις όπως η οξείδωση ή η αναδιάταξη παράγουν τα σχετικά σεσκιτερπενοειδή όπως αυτά που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Τα σεσκιτερπένια βρίσκονται φυσικά σε φυτικούς οργανισμούς αλλά και έντομα, ως αμυντικοί μηχανισμοί ή φερομόνες σε αναπαραγωγική περίοδο (Hirokazu, 1997). Δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές που να υποδεικνύουν την ύπαρξη τους σε αχινούς, ούτε του εξεταζόμενου είδους αλλά ούτε κάποιου άλλου.

Η μόνη αναφορά που μπορεί να συσχετίσει την ύπαρξη τους με τον αχινό είναι τα β -Cubebene και Germacrene D, τα οποία έχουν βρεθεί σε καφέ άγλη από τους Awad et. al. το 2009. Τα καφέ άγλη δεν αποτελούν προτιμητή τροφή του είδους. Ωστόσο σε περίπτωση μη επαρκούς τροφής στο περιβάλλον τους ή αύξηση των διατροφικών τους αναγκών, είναι δυνατό να καταναλωθούν, καθώς ο αχινός μπορεί υπό τέτοιες συνθήκες να γίνει και παμφάγος (Σταμούλη, 2012).

Επιπρόσθετα και λαμβάνοντας υπόψιν ακόμα μια παρατήρηση της Σταμούλη (2012), ότι η διατροφικές ανάγκες του εξεταζόμενου είδους, όντως αυξάνονται την αναπαραγωγική περίοδο, τα καφέ φύκη, με τα οποία ασχολήθηκε η μελέτη των

Awad et. al. (2009), θα μπορούσαν να παρέχουν την απαραίτητη τροφή που χρειάζεται ο αχινός, ώστε να αναπαραχθεί, και συνεπώς βρέθηκαν στα δείγματα που έγιναν ανάλυση τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή, και όχι νωρίτερα.

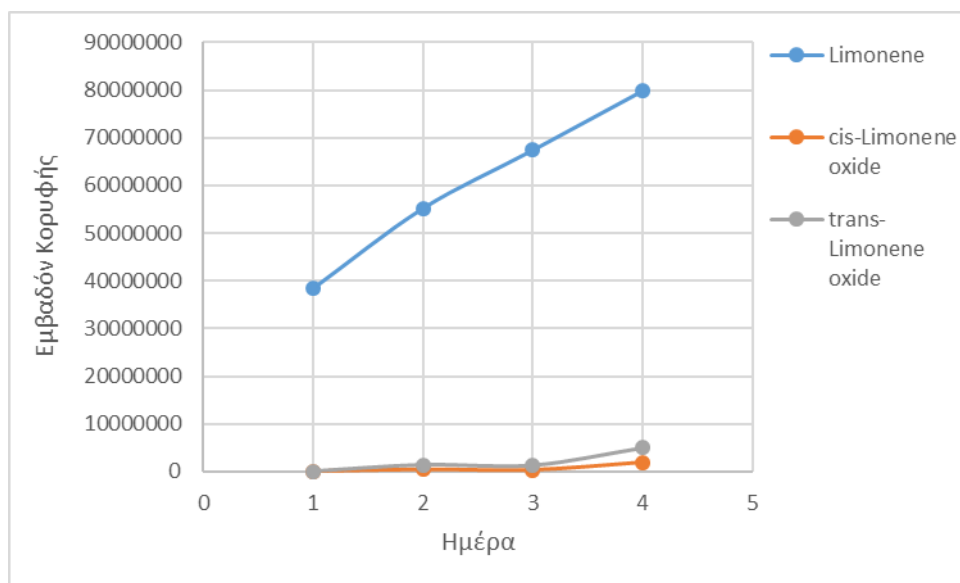
3.4. Ποσοτικές μεταβολές πτητικών ουσιών

Οι πτητικές ουσίες που επιλέχθηκαν ώστε να γίνει διερεύνηση των ποσοτικών μεταβολών κατά τη διάρκεια της συντήρησης είναι τα Limonene και Linalool, καθώς και τα παράγωγα τους cis-, trans-Limonene και Linalyl acetate αντίστοιχα.

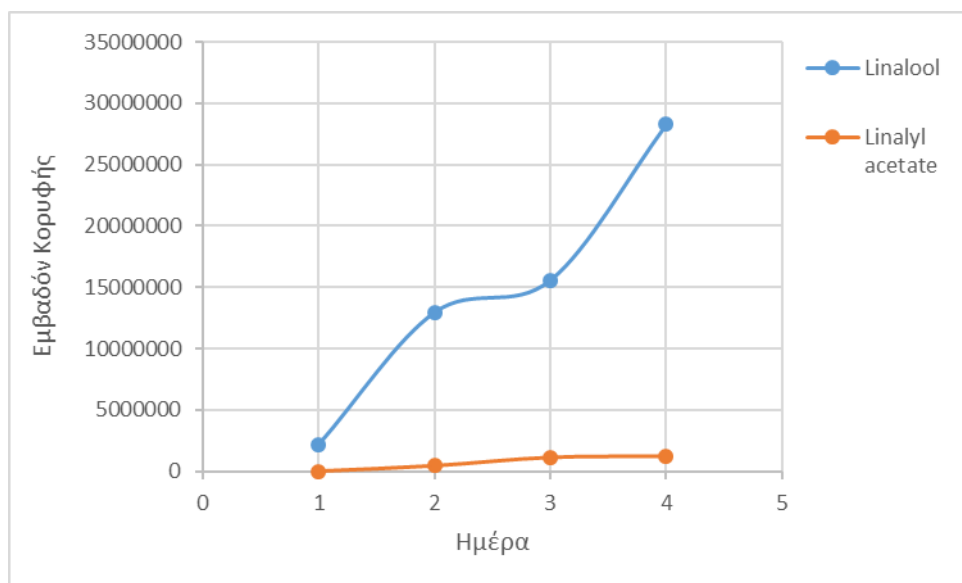
Επιλέχθηκαν αυτές οι δυο ουσίες διότι υπάρχουν σε όλα τα δείγματα ταυτόχρονα, και η αρχική ουσία αλλά και το παράγωγο της, ενώ έχουν ξαναβρεθεί σε δείγματα αχινών.

Είναι και τα δύο τερπένια, έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτικούς οργανισμούς, όπως τα εσπεριδοειδή και η λεβάντα, και πιθανώς να προέρχονται από την τροφή που συνήθως καταναλώνει ο αχινός, ενώ τα παράγωγα τους οφείλονται σε μηχανισμούς οξειδωσης και εστεροποίησης αντίστοιχα, που λαμβάνουν χώρα κατά τη πάροδο της αλλοίωσης. Η πτητικότητα τους επηρεάζεται από την θερμοκρασία κυρίως αλλά και από την υγρασία του οργανισμού (Γιαννάκη & Δαρα. 2017).

Στα παρακάτω Διαγράμματα 14 και 15 φαίνονται οι αναφερόμενες ποσοτικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του χρόνου για τις παραπάνω ουσίες:



Διάγραμμα 13: Ποσοτικές μεταβολές στη συγκέντρωση του λιμονένιου και των οξειδίων του, κατά την πάροδο του χρόνου.



Διάγραμμα 14: Ποσοτικές μεταβολές στη συγκέντρωση της λιναλόλης και του εστέρα της, κατά την πάροδο του χρόνου.

Αρχικώς στο Διάγραμμα 14 απεικονίζεται η ποσοτική μεταβολή του Limonene και των οξειδίων του κατά τη διάρκεια της συντήρησης των γονάδων του αχινού στους 4 °C.

Το Limonene βρίσκεται σε μια σημαντική ποσότητα από την πρώτη ημέρα των αναλύσεων, ενώ τα οξείδια του είναι απόντα κατά τις δυο πρώτες ημέρες. Την δεύτερη ημέρα γίνεται η εμφάνιση των cis- και trans- Limonene, τα οποία είναι ελάχιστα πάνω από το όριο ανίχνευσης. Κατά την τρίτη ημέρα φαίνεται ότι τα οξείδια παραμένουν σε μικρή συγκέντρωση αυξάνεται η συγκέντρωσή τους με πολύ μικρό ρυθμό, ενώ το Limonene συνεχίζει να αυξάνεται σημαντικά. Κατά την τέταρτη και τελευταία ημέρα η συγκέντρωση των οξειδίων έχει τετραπλασιαστεί και τριπλασιαστεί αντίστοιχα, σε σχέση με την δεύτερη ημέρα που πρωτοεμφανίστηκαν.

Στο Διάγραμμα 15 που αφορά τη συγκέντρωση του Linalool και του εστέρα του, Linalyl acetate, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του Linalool αυξάνεται, όχι όμως σταθερά, καθώς παρατηρείται κατά τη διάρκεια της δεύτερης ημέρας μείωση του ρυθμού αύξησης, ενώ αργότερα κατά τη τρίτη ημέρα της συντήρησης αποκτά σχεδόν τον ίδιο ρυθμό. Η συγκέντρωσή του στα δείγματα ξεκινά από σχετικά χαμηλή τιμή, και μέσα στις τέσσερις ημέρες που διήρκεσε η δειγματοληπτική διαδικασία, η ποσότητα αυτή είχε διπλασιαστεί.

Το Linalyl acetate εμφανίζεται προς το τέλος της δεύτερης ημέρας και αυξάνεται σημαντικά μέχρι την τρίτη ημέρα. Έπειτα διατηρεί ένα μικρό αριθμό

αύξησης της συγκέντρωσης του μέχρι την τέταρτη ημέρα που η ανάλυση έλαβε τέλος. Κατά την τέταρτη ημέρα η συγκέντρωση του Linalyl acetate στο δείγμα είναι διπλασιασθεί σε σχέση με την πρώτη ημέρα που εμφανίστηκε.

Παρατηρείται ότι όλες οι ουσίες αυξάνουν τη συγκέντρωσή τους κατά την πάροδο του χρόνου, και μελετώντας τες είναι δυνατό να προσδιοριστεί το επίπεδο αλλοίωσης ευκολότερα, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρχικώς και όσον αφορά τις μικροβιακές αναλύσεις, συγκρίνοντας τα μικροβιακά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με άλλες, φαίνεται ότι για διαφορετικές συσκευασίες και διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης, τα μικροβιακά όρια αλλοίωσης είναι διαφορετικά, όπως συζητήθηκε παραπάνω. Συνεπώς το θεσπισμένο μικροβιακό όριο των $7 \log(\text{cfu})/\text{g}$, δεν είναι αντιπροσωπευτικό για κάθε προϊόν αχινού, έτσι θεωρείται σκόπιμη η ανάδειξη άλλων μεθόδων προσδιορισμού του βαθμού αλλοίωσης.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι από την δεύτερη ημέρα οι γονάδες του αχινού είχαν αρχίσει να αποχρωματίζονται, επιπρόσθετα, και δίνοντας βάση στο ποσοτικό κομμάτι της παρούσας εργασίας, κατά την δεύτερη ημέρα παρατηρήθηκε η ύπαρξη των ουσιών cis-, trans- Limonene oxide και Linalyl acetate, οι οποίες είναι ενδεικτικές της αλλοίωσης που υφίσταται οι γονάδες, συνεπώς ένα ενδεικτικό όριο αλλοίωσης θα μπορούσε να είναι η ύπαρξη αυτών των ουσιών, και χρήσιμο εργαλείο στον εντοπισμό των ουσιών αυτών είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με τον αέριο χρωματογράφο (SPME-GC-MS).

Όσον αφορά το πτητικό προφίλ του εξεταζόμενου είδους, βγαίνει ένα βιβλιογραφικώς ασφαλές συμπέρασμα, ότι το κυρίως πτητικό προφίλ που αναλύθηκε παραπάνω είναι ορθό και αφορά πολλά είδη αχινών, ως αποτέλεσμα της κοινής βιολογίας τους, με μερικές αποκλίσεις, αναλόγως την περιοχή δειγματοληψίας, δηλαδή το περιβάλλον του αχινού, τη διαθεσιμότητα της τροφής αλλά και το αναπαραγωγικό στάδιο στο οποίο βρίσκεται.

Υπάρχουν ενδεικτικές ουσίες, όπως το Toluene και το Diacetone alcohol που πιθανώς καταδεικνύουν μικρή αλλοίωση των πτητικών συστατικών του αχινού από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, αφού ως γνωστόν υπάρχει έντονη ανθρωπογενής δραστηριότητα στον κόλπο της Σαλαμίνας. Παρατηρείται ότι οι περισσότερες ουσίες που αποτελούν κύριο κομμάτι του πτητικού προφίλ είναι τερπένια, όπως φαίνεται από την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Λόγω ανεπαρκούς βιβλιογραφίας όμως δεν είναι δυνατός ο καθορισμός της προέλευσης των περισσότερων πτητικών συστατικών, καθώς τα φύκη που αποτελούν κύρια τροφή του αχινού δεν έχουν εξεταστεί αρκετά ως προς τις πτητικές ουσίες τους, εφόσον δεν αποτελούν εμπορικώς εκμεταλλεύσιμα είδη. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι τα τερπένια προέρχονται όντως από την τροφή του αχινού, καθώς υπάρχουν σε όλους τους φυτικούς οργανισμούς.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο αχινός σε περιόδους με ανεπαρκή τροφή, ή σε περιόδους με αυξημένες διατροφικές ανάγκες, όπως η αναπαραγωγική του

περίοδος, μπορεί να γίνει παμφάγο, συνεπώς παρόλο που υπάρχουν πολλές παράμετροι που δεν είναι δυνατό να εξεταστούν, η υπόθεση ότι η ομάδα των σεσκιτερπενίων ($C_{15}H_{24}$) που εντοπίστηκε και ταυτοποιήθηκε κατά τη δεύτερη επανάληψη, συνδέεται με το αναπαραγωγικό στάδιο του αχινού, έχει λογική βάση, αλλά είναι δύσκολο να επαληθευτεί χωρίς κάποια νέα μελέτη.

Η οικονομία χρόνου της μεθόδου της μικροεκχύλιση στερεάς φάσης και η ανάλυση του δείγματος με τον αέριο χρωματογράφο, σε σχέση με τις υπάρχουσες μικροβιακές αναλύσεις αλλά και τις απλές εκχυλίσσεις, δίνει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στον προσδιορισμό του βαθμού αλλοίωσης των γονάδων του αχινού, καθώς ο αχινός είναι ένα εξαιρετικά ευαλλοίωτο προϊόν και διαθέτει μικρό χρονικό περιθώριο προσδιορισμού του βαθμού αλλοίωσής του. Συνεπώς η μέθοδος της SPME-GC-MS θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μελλοντικό εργαλείο στον προσδιορισμό τους βαθμού αλλοίωσης των προϊόντων του αχινού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2010). Toxicological Profile for Ethylbenzene. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

Andoniadou C. & Vafidis, D. (2008). Population structure and algometry of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in Astypalea Island (Dodecanese, South Aegean). Israel Journal of Ecology and Evolution (in press).

Ashie I. N., Smith J. P. & Simpson B. K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. Critical Reviews, Food Science and Nutrition, 36, 87-121.

Awad N. E., Motawe H. M., Selim M. A., Matloub A. A. (2009). Volatile constituents of the brown algae *Padina pavonia* (L.) Gaill and *Hydroclathrus clathratus* (C. Agarth) Howe and their antimicrobial activity. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology, 3 (1), 12-15.

Bandarra N. M., Batista I., Nunes M. L. & Empis J. M. (2001). Seasonal variation in the chemical composition of horse-mackerel (*Trachurus trachurus*). European Food Research and Technology, 212, 535-539.

Behr A., Johnen L. (2009). Myrcene as a Natural Base Chemical in Sustainable Chemistry: A Critical Review. ChemSusChem, 2(12), 1072–1095.

Bennett M. A., Huang T. N., Matheson T. W., Smith A. K., Ittel S., Nickerson W. (1982). (η^6 -Hexamethylbenzene)Ruthenium Complexes. Inorganic Syntheses, 21, 74–78.

Boland D. J., Brophy J. J., House A. P. N. (1991). Eucalyptus Leaf Oils: Use, Chemistry, Distillation and Marketing. pp: 6, Inkata Press, Melbourne.

Borg-Karlson A. K., Norin T., Talvitie A. (1981). Configurations and conformations of torreyol (δ -cadinol), α -cadinol, T-muurolol and T-cadinol. Tetrahedron, 37(2), 425–430.

- Byrne M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104, 275-289.
- Chen H. M., Meyers S. P., Hardy R. W. & Biede S. L. (1984). Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. *Journal of Food Science*, 49, 1337-1340.
- Clark J. E., Luthy R. V. (1955). Separation of Xylenes. *Ind. Eng. Chem*, 47(2), 250–253.
- Colby J. W., Enriquez-Ibarra L. & Flick G. J. Jr (1993). Shelf life of fish and shellfish, *Shelf Life Studies of Foods and Beverages. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects*, 85-143, Elsevier, Amsterdam.
- De la Cruz-Garcia C., Lopez-Hernandez J., Gonzalez-Castro M.J., Rodriguez-Bernaldo De Quiros A. I. & Simal-Lozano J. (2000). Protein, amino acid and fatty acid contents in raw and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*) harvested in Galicia (NW Spain). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1189-1192.
- Devlieghere F., Debevere, J. & Van Impe J. (1998a). Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 231-238.
- Devlieghere F., Debevere J. & Van Impe J. (1998b). Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on micro-organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 105-113.
- Dewick P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley and Sons, Ltd., pp: 174, New York.
- Dewick P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons, pp: 187-197, United Kingdom.
- Egan M., Connors E. M., Anwar Z., Walsh J. J. (2015). Studies on the Isolation of (-)-Menthol from Peppermint Oil and Its Conversion to (-)-Menthyl Acetate. *Journal of Chemical Education*, 92(10), 1736-1740.
- Fahmy A. A., Mervat M. Soliman and Osman F. (1983). Effect of Salting Treatment on the Flavour of Oyster, Donax and Sea Urchin. *Agric. Biol Chem.*, 47(7), 1655-1659.

- Fahlbusch K. G., Hammerschmidt F. J., Panten J., Pickenhagen W., Schatkowski D., Bauer K., Garbe D., Surburg H. (2003). Flavors and Fragrances. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- FAO/WHO (1978). Recommended International Code of Hygienic Practice for Molluscan Shellfish. Document CAC/RCP 18-1978, FAO/WHO, Rome.
- FAO/WHO (2008). Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs. Codex STAN 292, version 2015, FAO/WHO, Rome.
- Fuselli S. R., Casales M. R., Fritz R. & Yeannes M. I. (1994). Microbiology of the marination process used in anchovy (*Engraulis anchoita*) production. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 27, 214–218.
- Galasko G., Hora J., Toubé T., Weedon B., André D., Barbier M., Lederer E., Villanueva V. (1969). Carotenoids and related compounds, Part XXII, Allenic carotenoids in sea urchins. J Chem Soc C, 1264–1265.
- Gram L. & Huss H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology, 33, 121-137.
- Griesbaum K., Behr A., Biedenkapp D., Voges H. W., Garbe D., Paetz C., Collin G., Mayer D., Höke H. (2002). Hydrocarbons, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- Grob R. L. (1995). Modern Practice of Gas Chromatography. 3rd Edition, John Wiley and Sons Inc., New York.
- Heath H. B. & Reineccius G. A. (1986). Flavor and its study, flavor chemistry and technology, Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hirokazu K. (1997). Dictyophorines A and B, two stimulators of NGF-synthesis from the mushroom *Dictyophora indusiata*. Phytochemistry, Elsevier, 45(6), 1203–1205.
- Hölldobler B., Wilson E. O. (1990). The Ants. Journal of Evolutionary Biology, 5, 169–171.
- Huis in't Veld J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology, 33, 1-18.
- Huss H. H. (1995). Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO Fisheries Technological Paper, 348, FAO, Rome.

ICMSF (1986). Microorganisms in foods II, Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. 181-195, Blackie Academic & Professional, London.

ICMSF (2000). Microorganisms in Foods. Microbial Ecology of Food Commodities, Fish and Fish products, Vol 6, 130-189, Blackie Academic & Professional, London.

Janes D., Kantar D., Kreft S., Prosen H. (2008). Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) aroma compounds with GC-MS. *Food Chemistry*, 112.

Jörg F., Ulrich G., Thomas A. S. (2005). Toluene. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.

Juan Peng, Jian-Ping Yuan & Jiang-Hai Wang (2012). Effect of Diets Supplemented with Different Sources of Astaxanthin on the Gonad of the Sea Urchin *Anthocidaris crassispina*. *Nutrients*, 4, 922-934.

Kalogeropoulos N., Mikellidi A., Nomikos T., Chiou A. (2012). Screening of macro- and bioactive microconstituents of commercial finfish and sea urchin eggs. *Food Science and Technology*, 46, 525-531.

Kato S. & Schroeter, S. C. (1985). Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, and its fishery in California. *Marine Fisheries Review*, 47, 1-20.

Kennish J. M. & Kramer D. E. (1987). Review of high pressure liquid chromatographic methods for measuring nucleotide degradation in fish muscle. *Seafood Quality Determination*, 209.

Koukouras A., Sinis A. I., Bobori D., Kazantzidis S., Kitsos M. S. (2007). The echinoderm (Deuterostomia) fauna of the Aegean Sea and comparison with those of the neighbouring seas. *Journal of Biological Research*, 7, 67-92.

Lincoln D. E., Lawrence B. M. (1984). The volatile constituents of camphorweed, *Heterotheca subaxillaris*. *Phytochemistry*, 23(4), 933-934.

Mc Bride S. C., Price R. J., Tom P. D., Lawrence J. M., Lawrence A. L. (2004). Comparison of gonad quality factors: color, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture*, 233(1-4), 405-422.

- Mc Nair H. M., Miller J. M. (2009). Basic Gas Chromatography. 2nd edition, John Wiley and Sons Inc.
- Míguez L. J. & Catoira J. L. (1987). Primeras aportaciones sobre la dinámica y rendimiento gonadal de *Paracentrotus lividus* (Lammark) en la ría de La Coruña. Actas II C.N.A, Spain.
- Neuenschwander U., Guignard F., Hermans I. (2010). Mechanism of the Aerobic Oxidation of α -Pinene. ChemSusChem, 3(1), 75–84.
- Neuenschwander U., Meier E., Hermans I. (2011). Peculiarities of β -pinene autoxidation. ChemSusChem, 4(11), 1613-21.
- Niimi J., Leus M., Silcock P., Hamid N., Bremer P. (2010). Characterisation of odour active volatile compounds of New Zealand sea urchin (*Evechinus chloroticus*) roe using gas chromatography–olfactometry–finger span cross modality (GC–O–FSCM) method. Food Chemistry, 121, 601–607.
- Nordin D. M. A. and Kramer D. E. (1979). Studies on the Handling and Processing of Sea Urchin Roe, Technical Report. Fisheries and Marine Service British Columbia, Vancouver.
- Olías J. M., Pérez A. G., Ríos J. J., Sanz L. C. (1993). Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the green odor notes. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 41, 2368–2373.
- Perry N. B., Anderson R. E., Brennan N. J., Douglas M. H., Heaney A. J., Mc Gimpsey J. A., Smallfield B. M. (1999). Essential Oils from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among Individuals, Plant Parts, Seasons, and Sites. J. Agric. Food Chem., 47(5), 2048–2054.
- Phillips K., Niimi J., Hamid N., Silcock P., Delahunty C., Barker M., Sewell M., Bremer P. (2010). Sensory and volatile analysis of sea urchin roe from different geographical regions in New Zealand, LWT. Food Science and Technology, 43, 202–213.
- Pineiro-Sotelo M., Rodriguez-Bernaldo de Quiros A., Lopez-Hernandez J. & Simal-Lozano J. (2002). Determination of purine bases in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) gonads by high-performance liquid chromatography. Food Chemistry, 79, 113–117.

Read J. (1930). Recent Progress in the Menthone Chemistry. *Chemical Reviews*, 7(1), 1–50.

Regis B. M. (1986). Microstructure adaptative des radioles de *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) en milieu eutrophisé par des eaux usées. *Mar. Biol.*, 90, 271.

Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council, laying down specific hygiene rules for food of animal origin.

Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council, laying down specific rules for the organization of official controls on product of animal origin intended for human consumption.

Robson J. N., Rowland S. J. (1993). Synthesis, chromatographic and spectral characterisation of 2,6,11,15-tetramethylhexadecane (crocetane) and 2,6,9,13-tetramethyltetradecane: reference acyclic isoprenoids for geochemical studies. *Organic Geochemistry*, 20(7), 1093–1098.

Rodríguez-Bernaldo De Quirós A., López-Hernández J., González-Castro M. J., de la Cruz-García C., Simal-Lozano J. (2001). Comparison of volatile components in fresh and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck) gonads by GC–MS using dynamic headspace sampling and microwave desorption. *European Food Research and Technology*, 212, 643-647.

Rydberg J., Cox M., Musikas C., Choppin G. R. (2004). *Solvent Extraction Principles and Practice*, 524, CRC Press, New York.

Sellem F., Guillou M. (2007). Reproductive biology of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats of northern Tunisia (south – east Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87, 763-767.

Serrazanetti G. P., Pagnucco C., Conte L. S. & Cattani O. (1995). Hydrocarbons, sterols and fatty acids in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) of the Adriatic Sea. *Chemosphere*, 30, 1453-1461.

Simopoulos A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 560–569.

Soliman M. M., Fahmy A. A., Sawy A. A., Osman F. E. (1983). Effect of Salting Treatment on the Flavour of Oyster, Donax and Sea Urchin. *Agric Biol Chem*, 47(7), 1655–1659.

Stamatis N. & Vafidis D (2008). Effect of marinating and vacuum storage at 6°C on the fate of chemical, microbial and sensory quality indices of echinoid gonads *Paracentrotus lividus* Lamark 1816. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1626–1633.

Suckling C. C., Symonds R. C., Kelly M. s., Young A. J. (2011). Effect of artificial diets on gonad colour and biomass in the edible sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Aquaculture*, 318, 335–342.

Takana A., Uda H., Yoshokoshi A., (1969). Total synthesis of α -cubebene, β -cubebene, and cubebol. *journal of the chemicas society D, chemical communications*, 6.

Valley G. (1928). The effect of carbon dioxide on bacteria. *Quarterly Review of Biology*, 3, 209-224.

Vejaphan W., Hsieh T., Williams S. S. (1988). Volatile flavor components in crayfish waste. *J Food Sci*, 53(6), 1666–1670

Yamada K., Harada K., Kawahara T., Itoh R., & Tsukamoto S. (1983). Comparative rates of ATP degradation in rested and exhausted young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Rep. Fukui Pref. Fish Exp. Sta.*, 5, 1.

Yamamoto M., Baldermann S., Yoshikawa K., Fujita A., Mase N., Watanabe N. (2014). Determination of Volatile Compounds in Four Commercial Samples of Japanese Green Algae Using Solid Phase Microextraction Gas Chromatography Mass Spectrometry. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, pp: 8.

Ελληνική

Γιαννάκη Μ & Δαρα Κ. (2017). Προσδιορισμός βιογενών πτητικών οργανικών ενώσεων στη δασική περιοχή Καισαριανής, Πτυχιακή εργασία, ΓΠΑ.

Εφημερίς της Κυβερνήσεως, τεύχος πρώτο, αρ. φύλλου 108, 6 Μαΐου 2014.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.

Κουτσογιάννη Α. Γ. (2012). Γεωγραφική διαφοροποίηση βοτάνων με την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας, της φασματοσκοπίας υπεριώθρου και της χημειομετρίας. Μεταπτυχιακή μελέτη, ΓΠΑ, τμήμα θετικών επιστημών στη γεωπονία, Αθήνα.

Λεγάκις, Α. & Μαραγκού, Π. (2009). Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ.528.

Σάββα Μ., Ματσιώρη Σ., Μποζιάρης Ι. Σ. (2009). Σύνθεση μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού κατά τη συντήρησή τους σε διάφορες θερμοκρασίες. 9^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας & Αλιείας 2009, Πρακτικά, Τόμος II, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Ανάβυσσος, Αθήνα.

Σταμάτης Ν., Στεργίου Δ., Μόνιος Γ., Βαφείδης Δ. (2004). Χημικά, μικροβιολογικά χαρακτηριστικά και θερμιδική ενέργεια του αχινού (*Paracentrotus lividus*) στο Αιγαίο πέλαγος 8^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας & Αλιείας, Πρακτικά, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Ανάβυσσος, Αθήνα.

Σταμάτης Ν., Στεργίου Δ., Μόνιος Γ., Βαφείδης Δ. (2009). Βασική χημική σύσταση, λιπαρά οξέα και θερμιδική ενέργεια του νωπού αχινού *Paracentrotus Lividus*. 9^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας & Αλιείας, Πρακτικά, Τόμος II, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Ανάβυσσος, Αθήνα.

Σταμούλη Α. (2012). Ιστολογική ανάλυση των γονάδων του αχινού *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) στον Παγασητικό κόλπο. Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

Ηλεκτρονική

Http¹:

<<https://www.okaa.gr/gr/nea-kai-anakoinoseis/statistika-deltia-timon>>

Http²:

<<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/4547.pdf>>

Http³:

<<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/4524.pdf>>

Http⁴:

<<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html>>

Http⁵:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diacetone_alcohol#section=Infrared-Spectra>

Http⁶:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/camphene#section=Color>>

Http⁷:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-methyl-5-hepten-2-one#section=Top>>

Http⁸:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15600>>

Http⁹:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool>>

Http¹⁰:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-dodecene#section=Cellular-Locations>>

Http¹¹:

<<http://www.chemistryexplained.com/Ny-Pi/Petroleum.html>>

Http¹²:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dihydromyrcenol#section=Literature>>

Http¹³:

<<http://www.uniprot.org/uniprot/Q5SBP2>>

Http¹⁴:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10953718#section=Food-Additives-and-Ingredients>>

Http¹⁵:

<<https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m6821/linalyl%20acetate?q=unauthorize>>

Http¹⁶:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-tetradecene#section=Industry-Uses>>

Http¹⁷:

<<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1290141.html>>

Http¹⁸:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geranylacetone>>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗΣ ΤΡΥΒΛΙΩΝ

a) Επιφανειακή επίστρωση

Η τεχνική αυτή αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0.1 mL) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια ειδικού διανομέα. Εφαρμόζεται, γενικά, στους αερόβιους μικροοργανισμούς.

b) Ενσωμάτωση

Αρχικά γίνεται ενοφθαλμισμός γνωστού όγκου (1 mL) από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος σε θρεπτικό υλικό και στην συνέχεια γίνεται μετάγγιση τηγμένου θρεπτικού υλικού, θερμοκρασίας 45 °C περίπου. Στη συνέχεια, και αφού το θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay). Εφαρμόζεται, γενικά, στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΠΛΗΡΕΙΣ ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

ημέρες	αραίωση	PCA			CFU/g	log(CFU)/g	VRBGA			CFU/g	log(CFU)/g
		A	B	C			A	B	C		
1	-1	41	59	36	5091	3.706795	0	0	1	3	0.481486
	-2	2	28	2			0	0	0	0	
	-3	0	1	0			0	0	0		
	-4	0	0	0			0	0	0		
	-5	0	0	0			X	X	X		
2	-1	244	216	234	26000	4.414973	21	15	12	148	2.171682
	-2	81	43	40			1	0	0		
	-3	6	4	1			0	0	0		
	-4	0	0	0			0	0	0		
3	-1	317	366	397			41	11	39	327	2.51491
	-2	39	35	36	37576	4.574908	13	4	0		
	-3	4	9	1			0	0	0		
	-4	0	0	0			0	0	0		
	-5	0	0	0			X	X	X		
4	-1	621	578	479			367	49	380		
	-2	94	73	69	80606	4.906368	17	5	33	170	2.229674
	-3	10	8	12			1	0	0		
	-4	0	1	0			0	0	0		
	-5	0	0	0			X	X	X		

Πίνακας 12: Πίνακας μικροβιακών αποτελεσμάτων της πρώτης επανάληψης, εβδομάδα 29/05/17-01/06/17.

ημέρες	αραίωση	PCA			CFU/g	log(CFU)/g	VRBGA			CFU/g	log(CFU)/g
		A	B	C			A	B	C		
1	-1	132	84	98	10515	4.021816	1	2	0	9	0.95860731
	-2	27	0	6			0	0	0		
	-3	1	0	0			0	0	0		
	-4	0	0	0			0	0	0		
	-5	0	0	0			X	X	X		
2	-1	343	215	406			18	15	14	145	2.1627273
	-2	41	27	33	33333	4.522879	1	0	0		
	-3	1	4	4			0	0	0		
	-4	0	0	0			0	0	0		
3	-1	599	565	613			10	12	21	136	2.13469857
	-2	73	74	75	73333	4.865301	1	0	1		
	-3	10	4	6			0	0	0		
	-4	0	1	0			0	0	0		
	-5	0	0	0			X	X	X		
4	-1	387	983	587			1	3	3	21	1.3265841
	-2	86	42	123	81515	4.911238	0	0	0		
	-3	8	3	7			0	0	0		
	-4	0	0	0			0	0	0		
-5	0	0	0			X	X	X			

Πίνακας 13: Πίνακας μικροβιακών αποτελεσμάτων της δεύτερης επανάληψης, εβδομάδα 19-23/06/17.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΠΛΗΡΕΙΣ ΠΙΝΑΚΕΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

~ N O	αγνωστη κορυφή στο θορυβο αναγνωριστική κορυφή απουσία κορυφής	Glass with Seawater (29-01/05-06)												Q
		day 1			day 2			day 3			day 4			
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
RT (±)	NAME	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
03.93	1-Butanol	N	N	N	N	O	N	~	N	N	N	N	N	X
06.02	Toluene	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
07.93	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
08.44	Ethylbenzene	~	~	~	~	N	N	N	N	N	N	N	N	X
08.70	p-Xylene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
09.23	Nonane	O	O	~	~	O	N	N	N	N	N	N	N	X
10.33	α-Pinene	N	N	N	N	O	N	N	N	N	N	N	N	X
10.85	Camphene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
11.64	β-Pinene	~	~	N	~	N	N	~	N	N	N	N	N	X
11.81	6-Methyl-5-hepten-2-one + β-Myrcene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
11.99	Decane	~	~	~	~	N	N	N	N	N	N	N	N	X
12.14	1,2,4-trimethyl-Benzene	~	~	N	N	~	N	N	N	N	N	N	N	X
12.34	Octanal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
12.93	p-Cymene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
13.01	Limonene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
13.16	Eucalyptol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
13.79	γ-Terpinene	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
14.65	Undecane	~	~	~	~	N	N	N	N	N	N	N	N	X
14.85	Linalool	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
15.57	Fenchol	O	O	~	O	~	N	O	N	~	~	N	N	X
15.86	cis-Limonene oxide	O	O	O	O	O	N	O	~	~	N	N	N	X
15.97	trans-Limonene oxide	O	O	O	O	~	N	O	N	N	N	N	N	X
16.39	Camphor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
16.99	1-Dodecene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
17.17	Dodecane	~	~	~	~	~	N	~	N	N	N	N	N	X
17.57	Decanal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
18.46	Linalyl acetate	~	~	~	~	O	N	N	N	~	~	N	N	X
19.55	Menthyl acetate	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
19.96	Tridecane	N	~	~	N	O	~	N	~	~	N	N	N	X
21.64	1-Tetradecene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
21.79	Tetradecane	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
23.08	6,10-dimethyl-5,9-Undecadien-2-one (geranyl acetone)	N	N	~	~	~	~	N	N	N	N	N	N	X
23.53	Aliphatic Hydrocarbon 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	X
24.49	2,6,11,15-tetramethyl hexadecane (crocetane)	~	~	~	~	N	N	N	N	N	N	N	N	X
27.57	Aliphatic Hydrocarbon 2	~	~	N	N	N	~	N	N	N	N	N	N	X
27.81	Aliphatic Hydrocarbon 3	~	~	N	N	N	~	N	N	N	N	N	N	X

Πίνακας 14: Πτητικές ουσίες της πρώτης επανάληψης, εβδομάδα 29-01/05-06/2017.

		Glass with Seawater (19-22/05)											
		day 1			day 2			day 3			day 4		
RT (±)	NAME	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
03.60	1-Butanol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
05.65	Toluene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
07.55	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	O	O	~	N	N	N	N	~	~	N	~	N
08.05	Ethylbenzene	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
08.35	p-Xylene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
08.90	Benzene,1,2-dimethyl-	~	N	N	~	N	N	N	N	N	N	N	N
09.15	Methane tribromo or tribromoacetic acid	N	O	N	N	N	N	N	O	O	N	O	O
09.90	α-Pinene	N	N	N	N	N	N	N	N	O	N	N	N
10.45	Camphene	N	N	N	N	N	N	N	N	O	N	N	N
11.20	β-Pinene	O	~	N	~	~	N	N	N	~	N	~	N
11.40	6-Methyl-5-hepten-2-one	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11.60	Decane	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11.70	1,2,4-trimethyl-benzene	~	O	N	~	~	N	N	~	~	N	~	~
12.30	3,7-dimethyl-2,4-octadiene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12.50	p-Cymene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12.60	Limonene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12.75	Eucalyptol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13.35	γ-Terpinene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13.70	Dihydromyrcenol	O	O	~	~	~	N	N	N	N	N	N	N
14.25	Undecane	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14.85	Linalool	~	~	~	~	~	N	N	N	N	N	N	N
14.80	α-Thujone	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15.10	β-Thujone	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15.95	Camphor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16.10	Menthone	O	O	~	~	~	N	N	N	N	N	N	N
16.35	iso-Menthone	O	O	O	~	~	N	N	N	N	N	N	N
16.60	1-Dodecene	O	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16.75	Dodecane	~	~	N	N	N	N	~	N	N	N	N	N
17.15	Decanal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19.15	Menthyl acetate	~	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19.65	unidentified compound 1	N	~	N	N	N	N	N	~	N	N	N	N
20.45	α-Cubebene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20.90	unidentified compound 2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21.00	α-Ylangene	N	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21.15	α-Copaene + α-Bourbonene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21.25	unidentified compound 3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21.40	β-Bourbonene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22.05	unidentified compound 4	N	~	N	N	N	N	N	~	N	N	N	N
22.10	Rotundene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22.45	θ-Copaene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22.60	Neryl acetone	N	N	N	O	N	N	O	N	N	O	N	N
22.75	cis-Muurolo-3,5-diene	N	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22.85	trans-Muurolo-3,5-diene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23.00	cis-Cadina-1(6),4-diene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23.15	cis-Murolo-4(14),5-diene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23.30	trans-Cadina-1(6),4-diene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23.45	unidentified compound 5	O	O	~	~	~	~	N	~	N	N	N	N
23.55	Germacrene D	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23.70	unidentified compound 6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23.80	trans-Murolo-4(14),5-diene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23.95	unidentified compound 7	N	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24.00	unidentified compound 8	N	~	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24.20	δ-Cadinene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24.35	Zonarene + cis-Calamenene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24.60	trans-Cadina-1,4-diene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24.65	α-Cadinene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24.80	α-Calacorene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25.25	β-Calacorene	~	O	~	~	~	~	~	~	~	N	~	~
25.70	Gleenol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26.30	α-Corocalene	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Πίνακας 15: Πηπτικές ουσίες της δεύτερης επανάληψης, εβδομάδα 19-23/06/17.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΠΙΝΑΚΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ

Ημέρα	Linalool (14.85)	Linalyl acetate (18.46)
1	2203727.021	0
2	12977920.04	452316.8903
3	15591661.75	1143677.711
4	28283866.15	1227892.653

Πίνακας 16: Εμβαδόν του Linalool και της αλκοόλης του, Linalyl acetate.

Ημέρα	Limonene (13.01)	cis-Limonene oxide (15.86)	trans-Limonene oxide (15.97)
1	38431412.99	0	0
2	55227058.47	442149.2917	1422338.66
3	67439158.57	317361.139	1303293.305
4	79843354.77	1990156.642	5088786.273

Πίνακας 17: Εμβαδόν του Limonene και των οξειδίων του cis- και trans-.