



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΠΜΣ «ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ (FOOD, NUTRITION & HEALTH)»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

της μεταπτυχιακής φοιτήτριας ΝΙΚΟΛ Θ. ΜΑΝΔΗΛΑΡΗ

**«Αξιολόγηση της μεταβολωμικής ως εργαλείο ελέγχου της ποιότητας
του φιλέτου στήθους κοτόπουλου κατά τη συντήρηση του σε διάφορες
θερμοκρασίες»**

Επιβλέπων Καθηγητής: ΜΑΛΛΟΥΧΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΠΜΣ «ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ (FOOD, NUTRITION & HEALTH)»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Αξιολόγηση της μεταβολωμικής ως εργαλείο ελέγχου της ποιότητας του φιλέτου
στήθους κοτόπουλου κατά τη συντήρηση του σε διάφορες θερμοκρασίες »**

**« Evaluation of metabolomics as a tool for freshness evaluation of chicken breast fillet
during storage at various temperatures»**

ΝΙΚΟΛ Θ. ΜΑΝΔΗΛΑΡΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: ΜΑΛΛΟΥΧΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επ. Καθηγητής

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής

Γαρδέλη Χρυσανγή, Επ. Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ, 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η εφαρμογή της μεταβολωμικής ως εργαλείο ελέγχου της ποιότητας του φιλέτου στήθους κοτόπουλου. Ως εκ τούτου, προσδιορίστηκε το πολικό κλάσμα των μεταβολιτών σε φιλέτο στήθους κοτόπουλου με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών κατά τη διάρκεια συντήρησής του σε διάφορες θερμοκρασίες με βασικό στόχο την εύρεση πιθανών χημικών δεικτών αλλοίωσης-φρεσκότητας και τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τον μηχανισμό αλλοίωσης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου τα οποία είχαν συντηρηθεί σε τέσσερις θερμοκρασίες (0 °C, 5°C, 10°C και 15°C). Επιπλέον στόχος ήταν η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μικροβιακής ανάλυσης και της οργανοληπτικής αξιολόγησης από πειράματα συντήρησης με τα δεδομένα της μεταβολωμικής ανάλυσης σύμφωνα με κλίμακα αξιολόγησης που δημιουργήθηκε (1:επιθυμητό, 2:αποδεκτό, 3:μη αποδεκτό). Αρχικά, αναπτύχθηκε κατάλληλη μεθοδολογία για την απομόνωση του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών όπου περιελάμβανε τα στάδια της προκατεργασίας των δειγμάτων όπως ζύγιση και σταθεροποίηση με υγρό άζωτο και της εκχύλισης των υδρόφιλων μεταβολιτών, σύμφωνα με παραλλαγή της μεθόδου Bligh-Dyer. Επίσης, περιελάμβανε τα στάδια της λυοφιλίωσης των εκχυλισμάτων και της παραγωγοποίησης δύο σταδίων (μεθοξυαμίνωση και σιλυλίωση) των υδρόφιλων μεταβολιτών ούτως ώστε να καταστούν πτητικοί και αδρανείς. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των παραγώγων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC/MS). Μετά από προ-επεξεργασία των δεδομένων για την ταυτοποίηση των ουσιών, επεξεργάστηκαν στατιστικά με διάφορες μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης με χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) επιτεύχθηκε σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων βάσει του χρόνου συντήρησης. Ανιχνεύθηκαν 27 σημαντικοί μεταβολίτες (VIP score >1), που ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις όπως οργανικές ενώσεις, σάκχαρα, αμινοξέα, προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών, φωσφορικά και μη παράγωγα σακχάρων, αμίνες, βιταμίνες, αμινοξέα, προϊόντα αποσύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων και άλλες ενώσεις. Οι παραπάνω κατηγορίες διακρίθηκαν σε μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση παρουσίαζε αυξητική τάση κατά την συντήρηση του φιλέτου στήθους κοτόπουλου και σε μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση μειώθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Επομένως, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες αλλοίωσης ή φρεσκότητας, αντιστοίχως. Τέλος, από τη σύγκριση των μεταβολωμικών δεδομένων με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά δεδομένα, φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

ABSTRACT

In the current study, the application of metabolomics as a tool for freshness evaluation of chicken breast fillet was examined. The aim of this study was to determine the polar fraction of metabolites in chicken breast fillet by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) during storage at various temperatures. Main goal was to find possible chemical indicators of spoilage-freshness and to gather information about the spoilage mechanism. For that purpose, the samples were maintained at four temperatures (0°C, 5°C, 10°C and 15°C). Additional goal was to correlate the microbial analysis and the sensory evaluation results with the metabolomics data, according to an evaluation scale created (1: desirable, 2: acceptable, 3: unacceptable). After sample preparation (weighing and stabilization with liquid nitrogen), isolation of the polar fraction of metabolites took place via extraction of hydrophilic metabolites, according to a modification of Bligh-Dyer method, followed by lyophilization of the extracts, derivatization (methoxyamination and silylation) of the hydrophilic metabolites and analysis of the derivatives with gas chromatography-mass spectrometry. After data pre-processing, they were statistically processed by various multivariate analysis methods using the MetaboAnalyst 4.0 web platform. According to the results of Principal Component Analysis (PCA) a clear separation of samples based on storage time was achieved. The 27 most important metabolites (VIP score > 1) that were detected, belonged to various classes such as organic acids, sugars, amino acids, metabolic products, phosphate and non-phosphate sugar derivatives, amines, vitamins, nucleic acid decomposition products and other compounds. Furthermore, the compounds were distinguished in metabolites whose concentration increased during storage and metabolites whose concentration decreased during storage of chicken breast fillets. Therefore, they could be classified as biomarkers of spoilage or freshness, respectively. Finally, there appeared to be a correlation between the metabolomics data and those of sensory evaluation and classical microbiological analysis, however further investigation is required.

Λέξεις κλειδιά

μεταβολομική ανάλυση, αλλοίωση, φρεσκότητα, φιλέτο στήθους κοτόπουλου, μικροβιολογική ανάλυση

metabolomics, spoilage, freshness, sensory evaluation, microbiological analysis, chicken breast fillet

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση του Επ. Καθηγητή κ. Μαλλούχου Αθανάσιου. Θέμα της παρούσης εργασίας αποτελεί η αξιολόγηση της μεταβολωμικής ως εργαλείο ελέγχου της ποιότητας του φιλέτου στήθους κοτόπουλου κατά τη συντήρηση του σε διάφορες θερμοκρασίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τη χαρά μου που είχα την τύχη να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία σε ένα ιδιαίτερα φιλικό περιβάλλον, να συνεργαστώ με αξιόλογους συναδέλφους και να αποκομίσω σημαντικές γνώσεις πάνω στην επιστήμη μου. Με βάση αυτό το γεγονός, θα ήθελα πρώτα απ' όλα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή μου κ. Μαλλούχο Αθανάσιο τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εν λόγω εργασίας, όσο και για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε ώστε η διεξαγωγή της παρούσης εργασίας να φέρει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Επειτα, οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Επ. Καθηγήτρια κ. Γαρδέλη Χρυσανγή και την κ. Άρτεμις Παπαντώνη οι οποίες μου προσέφεραν απλόχερα στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Καθηγητές, Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γ.Π.Α για τη συνεργασία μας και την προθυμία τους να με βοηθήσουν καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, μεγάλη ευγνωμοσύνη οφείλω σε όλη την οικογένεια μου και κυρίως στους γονείς μου Θεόδωρο και Αναστασία, οι οποίοι αποτέλεσαν στήριγμα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου αλλά και στις ευρύτερες επιλογές στη ζωή μου. Με αφορμή την παρούσα εργασία θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και έναν πολύ σημαντικό άνθρωπο στην ζωή μου τον κ. Κορναρόπουλο Γεώργιο για την στήριξη και το πραγματικό του ενδιαφέρον το οποίο με βοήθησε να επιδεικνύω το απαραίτητο σθένος για την επίτευξη των στόχων μου όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
1.1.1 Παραγωγή πουλερικών.....	8
1.1.2 Η παραγωγή πουλερικών στην Ελλάδα.....	8
1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ	9
1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ	10
1.3.1 Μικροβιακή αλλοίωση.....	11
1.3.2 Βιοχημική αλλοίωση.....	12
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΦΡΕΣΚΟΤΗΤΑΣ	15
1.4.1 Νουκλεοζίτες και νουκλεοτίδια	16
1.4.2 Δείκτης Κ.....	16
1.4.3 Ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N)	17
1.4.4 Βιογενείς αμίνες	17
1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ	18
1.5.1 Γενικά στοιχεία.....	18
1.5.2 Αναλυτικές τεχνικές	20
1.5.3 Χημειομετρία	23
1.5.4 Εφαρμογή της μεταβολωμικής στον τομέα των τροφίμων.....	25
1.5.5 Συνεισφορά της μεταβολωμικής στην μελέτη των πουλερικών.....	26
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	27
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	29
2.2 ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	29
2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ GC/MS	30
2.3.1 Εκχύλιση πολικών μεταβολιτών από τον ιστό κοτόπουλου	30
2.3.2 Ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας (QC-pooled sample).....	31
2.3.3 Παραγωγοποίηση πολικών μεταβολιτών	31
2.3.4 Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών	32
2.3.5 Στατιστική επεξεργασία	32
2.4 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	32
2.5 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35

3.1 ΠΡΟ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	35
3.2 ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	36
3.2.1 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 0 °C.....	36
3.2.2 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 5 °C.....	43
3.2.3 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 10 °C.....	49
3.2.4 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 15 °C.....	55
3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ	61
3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	64
4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72
ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ.....	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	74
Π-1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ (BATCH).....	74
Π-2. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ GC/MS.....	75
Π-3. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΚΟΝΑΤS	76
Π-4. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΥΧΑΙΩΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ PLS-DA.....	77
Π-5. ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΜΕ ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΤΑΣΗ.....	78
Π-6. ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΜΕ ΜΕΙΟΥΜΕΝΗ ΤΑΣΗ	81

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η διατροφή των ανθρώπων, στις αστικές περιοχές ανεπτυγμένων χωρών, βασίζεται στην ζωική πρωτεΐνη σε αντίθεση με την διατροφή των ανθρώπων στις αγροτικές περιοχές, κυρίως επειδή οι άνθρωποι των αστικών κέντρων έχουν γενικά πρόσβαση σε μια ευρύτερη ποικιλία τροφίμων στις τοπικές αγορές. Αντίθετα, στις αναπτυσσόμενες χώρες, το κρέας κοτόπουλου που παράγεται στο εμπόριο μπορεί να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις κυρίως της μεσαίας τάξης, που μπορεί να πληρώσει για τα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής (FAO 2013).

Το κοτόπουλο θεωρείται ως ένα υγιεινό κρέας και επιπλέον είναι το φθηνότερο από όλα τα υπόλοιπα κρέατα. Το κοτόπουλο και τα αυγά παρέχουν όχι μόνο υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες, αλλά επίσης σημαντικές βιταμίνες και μέταλλα. Από θρεπτική αξία, το φιλέτο στήθους κοτόπουλου περιέχει λιγότερα από 3 g λιπαρά / 100 g. Το κρέας πουλερικών είναι σημαντική πηγή των βασικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), ιδιαίτερα των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και δεν περιέχει *trans*-λιπαρά. Σε αντίθεση με τα περισσότερα κρέατα, το κρέας κοτόπουλου μπορεί εύκολα να εμπλουτιστεί με διάφορα σημαντικά θρεπτικά συστατικά. Η μελέτη των Yu et al., (2008), έδειξε ότι με την προσθήκη 0,24 mg σεληνίου (ως οργανικό σελήνιο) ανά χιλιόγραμμο ζωοτροφών, η περιεκτικότητα σεληνίου στο κρέας του στήθους κοτόπουλου αυξήθηκε από 8,6 μg σε 41 μg / 100 g.

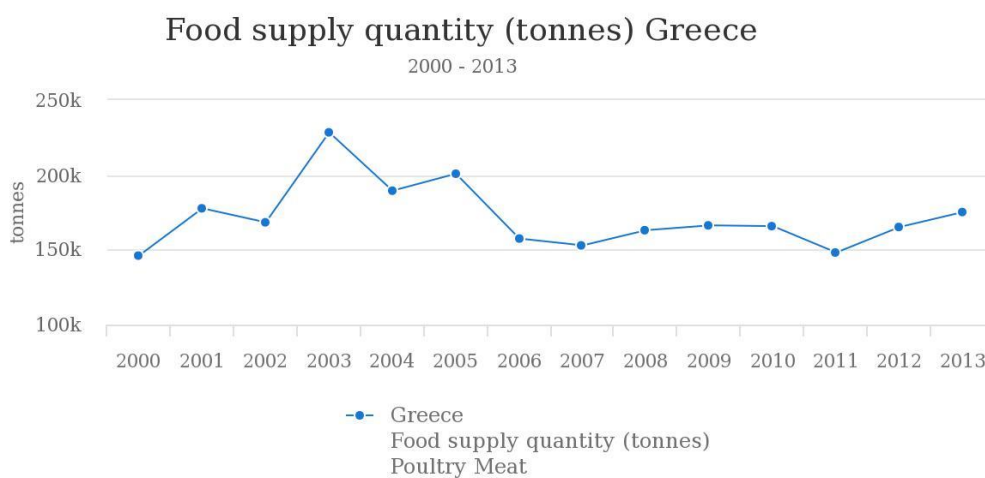
1.1.1 Παραγωγή πουλερικών

Ο τομέας των πουλερικών συνεχίζει να αναπτύσσεται και να εκβιομηχανίζεται σε πολλά μέρη του κόσμου. Ο αυξανόμενος πληθυσμός, η μεγαλύτερη αγοραστική δύναμη και η αστικοποίηση υπήρξαν ισχυροί κινητήριοι μοχλοί ανάπτυξης. Σε γενικά πλαίσια, οι εγκαταστάσεις και η υποδομή για την παραγωγή κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής μπορούν να δημιουργηθούν γρήγορα και σύντομα να αρχίσουν να παράγουν (FAO 2013). Οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός κρέατος πουλερικών στον κόσμο, με το 18% της παγκόσμιας παραγωγής, ακολουθούμενη από την Κίνα, τη Βραζιλία και τη Ρωσία. Για την κάλυψη της αυξανόμενης ζήτησης, η παγκόσμια παραγωγή κρέατος πουλερικών αυξήθηκε από 9 σε 122 εκατομμύρια τόνους μεταξύ του 1961 και του 2017 (FAO 2019). Στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, η προβλεπόμενη αύξηση στην κατανάλωση κρέατος πουλερικών μεταξύ του 2005 και του 2015 είναι 2,9%, σε σύγκριση με μόλις 1,6% στις πιο ανεπτυγμένες χώρες. Το 2017, το κρέας πουλερικών αντιπροσώπευε περίπου το 37% της παγκόσμιας παραγωγής κρέατος (FAOSTATS).

1.1.2 Η παραγωγή πουλερικών στην Ελλάδα

Η Ελληνική παραγωγή κρέατος πουλερικών αντιστοιχεί περίπου στο 5% του γεωργικού ΑΕΠ και καλύπτει το σημαντικότερο μέρος της συνολικής αξίας της εγχώριας παραγωγής κρέατος και των ελληνικών εξαγωγών κρέατος. Κατά την περίοδο 1996-2006, η

ελληνική παραγωγή κρέατος πουλερικών σημείωσε μέση ετήσια αύξηση 0,91% και η εγχώρια αγορά αυξήθηκε με μέσο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 1,34% φθάνοντας τους 215,1 χιλιάδες τόνους το 2006, από 192,7 χιλιάδες τόνους το 1994. Η Eurostat εκτιμάει ότι το 2014 η εγχώρια παραγωγή πουλερικών αυξήθηκε κατά 5,6% στους 190.530 τόνους, ενώ το 2015 παρέμεινε στα ίδια επίπεδα. Στην ελληνική βιομηχανία, υπάρχουν πολλές μικρές επιχειρήσεις, κυρίως οικογενειακές, που ανταποκρίνονται στις βασικές ανάγκες όμως δεν μπορούν να καλύψουν την εγχώρια ζήτηση και γι' αυτό οι εισαγωγές κρέατος πουλερικών ήταν και είναι απαραίτητες. Ο κλάδος πλήττεται από εισαγωγές, κυρίως από Βουλγαρία και Ρουμανία, χώρες που πλεονεκτούν λόγω του ανταγωνιστικού κόστους παραγωγής (Keramido et al., 2011). Στο Σχήμα 1.1 παρουσιάζεται η μεταβολή της παραγωγής πουλερικών σε τόνους από το 2000 έως το 2013 σε Ελλάδα (FAOSTATS).



Σχήμα 1.1 Παραγωγή πουλερικών (σε tn) στην Ελλάδα από το 2000 έως το 2013 Πηγή στατιστικών δεδομένων: FAO.

1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ

Σύμφωνα με το άρθρο 88 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2009), με τον όρο νωπό κρέας ορίζεται: «*τμήμα των σφαγίων των θερμόαιμων ζώων και πτηνών που είναι κατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου, σύμφωνα με τις εκάστοτε ισχύουσες διατάξεις, και τα οποία διατίθενται στην κατανάλωση όπως είναι χωρίς καμία επεξεργασία, εκτός από τον τεμαχισμό και την ψύξη*». Το κρέας περιέχει απολύτως απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και ως εκ τούτου αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Οι τιμές αυτών των θρεπτικών συστατικών μετρούνται ως προς τη διαθεσιμότητα των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων, των μετάλλων, των λιπαρών υλών (και των λιπαρών οξέων).

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από δύο ομάδες αμινοξέων, τα απαραίτητα αμινοξέα και τα μη απαραίτητα αμινοξέα. Από τα συνολικά 20 αμινοξέα τροφίμων, 10 είναι απαραίτητα

για βρέφη και 8 για ενήλικες. Το κρέας πουλερικών είναι μια πηγή πρωτεΐνης και προτιμάται από τους καταναλωτές λόγω ορισμένων χαρακτηριστικών που συμπεριλαμβάνουν εύκολο μαγείρεμα, θρεπτικά στοιχεία, οργανοληπτικές ιδιότητες, υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, χαμηλές θερμίδες και εμπλουτισμένο με τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανθρώπινη υγεία και ανάπτυξη. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο στο κοτόπουλο είναι υψηλό και φτάνει το 34,5% στο στήθος κοτόπουλου έναντι του 22% που αποτελεί το μέσο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κρεάτων (Manuela et al., 2013). Τα κυριότερα αμινοξέα των μυϊκών πρωτεϊνών είναι το ασπαραγινικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ, η λυσίνη, η αργινίνη και η λευκίνη. Από οργανικά οξέα, κυρίαρχο είναι το γαλακτικό οξύ που σχηματίζεται με την γλυκόλυση και ακολουθούν το ηλεκτρικό οξύ και το γλυκολικό οξύ ενώ τα ελεύθερα σάκχαρα που υπάρχουν είναι η φρουκτόζη, η γλυκόζη και η ριβόζη (Belitz et al., 2009).

Το δέρμα αποτελεί την κύρια πηγή λίπους στο κρέας των πουλερικών και το περιεχόμενό τους σε λίπος κυμαίνεται από 1 έως 15%. Το λίπος των πουλερικών περιέχει κυρίως μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, κατόπιν κορεσμένα και 14 πολυακόρεστα. Επιπλέον, είναι μία άριστη πηγή πολλών βιταμινών και μετάλλων. Στα πουλερικά, το στήθος κοτόπουλου αποτελεί μία ιδιαίτερα καλή πηγή νιασίνης (100g καλύπτουν το 56% της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης, ΣΗΔ) και βιταμίνης B6 (27% της ΣΗΔ) ενώ τα 100g στήθους γαλοπούλας καλύπτουν το 31% της ΣΗΔ σε νιασίνη και το 29% της ΣΗΔ σε βιταμίνη B6 (Manuela et al., 2013).

Πρόσφατη μελέτη των Javaid et al., (2017), έδειξε ότι τα εξεταζόμενα κοτόπουλα είχαν περιεκτικότητα σε υγρασία 75,43%, περιεκτικότητα σε λίπος 4,50% και περιεκτικότητα σε τέφρα 5,12% επί ξηρού βάρους. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Ali et al., (2007) οι οποίοι κατέγραψαν περιεκτικότητα σε υγρασία 75,47%, περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 22,04%, περιεκτικότητα σε λίπος 1,05% και περιεκτικότητα σε τέφρα 1,07% από το κρέας κοτόπουλου κρεατοπαραγωγής επί της νωπής ύλης.

1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ

Η παραγωγή πουλερικών είναι ένας από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς ζωικού κεφαλαίου όμως ενδέχεται να εγείρει σημαντικά ζητήματα υγείας για τους ανθρώπους που καταναλώνουν προϊόντα πουλερικών αλλά φυσικά και για τους εργαζόμενους παραγωγής πουλερικών. Το κρέας πουλερικών είναι ένα εξαιρετικά ευπαθές προϊόν που είναι ευαίσθητο στις φυσικές, χημικές και μικροβιολογικές μεταβολές και αυτό ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας ζωής του κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας συντήρησης. Η ποιότητα και η φρεσκότητα του κρέατος πουλερικών βασίζονται κυρίως στον προσδιορισμό των οργανοληπτικών και μικροβιακών χαρακτηριστικών (Conte-júnior et al., 2015).

Ο χειρισμός και η σφαγή ζωντανών, μολυσμένων πουλερικών αποτελεί επίσης κίνδυνο. Για τους καταναλωτές, η κατανάλωση και ο χειρισμός μολυσμένου κρέατος πουλερικών και αυγών μπορεί να οδηγήσει σε τροφική δηλητηρίαση. Οι κύριες αιτίες είναι τα βακτήρια, κυρίως σαλμονέλλα (*Salmonella*) και καμπυλοβακτηρίδιο (*Campylobacter*) αλλά

κινδύνους εγείρει και η αλόγιστη χρήση αντιμικροβιακών στην παραγωγή πουλερικών, οδηγώντας στην ανάπτυξη ανθεκτικών μικροοργανισμών (FAO 2019). Η σαλμονέλλωση είναι μια σημαντική ζωνόσος που συνδέεται με την κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης (EFSA 2012). Στην Ε.Ε., η σαλμονέλλωση εξακολουθεί να υπάρχει σε υψηλό ποσοστό, αλλά δείχνει μια πτωτική τάση που παρατηρήθηκε τα τελευταία χρόνια. Η εποχική τάση της σαλμονέλλωσης του ανθρώπου είναι σαφής, σημειώνοντας άνοδο τον Αύγουστο. Η σαλμονέλλωση αποδίδεται στο *Salmonella Enteritidis* και *Salmonella Typhimurium* (Zdragas et al., 2012).

1.3.1 Μικροβιακή αλλοίωση

Ο ρόλος της μικροβιακής χλωρίδας είναι πολύ σημαντικός στα κρέατα αφού τα προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού προκαλούν μεταβολές στα οργανοληπτικά στοιχεία του κρέατος όπως αλλαγή του αρώματος, εμφάνιση γλοιώδους υφής στην επιφάνεια κ.α. Ως σημείο αλλοίωσης ορίζεται το ανώτατο αποδεκτό επίπεδο μικροοργανισμών έως ότου εμφανιστούν περίεργες οσμές και γεύσεις (Ellis et al., 2004). Χαρακτηριστικό των αλλοιωμένων πουλερικών, είναι η εμφάνιση γλοιώδους ουσίας στην επιφάνειά τους, ενώ από την εντερική κοιλότητα αναδύεται μια όξινη οσμή που οφείλεται εκτός από την ανάπτυξη βακτηρίων και στην ανάπτυξη εντερόκοκκων (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 1993). Γενικώς, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός τρόφιμου, όπως η υφή και η γεύση, αποτελούν ένδειξη για να θεωρηθεί ένα τρόφιμο αλλοιωμένο ή όχι. Η θερμοκρασία αλλά και ο εκάστοτε μικροοργανισμός συμβάλλουν σημαντικά στην αλλοίωση του κρέατος (Nychas et al., 2007). Στην πραγματικότητα, ορισμένοι από τους μικροοργανισμούς προέρχονται από τον εντερικό σωλήνα του ζώου καθώς και από το περιβάλλον με το οποίο το ζώο είχε έρθει σε επαφή κάποια στιγμή πριν ή κατά τη διάρκεια της σφαγής (Koutsoumanis & Sofos, 2004).

Η αλλοιογόνος μικροχλωρίδα του αερόβια αποθηκευμένου φρέσκου κοτόπουλου αποτελείται από ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων, ενώ το δέρμα του κρέατος παρέχει άριστες συνθήκες για την ανάπτυξή τους. Η σύνθεση της μικροχλωρίδας στο κρέας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες: α) τις πρακτικές εκτροφής των σφαγείων (ελευθέρως βοσκής ή εκτροφής), β) την ηλικία του ζώου κατά τη στιγμή της σφαγής, γ) τον χειρισμό κατά τη σφαγή και την επεξεργασία του κρέατος, δ) το περιβάλλον κατά τη σφαγή, επεξεργασία και διανομή ε) τις μεθόδους συντήρησης, στ) τον τύπο συσκευασίας και ζ) τον χειρισμό κατά την αποθήκευση από τον καταναλωτή. Ο μικροβιακός μεταβολισμός παράγει λιπαρά οξέα, κετόνες και αλκοόλες, οι οποίες παρουσιάζουν ποικιλία φρουτώδους και γλυκιάς οσμής. Η παραγωγή υδρόθειου, μεθυλοσουλφιδίου και διμεθυλοσουλφιδίου εμφανίζει θειούχες ενώσεις (Scotia, 2011). Είναι πλέον γνωστό ότι ο σχηματισμός αμινών, συμπεριλαμβανομένων των μη πτητικών, όπως οι βιογενείς αμίνες (BA) και των πτητικών αμινών (VAs), όπως η τριμεθυλαμίνη, οφείλεται στην ενζυματική αποκαρβοξυλίωση συγκεκριμένων αμινοξέων λόγω δραστηριότητας των μικροβιακών ενζύμων (Balamatsia et al., 2007).

Ο ρυθμός αλλοίωσης του κοτόπουλου εξαρτάται και από τις συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών (πηγές θρεπτικών συστατικών, θερμοκρασία, pH, σύνθεση της

ατμόσφαιρας, ενεργότητα νερού). Οι κύριοι μικροβιακοί επιμολυντές των πουλερικών ανήκουν στο γένος των ψευδομονάδων (*Pseudomonas*). Τα συνηθέστερα βακτήρια που υπάρχουν στα πουλερικά είναι τα *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* και τα γαλακτικά βακτήρια. Αυτά τα βακτήρια παράγουν, κατά το μεταβολισμό τους, βιογενείς αμίνες οι οποίες αποτελούν δείκτη αλλοίωσης του κρέατος (Mantlóna et al., 2010). Όσον αφορά το *Campylobacter* στο κρέας πουλερικών είναι γνωστό ως η πιο κοινή τροφική πηγή ανθρώπινης καμπυλοβακτηρίωσης (μέχρι 80% των τροφιμογενών λοιμώξεων). Από το 2011 έως το 2018, αναφέρθηκαν ετησίως πάνω από 200.000 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις καμπυλοβακτηρίωσης από πουλερικά και κρέατα (EFSA, 2018).

Τέλος, οι κύριοι παθογόνοι μικροοργανισμοί που απαντώνται στα πουλερικά είναι οι: *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* και *Listeria monocytogenes* (σε μικρότερο βαθμό) (Mataragas et al., 2008). Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) με αριθμό 2073/2005 (Εικόνα 1.1), ο οποίος καθορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, ως ανώτερο όριο για την *Salmonella spp.* σε σφάγια πουλερικών από κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής και από γαλοπούλες, καθορίζεται η απουσία σε 25 g ομαδοποιημένου δείγματος.

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Πλάνο δειγματοληψίας (*)		Όρια (°)		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (°)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο	Μέτρα σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων
		n	c	m	M			
2.1.5 Σφάγια πουλερικών από κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής και από γαλοπούλες	<i>Salmonella spp.</i> (10)	50 (°)	7 (°) Από 1.1.2012, c = 5 για τα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής Από 1.1.2013, c = 5 για τις γαλοπούλες	Απουσία σε 25 g ομαδοποιημένου δείγματος δέρματος λαιμού		EN/ISO 6579 (για την ανίχνευση)	Σφάγια μετά την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας, της καταγωγής των ζώων και των μέτρων βιοασφάλειας στις εκμεταλλεύσεις καταγωγής

(*) n = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα· c = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεταξύ m και M.

(°) Για τα σημεία 2.1.3 - 2.1.5, m = M.

(°) Χρησιμοποιείται η πιο πρόσφατη έκδοση του προτύπου.

(°) Τα όρια (m και M) ισχύουν μόνο για δείγματα που λαμβάνονται με την κατασκευαστική μέθοδο. Η μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή υπολογίζεται λαμβάνοντας πρώτα τη λογαριθμική τιμή του κάθε επιμέρους αποτελέσματος δοκιμής και στη συνέχεια υπολογίζοντας τη μέση τιμή των εν λόγω λογαριθμικών τιμών.

(°) Τα 50 δείγματα προέρχονται από 10 συνεχόμενες δειγματοληψίες σύμφωνα με τους κανόνες και τις συνθήκες δειγματοληψίας που ορίζει ο παρών κανονισμός.

(°) Ο αριθμός δειγμάτων όπου αναφέρεται απουσία *Salmonella*. Η τιμή c αναθεωρείται προκειμένου να ληφθεί υπόψη η πρόοδος που έχει συντελεστεί στη μείωση του επιπολασμού της *Salmonella*. Τα κράτη μέλη ή οι περιφέρειες που έχουν χαμηλό επιπολασμό *Salmonella* μπορούν να χρησιμοποιούν χαμηλότερες τιμές c ακόμη και πριν από την αναθεώρηση.

(°) Το κριτήριο αυτό δεν εφαρμόζεται στον κίμα που παράγεται λιανικά όταν η διάρκεια διατήρησης του προϊόντος είναι μικρότερη από 24 ώρες.

(°) Το *E. coli* χρησιμοποιείται εδώ ως δείκτης κοπρανόδου μόλυνσης.

(°) Τα κριτήρια αυτά εφαρμόζονται στο μηχανικό διαχωρισμένο κρέας (ΜΔΚ) που παράγεται με τις τεχνικές που αναφέρονται στην παράγραφο 3 του κεφαλαίου III του τμήματος V του παραρτήματος III του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.

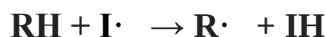
Εικόνα 1.1. Τα μικροβιολογικά κριτήρια για την *Salmonella spp.* σε σφάγια πουλερικών από κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής και από γαλοπούλες σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα

1.3.2 Βιοχημική αλλοίωση

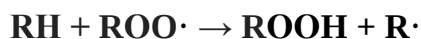
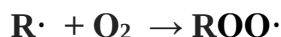
Ένας μεγάλος αριθμός μεταθανάτιων μεταβολών αρχίζουν στο κρέας (γλυκόλυση, πρωτεόλυση και λιπόλυση) αμέσως μετά τη σφαγή των ζώων, οι οποίες είναι κρίσιμες για την ποιότητα του προϊόντος (Hernández-Cázares et al., 2010). Το στρες των ζώων κατά την σφαγή μπορεί να αλλάξει την ακολουθία των μεταθανάτιων βιοχημικών συμβάντων και να μεταβάλει τις φυσικοχημικές και βιοχημικές παραμέτρους στο κρέας του στήθους κοτόπουλου, όπως αναφέρουν οι Aparesida et al., (2018).

Η αυτοξείδωση των λιπιδίων και η παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι φυσικές διεργασίες οι οποίες επηρεάζουν τα λιπαρά οξέα και οδηγούν σε οξειδωτική αλλοίωση του κρέατος και ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών. Μετά τη σφαγή των ζώων, τα λιπαρά οξέα στους ιστούς υφίστανται οξείδωση και εμποδίζονται οι μεταβολικές διεργασίες. Ο μηχανισμός της αυτοξείδωσης των λιπιδίων περιλαμβάνει τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό (Scotia, 2011; Pateiro et al., n.d.).

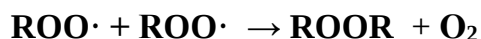
Έναρξη : Ο εκκινητής ($I\cdot$), αποσπά ένα μόριο υδρογόνου από ένα λιπαρό οξύ και έτσι προκύπτει η ελεύθερη ρίζα του λιπαρού οξέος ($R\cdot$) ως εξής:



Διάδοση : Οι ρίζες αυτές, παρουσία οξυγόνου μετατρέπονται σε υπεροξυ-ρίζες, οι οποίες αντιδρούν με άλλα μόρια λιπιδίων και σχηματίζουν υδροϋπεροξειδία ($ROOH$) και νέες ελεύθερες ρίζες ως εξής:



Τερματισμός : Ο τερματισμός λαμβάνει χώρα όταν αυτές οι ελεύθερες ρίζες αλληλοεπιδρούν για να σχηματίσουν μη ριζικά προϊόντα ως εξής:



Η αυτοξείδωση των λιπιδίων είναι μια αυτοκαταλυόμενη αντίδραση και οι αντιδράσεις διάδοσης επαναλαμβάνονται ταχύτατα. Αυτή η αντίδραση στο κρέας, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η σύνθεση των λιπαρών οξέων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι πιο ευαίσθητα στην οξείδωση των λιπιδίων. Τα υδροϋπεροξειδία παράγονται λόγω της οξείδωσης των λιπιδίων των υψηλά ακόρεστων λιπαρών οξέων των μεμβρανικών φωσfolιπιδίων, τα οποία είναι επιρρεπή σε περαιτέρω οξείδωση. Η διάσπασή τους προκαλεί δευτερογενή προϊόντα αντίδρασης όπως αλδεϋδες, οξέα και κετόνες τα οποία μπορούν να επηρεάσουν το χρώμα, την υφή και την γεύση του κρέατος, την ασφάλεια του καθώς και τη θρεπτική του αξία εξαιτίας των επιδράσεων στο λίπος, στις χρωστικές ουσίες, στις πρωτεΐνες, στους υδατάνθρακες και στις βιταμίνες (Scotia, 2011).

Η βιοχημική αλλοίωση εκτός από την οξειδωτική τάγγιση οφείλεται και στα ενδογενή ένζυμα. Οι ενζυμικές δράσεις υπάρχουν φυσικά στα μυϊκά κύτταρα των ζώων αφού έχουν σφαγεί και είναι η κύρια αιτία της αρχικής υποβάθμισης του κρέατος. Διάφορες κατηγορίες ενζύμων προκαλούν αυτολυτικά φαινόμενα που ξεκινούν αμέσως μετά τον θάνατο του ζώου και περιλαμβάνουν την πρωτεόλυση και υδρόλυση του λίπους, οι οποίες

αποτελούν προϋπόθεση για μικροβιακή αποσύνθεση (Scotia, 2011). Στο κρέας, η υδρόλυση των λιπιδίων μπορεί να λάβει χώρα ενζυματικά ή μη ενζυματικά. Η ενζυματική υδρόλυση των λιπών λαμβάνει χώρα από τη δράση των λιπασών. Τα ένζυμα αυτά υπάρχουν στο δέρμα, στο αίμα και στους ιστούς των ζώων. Κατά τη διάρκεια της λιπόλυσης, οι λιπάσες διασπούν τις τριακυλογλυκερόλες και σχηματίζονται ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ταγγισμένη γεύση. Τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στην υδρόλυση λιπιδίων κρέατος είναι η φωσφολιπάση A1 και η φωσφολιπάση A2 (Toldra, 2006).

Μετά τον θάνατο του ζώου, ο μυς είναι ακόμα μαλακός και πραγματοποιείται αναερόβια γλυκόλυση του γλυκογόνου προς γλυκόζη και γαλακτικό οξύ. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει διότι η κυκλοφορία του αίματος έχει πλέον σταματήσει και οι μύες δεν τροφοδοτούνται με οξυγόνο. Η ταχεία μεταθανάτια γλυκόλυση και οι υψηλές τιμές του pH είναι αποτέλεσμα του στρες στο οποίο υποβλήθηκε το πουλερικό πριν και κατά τη διάρκεια της σφαγής. (Aliani et al., 2013). Μία από τις σημαντικότερες αλλαγές συνίσταται στο σχηματισμό μεταβολιτών νουκλεοτιδίων και νουκλεοσιδίων που προκύπτουν από την υδρόλυση του ATP (Toldrá, 2006). Σύμφωνα με τους Nychas et al., (2007) η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και ορισμένα αμινοξέα που ακολουθούνται από νουκλεοτίδια, ουρία και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες καταβολίζονται από σχεδόν όλα τα βακτήρια της μικροχλωρίδας του κρέατος. Αυτές οι ενώσεις είναι οι βασικές πηγές ενέργειας για την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο κρέας, παρά την αμελητέα ποσότητα τους σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες και μπορούν να επηρεάσουν το ποσοστό αλλοίωσης.

Το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) που είναι παρόν κατά κύριο λόγο σε ζωντανούς ιστούς, διασπάται, στα μεταθανάτια στάδια, προς 5-μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP). Ο ρυθμός διάσπασης εξαρτάται από την θερμοκρασία και την κατάσταση του ζώου. Το παραγόμενο IMP αποσυντίθεται με αργό ρυθμό, μέσω διαδοχικών σταδίων, προς υποξανθίνη (Hx) ενώ ενδιάμεσα παράγεται και ινοσίνη (Ino) (Belitz et al., 2009; Hernández-Cázares et al., 2010). Η παραγωγή του γαλακτικού οξέος, σε συνδυασμό με την απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων από την υδρόλυση του ATP διαμορφώνει τελικά το pH της σάρκας. Το γαλακτικό οξύ που σχηματίζεται κατά τη γλυκόλυση παραμένει στον μυ μειώνοντας το pH από 6,5 σε λιγότερο από 5,8. Περισσότερα για την υδρόλυση του ATP αναφέρονται σε επόμενο κεφάλαιο (βλ. 1.4.1).

Στη συνέχεια, το κρέας γίνεται σκληρό και άκαμπτο. Το στάδιο αυτό ονομάζεται νεκρική ακαμψία (rigor mortis) και οφείλεται στην έλλειψη του ATP ώστε να διασπαστεί το σύμπλοκο ακτινομυοσίνης. Η αναερόβια γλυκόλυση σταματά, λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων γλυκογόνου. Η έναρξη της νεκρικής ακαμψίας παρατηρείται στο κοτόπουλο μέσα σε 2- 4 ώρες (Belitz et al., 2009) και το pH μειώνεται σημαντικά.

Η περαιτέρω γήρανση (σίτεμα) του κρέατος, για βελτίωση της τρυφερότητας και σχηματισμό αρώματος, εξαρτάται από το είδος του ζώου, την θερμοκρασία αλλά και τα ένζυμα που έχουν απελευθερωθεί κατά τη διαδικασία αυτή. Κατά το σίτεμα παρατηρείται μικρή αύξηση του pH και λαμβάνουν χώρα διεργασίες που έχουν πρωτεολυτική φύση. Η πρωτεόλυση των μυοϊνιδίων, μαλακώνει το κρέας, αποδυναμώνοντας τους ενδομυϊκούς

δεσμούς. Τα πρωτεολυτικά συστήματα που συμμετέχουν είναι δύο: οι σαρκοπλασματικές καλπαΐνες και οι λυσοσωματικές καθεψίνες B,L και D. Οι καθεψίνες μπορούν να αποικοδομήσουν τις μυϊκές πρωτεΐνες σε αμινοξέα ή μικρά πεπτίδια ενώ οι καλπαΐνες, οι οποίες θεωρείται ευρέως ότι διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην πρωτεόλυση, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των μυϊκών κυττάρων, ενεργοποιούνται παρουσία ασβεστίου και αποικοδομούν τις δομικές πρωτεΐνες (στην περιοχή των Z μυοϊνιδίων) συμβάλλοντας έτσι στην τρυφεροποίηση της σάρκας. Το ασβέστιο που απελευθερώνεται μετά τον θάνατο του ζώου από τον ενδοπλασματικό κυτταρικό ιστό ενεργοποιεί τα ένζυμα αυτά (Belitz et al., 2009).

1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΦΡΕΣΚΟΤΗΤΑΣ

Ο προσδιορισμός της φρεσκότητας και της αλλοίωσης του κρέατος είναι σημαντικός για τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων με βάση το κρέας και απαιτούνται επειγόντως απλές και γρήγορες μέθοδοι εκτίμησης. Οι φυσικές, χημικές, μικροβιολογικές μετρήσεις και η οργανοληπτική αξιολόγηση είναι οι κυριότερες παραδοσιακές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της φρεσκότητας του κοτόπουλου. Ωστόσο, για την οργανοληπτική αξιολόγηση απαιτείται εμπειρικό προσωπικό, ενώ οι άλλες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένων των μικροβιολογικών μετρήσεων και των χημικών μεθόδων, είναι σχετικά χρονοβόρες και επίπονες (Khulal et al., 2016). Οι τεχνολογίες ανίχνευσης που εφαρμόζονται για την αυθεντικότητα των τροφίμων βασίζονται κυρίως σε φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές τεχνικές (Gallo & Ferranti, 2016). Έχουν αναφερθεί διάφορες τεχνικές, κάποιες από τις οποίες περιγράφονται παρακάτω και περιλαμβάνουν χημικούς δείκτες όπως το ολικό πτητικό βασικό άζωτο, την αμμωνία, τα πτητικά οξέα, την τριμεθυλαμίνη και τις αμίνες αλλά και προϊόντα αποικοδόμησης νουκλεοτιδίων όπως η υποξανθίνη και η τιμή K. Ωστόσο, το αρχικό στάδιο της σήψης του κρέατος είναι δύσκολο να μετρηθεί ικανοποιητικά από αυτούς τους δείκτες. (Okuma et al., 2000). Νέες μέθοδοι για γρήγορη εκτίμηση της φρεσκότητας του κρέατος είναι ζωτικής σημασίας για την αντιμετώπιση της αυξανόμενης παγκόσμιας ζήτησης προϊόντων με βάση το κρέας (Johnson et al., 2019).

Οι σύγχρονες τεχνικές προάγουν την ταχεία επεξεργασία των δειγμάτων, την εύκολη αυτοματοποίηση, την υψηλή αναπαραγωγιμότητα και τη μείωση της κατανάλωσης οργανικών διαλυτών. Εν αντιθέσει, οι παραδοσιακές τεχνικές είναι συνήθως χρονοβόρες, κάποιες από αυτές δεν έχουν αποτελεσματικότητα στην εξαγωγή των αναλυτών στόχων και απαιτούν μεγάλους όγκους μη φιλικών προς το περιβάλλον οργανικών διαλυτών. Οι μέθοδοι παραδοσιακής στερεής-υγρής εκχύλισης (SLE) περιλαμβάνουν την εκχύλιση Soxhlet, τη διαβροχή, τη διήθηση, την εκχύλιση με στροβιλισμό (ανάμειξη υψηλής ταχύτητας) και την χρήση υπερήχων. Αντίθετα, η εκχύλιση υπό πίεση (PLE), γνωστή ως επιτάχυνση της εκχύλισης με διαλύτη (ASE), εκχύλιση με βοήθεια μικροκυμάτων (MAE), εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE) και διαφορετικοί τύποι μικροεκχύλισης υγρού-υγρού (LLME) είναι νέες, αποδοτικές διεργασίες εκχύλισης που σέβονται το περιβάλλον (Vazquez-roig & Picó, 2015).

1.4.1 Νουκλεοζίτες και νουκλεοτίδια

Οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια έχουν άμεση συμμετοχή στον μεταβολισμό άλλων ουσιών μέσω διαφορετικών βιοχημικών διεργασιών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα νουκλεοτίδια συνεισφέρουν στη φρεσκότητα των κρέατων αλλά και των ιχθυρών. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, το ATP στο κρέας μπορεί να υποβαθμιστεί από διάφορα ένζυμα σε μια σειρά από συναφή προϊόντα που επιδεινώνουν τη γεύση και το χρώμα του κρέατος (Li et al., 2017). Τα προϊόντα που σχετίζονται με το ATP περιλαμβάνουν την 5'-μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP), την 5'-διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), καθώς και τα προϊόντα αποικοδόμησης όπως την ινοσίνη (Ino), την υποξανθίνη (Hx), την αδενοσίνη, την ξανθίνη (Xt) και την αδενίνη (Howgate, 2006). Η συγκέντρωση του IMP αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό και παραμένει υψηλή, εν αντιθέσει με τα ATP, ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) και AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη), τα οποία αποδομούνται ταχέως (Aliani et al., 2013).

Το IMP είναι το κύριο συστατικό γεύσης στο κρέας και τα ψάρια. Ωστόσο, είναι ασταθές στους μυς και μπορεί να διασπαστεί περαιτέρω σε Ino και Hx, η συγκέντρωση των οποίων αυξάνεται σταδιακά μετά τη σφαγή. Μεταξύ των προϊόντων αποικοδόμησης του IMP, η Ino και Hx έχουν πικρή γεύση και παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλαγές γεύσης του κρέατος κατά την συντήρηση (Li et al., 2017). Επομένως, το IMP έχει καταστεί ένας σημαντικός δείκτης για τη μέτρηση της φρεσκότητας του κρέατος. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση αυτών των ενώσεων έχει προταθεί ως μια γρήγορη και απλή μέθοδος για τον προσδιορισμό της ποιότητας του κρέατος ή χρησιμοποιείται ως δείκτης της φρεσκότητας του κρέατος.

1.4.2 Δείκτης K

Η χρήση δεικτών για την αξιολόγηση της φρεσκότητας των κρεάτων ή των ψαριών είναι ελκυστική επειδή είναι ποσοτικής φύσης, αντικειμενική και εύκολα μετρήσιμη. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) μόνη της δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης φρεσκότητας επειδή αποικοδομείται γρήγορα σε IMP, Ino και Hx. Συνεπώς, η προσοχή εστιάστηκε στην πρόβλεψη της φρεσκότητας με τον προσδιορισμό των σχετικών αναλογιών των ενώσεων της αποικοδόμησης του ATP μέσω του δείκτη K. Ο δείκτης K, που προτάθηκε αρχικά για την αξιολόγηση της φρεσκότητας των ψαριών, απεδείχθη ότι μπορεί να εφαρμοστεί στη μέτρηση της φρεσκότητας και του κρέατος (Park et al., 2000) και ορίζεται ως ο λόγος του αθροίσματος των συγκεντρώσεων της υποξανθίνης και της ινοσίνης και της συνολικής συγκέντρωσης των σχετικών με ATP ενώσεων. Καθώς υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της τιμής K και της οργανοληπτικής αξιολόγησης, η τιμή K χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης της φρεσκότητας ψαριών αλλά και πουλερικών (Okuma et al., 2000). Υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$K(\%) = \frac{100 \times (Ino + Hx)}{ATP + ADP + AMP + IMP + Ino + Hx}$$

1.4.3 Ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N)

Ένας άλλος δείκτης μικροβιολογικής αλλοίωσης του κοτόπουλου είναι τα υψηλά επίπεδα του ολικού πτητικού βασικού αζώτου (TVB-N), π.χ. αμμωνίας, διμεθυλαμίνης (DMA) και τριμεθυλαμίνης (TMA) (Rukchon et al., 2014). Το περιεχόμενο του TVB-N στο κρέας του κοτόπουλου αποτελεί χημικό δείκτη για τη μέτρηση της αλλοίωσης καθώς όσο αυξάνεται το περιεχόμενο, τόσο αυξάνεται και η μικροβιακή αλλοίωση. Οι ενώσεις που αποτελούν το TVB-N παράγονται από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών λόγω ενζυμικής αποικοδόμησης και μικροβιακής δράσης. Συνεπώς, η συνολική ποσότητα του TVB-N είναι ένας από τους καλύτερους δείκτες της αποσύνθεσης του νωπού κρέατος και των πουλερικών (Li et al., 2019).

1.4.4 Βιογενείς αμίνες

Οι βιογενείς αμίνες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (Lázaro et al., 2009) που βρίσκονται σε πολλά διαφορετικά προϊόντα διατροφής όπως σε προϊόντα κρέατος. Μια μικρή ποσότητα βιοαμινών επαρκεί για να διατηρηθεί η σωστή φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών, αλλά οι υπερβολικές ποσότητες μπορούν να οδηγήσουν σε αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Μικροβιακά και ενδογενή ένζυμα αποικοδομούν και αποκαρβοξυλιώνουν τα ελεύθερα αμινοξέα για τον σχηματισμό βιοαμινών ή άλλων δευτερογενών μεταβολιτών (Wen et al., 2019). Η παρουσία των βιογενών αμινών επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων (Mantlová et al., 2010), καθώς είναι στενά συνδεδεμένες με την ανάπτυξη των βακτηρίων. Επειδή η περιεκτικότητα σε βιοαμίνες μπορεί να αντανakλά το βακτηριακό περιεχόμενο, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της αλλοίωσης των τροφίμων και της διάρκειας ζωής των ζωικών προϊόντων (Conte-júnior et al., 2015). Οι βιοαμίνες περιλαμβάνουν τις ισταμίνη, καδαβερίνη, τυραμίνη, πουτρεσκίνη και τρυπταμίνη και οι πρόδρομες ενώσεις αυτών είναι η ιστιδίνη, λυσίνη, τυροσίνη, ορνιθίνη και τρυπτοφάνη (Πίνακας 1.1) (Wen et al., 2019). Για παράδειγμα, η πουτρεσκίνη και η καδαβερίνη που σχηματίζονται ενζυματικά με αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης και της λυσίνης, αντίστοιχα, έχουν προταθεί ως ένας πολύ χρήσιμος δείκτης για το στάδιο της αρχικής αποσύνθεσης του χοιρινού κρέατος, του βοδινού αλλά και του κοτόπουλου (Okuma et al., 2000).

Πίνακας 1.1: Κύριες βιογενείς αμίνες και οι πρόδρομες ενώσεις τους

Βιογενείς αμίνες	Πρόδρομη ένωση
Ισταμίνη	Ιστιδίνη
Πουτρεσκίνη	Ορνιθίνη
Καδαβερίνη	Λυσίνη
Τυραμίνη	Τυροσίνη
Τρυπταμίνη	Τρυπτοφάνη
β- Φαινυλαιθυλαμίνη	Φαινυλαλανίνη

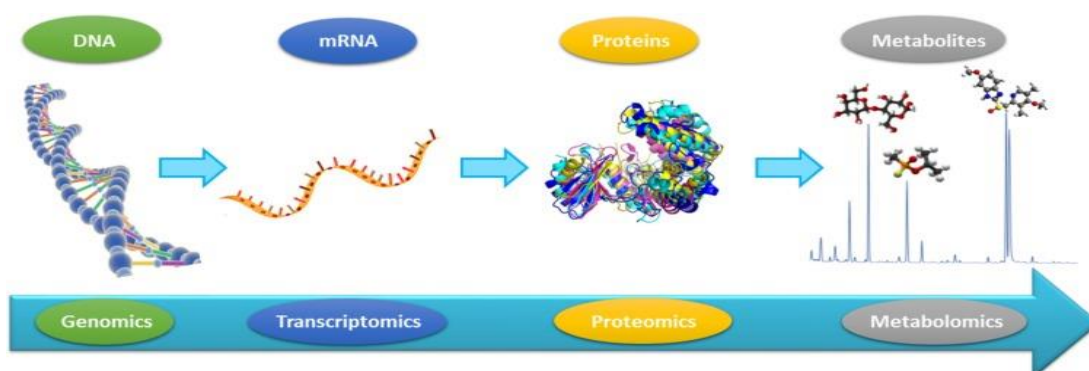
1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ

1.5.1 Γενικά στοιχεία

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια για την αντικατάσταση των παραδοσιακών μεθόδων με άλλες, όπως η μεταβολωμική, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην έρευνα για τη διάγνωση νόσων (Janeckova et al., 2015), για φυτά (Schwahn et al., 2013), αλλά και για την έρευνα του μικροβιακού μεταβολισμού (Lechtenfeld κ.ά., 2015). Η εφαρμογή της μεταβολωμικής στην επιστήμη των τροφίμων βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, αλλά αναπτύσσεται γρήγορα ώστε να γίνει η τεχνολογία επιλογής για την επίλυση πολλών σημαντικών προβλημάτων (Wen et al., 2019).

Ως μεταβολωμική (metabolomics), ορίζεται η τεχνολογία που μελετά το σύνολο των ενδιάμεσων προϊόντων των μεταβολικών διαδικασιών (μεταβολίτες) ποιοτικά και ποσοτικά, που μεταβάλλονται ανάλογα με την φυσιολογία, την παθολογική και την εξελικτική κατάσταση του κυττάρου, ιστού, οργάνου ή οργανισμού. Η μεταβολωμική είναι ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο πεδίο στη βιολογία συστημάτων. Ο σημαντικός ρόλος της μεταξύ άλλων "omics" βασίζεται στην ικανότητα να εντοπίζονται αλλαγές στους μεταβολίτες που εμφανίζονται σε κυτταρικό επίπεδο (Εικόνα 1.2). Οι μεταβολίτες είναι χημικές ουσίες, μικρού μοριακού βάρους (<1500 Da), που προκύπτουν από χημικές αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται κυρίως από ένζυμα. Το σύνολο των μεταβολιτών ενός βιολογικού οργανισμού ονομάζεται μεταβόλωμα και μπορεί να αποτελείται από διάφορες κατηγορίες ενώσεων όπως σάκχαρα, λιπίδια, αμινοξέα, αμίνες, στεροειδή, φαινολικά συστατικά, καροτενοειδή, αλκαλοειδή και πτητικά συστατικά (Vinaixa et al., 2016). Αυτά τα μικρά μόρια αντιπροσωπεύουν το αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ της γενετικής μιας κληρονομιάς και των πολλαπλών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (Mastrangelo et al., 2015).

Οι μεταβολίτες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τους πρωτογενείς και τους δευτερογενείς. Οι πρωτογενείς συνδέονται άμεσα με την φυσιολογική ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των οργανισμών, ενώ οι δευτερογενείς δεν συνδέονται άμεσα με αυτές τις διαδικασίες, όμως παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του οργανισμού με το περιβάλλον (Mastrangelo et al., 2015).



Εικόνα 1.2. Οι ολιστικές αναλυτικές τεχνολογίες -omics . Πηγή :Gonzalez-riano et al., (2016)

Η μεταβολωμική έρχεται να συμπληρώσει τις βιοχημικές πληροφορίες που λαμβάνονται από τα γονίδια (genomics), τα μεταγραφήματα (transcriptomics) και τις πρωτεΐνες (proteomics) και να συνδέσει την γονιδιακή λειτουργία με τον φαινότυπο ενός οργανισμού (Fiehn, 2002). Περιλαμβάνει τη μέτρηση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, συμπεριλαμβανομένων των ενδογενών και εξωγενών μορίων αλλά και υποστρώματα χημικών αντιδράσεων εντός βιολογικών συστημάτων. Ένα πείραμα με την τεχνική της μεταβολωμικής αντικατοπτρίζει άμεσα το μεταβολικό προφίλ και οδηγεί στην ανίχνευση μεταβολιτών οι οποίοι δίνουν ουσιαστικές πληροφορίες σχετικά με την υποκείμενη βιολογική κατάσταση του εν λόγω συστήματος (Xiaojing Liu & Locasale, 2017).

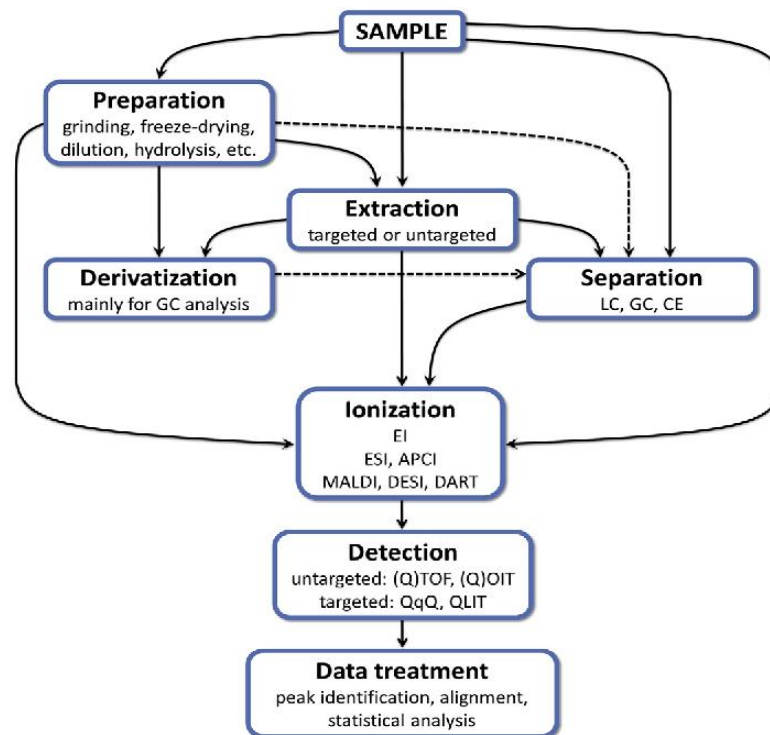
Η μεταβολωμική σε σχέση με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνολογίες -omics, παραμένει λίγο πίσω, κάτι το οποίο ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι ο αριθμός των μεταβολιτών ποικίλλει δραματικά και παρουσιάζονται μεγάλες αποκλίσεις σε φυσικοχημικό επίπεδο (Field, 2004). Ωστόσο, ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματά της μεταβολωμικής είναι η στενή δυναμική σχέση που υπάρχει μεταξύ των μεταβολιτών καθώς περιλαμβάνει όλα τα επίπεδα της κυτταρικής ρύθμισης (Viant, 2007).

Υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις στην μεταβολωμική: η στοχευμένη (targeted) και η μη στοχευμένη (untargeted) ανάλυση. Ο λόγος αυτής της διαφοροποίησης οφείλεται στους διάφορους τύπους δεδομένων που παράγονται σε αυτές τις δύο προσεγγίσεις, οι οποίοι πρέπει να αντιμετωπιστούν ανάλογα. Η στοχευμένη ανάλυση επικεντρώνεται στην έρευνα μιας μικρής συνήθως ομάδας γνωστών μεταβολιτών και χρησιμοποιείται κυρίως για την μελέτη συγκεκριμένων ομάδων χημικών ενώσεων και το πώς αυτές μεταβάλλονται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μη στοχευμένη ανάλυση περιλαμβάνει μια αμερόληπτη ανάλυση όλων των ενδογενών μεταβολιτών επιτρέποντας μια πιο ολοκληρωμένη αξιολόγηση των μεταβολωμικών προφίλ, χωρίς να είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων ουσιών (Fiehn, 2016; Gorrochategui et al., 2016; Gao et al., 2018).

1.5.2 Αναλυτικές τεχνικές

Η μεταβολωμική ανάλυση περιλαμβάνει τα στάδια της προετοιμασίας των δειγμάτων, του διαχωρισμού και της ανίχνευσης των μεταβολιτών και της επεξεργασίας των δεδομένων (Εικόνα 1-2).

- Η προετοιμασία των στερεών κυρίως δειγμάτων, περιλαμβάνει την άλεση υπό υγρό άζωτο (για την αδρανοποίηση του μεταβολισμού), την λυοφιλίωση (που ελαχιστοποιεί τις πιθανές διαφορές στους μεταβολίτες λόγω της διαφορετικής περιεκτικότητας σε υγρασία) και την εκχύλιση (η οποία στοχεύει στη μεγιστοποίηση της ποσότητας και της συγκέντρωσης των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν). Επιπλέον, περιλαμβάνει την παραγωγοποίηση των μεταβολιτών όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως αναλυτική τεχνική η αέρια χρωματογραφία/φαρματομετρία μαζών (GC/MS). Η παραγωγοποίηση χρησιμοποιείται πριν από την ανάλυση GC, προκειμένου να αυξηθεί η πτητικότητα των αναλυόμενων ουσιών και συνήθως είναι μια διαδικασία δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αντίδραση του αρχικού μείγματος μεταβολιτών με διάλυμα υδροχλωρικής μεθοξυαμίνης (Ο-μεθυλοϋδροξυλαμίνη) σε πυριδίνη έτσι ώστε από τις καρβονυλικές ομάδες να σχηματιστούν οι αντίστοιχες οξίμες, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η κυκλοποίηση των αναγόντων σακχάρων και να προστατεύονται τα α-κετοξέα από την αποκαρβοξυλίωση. Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης αντίδρασης, πραγματοποιείται το δεύτερο στάδιο της σιλυλίωσης, με την χρήση αντιδραστηρίων (όπως το Ν-μεθυλο-Ν-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθοροακεταμίδιο MSTFA) που οδηγούν στην παραγωγή περισσότερο πτητικών, μη πολικών τριμεθυλοσιλυλιωμένων προϊόντων TMS. Ο σχηματισμός παραγώγου TMS περιλαμβάνει την αντικατάσταση των δραστικών ατόμων υδρογόνου (-H) στις λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου, καρβοξυλίου και αμίνης (-OH, -COOH, NH₂) με την ομάδα TMS (Kanani & Klapa, 2007; Cevallos-cevallos et al., 2009; Fiehn, 2016).
- Ο διαχωρισμός των μεταβολιτών πραγματοποιείται με τεχνικές διαχωρισμού όπως η υγρή χρωματογραφία (LC), η αέρια χρωματογραφία (GC) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) και η ανίχνευση τους, πραγματοποιείται μετά από την σύνδεση των τεχνικών αυτών με τεχνικές ανίχνευσης όπως η φασματομετρία μάζας (MS), ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) και η υπέρυθη φασματοσκοπία (FTIR) (Cevallos-cevallos et al., 2009).
- Η επεξεργασία των δεδομένων στη μεταβολωμική των τροφίμων πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό με διάφορα εργαλεία χημειομετρίας (βλ. 1.5.3) (Cevallos-cevallos et al., 2009).



Εικόνα 1.2 Στάδια μεταβολωμικής ανάλυσης. Πηγή : Cajka et al., (2016)

Η επιτυχής εφαρμογή της μεταβολωμικής απαιτεί αναλυτικά όργανα που προσφέρουν υψηλή απόδοση, ανάλυση, αναπαραγωγικότητα και ευαισθησία (Field, 2004). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τον προσδιορισμό (ποιοτικό και ποσοτικό) των μεταβολιτών είναι οι GC/MS, LC/MS και NMR (Πίνακας 1.2). Η GC/MS οδηγεί σε: διαχωρισμό των ισομερών, ακριβέστερη ποσοτικοποίηση, μείωση των επιδράσεων της μήτρας και καταστολή των ιόντων. Η GC/MS επιτρέπει την ανίχνευση χαμηλού μοριακού βάρους πτητικών ενώσεων. Αντίθετα, δεν μπορούν να αναλυθούν θερμοευαίσθητες ή μη πτητικές ενώσεις και μερικές φορές μπορεί να ανιχνεύονται άγνωστες ενώσεις που στην πραγματικότητα είναι θόρυβος (artifacts) που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της θερμής έγχυσης και του διαχωρισμού (Fiehn, 2016).

Πίνακας 1.2. Σύγκριση τεχνικών μεταβολωμικής ανάλυσης (Kowalczyk et al., 2020)

Αναλυτική τεχνική	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
LC/MS	Υψηλή ευαισθησία και ανάλυση, απλή επεξεργασία δείγματος, ανάλυση μεταβολιτών από διαφορετικές κατηγορίες	Συχνά δύσκολη ταυτοποίηση, χαμηλή επαναληψιμότητα στους χρόνους κατακράτησης, ευαίσθητη στην επίδραση της μήτρας
GC/MS	Καλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, υψηλή διαχωριστική ικανότητα, επαναληψιμότητα στους χρόνους κατακράτησης, απλοποιημένη αναγνώριση με δημόσιες και εμπορικές βάσεις δεδομένων	Απαιτείται παραγωγοποίηση, μόνο για θερμικώς σταθερούς, πτητικούς ή εν δυνάμει πτητικούς μεταβολίτες, αργή μέθοδος
NMR	Πολύ απλή επεξεργασία δείγματος, μεγάλη επαναληψιμότητα	Απαιτείται μεγάλη ποσότητα δείγματος, ευαίσθητη στην παρουσία αλάτων στο δείγμα, ακριβή μέθοδος

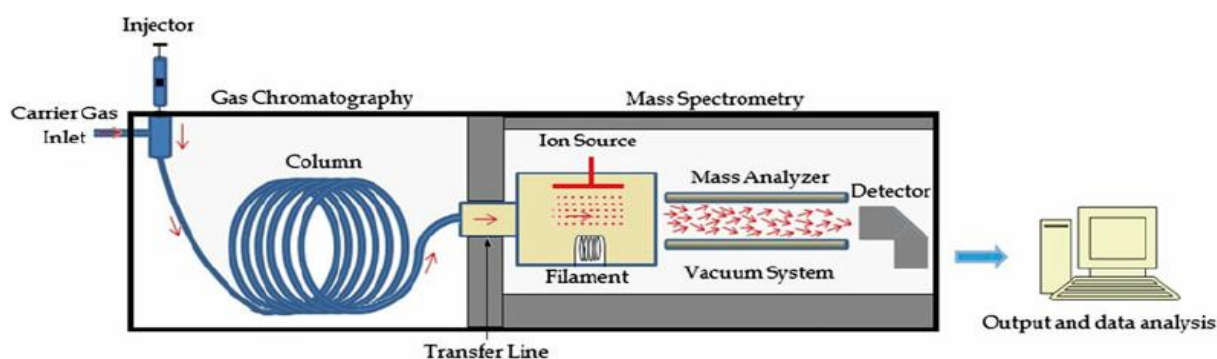
Η συνηθέστερη πηγή ιόντων στην GC/MS είναι η πηγή ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI). Αυτή είναι μια «σκληρή» πηγή, δηλαδή οδηγεί σε εκτεταμένη θραύση του μορίου και παράγει εξαιρετικά αναπαραγώγιμα φάσματα μαζών (Mastrangelo et al., 2015). Η LC/MS αποτελεί παρόμοια τεχνική αλλά καταλληλότερη για την ανάλυση θερμοευαίσθητων, μη πτητικών, μη πολικών (χρωματογραφία αντίστροφης φάσης) ή πολικών (χρωματογραφία κανονικής φάσης) ενώσεων στις φυσικές τους μορφές και η NMR χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση ευρέως φάσματος οργανικών ενώσεων, αλλά περιορίζεται σε μεταβολίτες που στο μόριό τους περιέχουν ένα τουλάχιστον άτομο υδρογόνου. Τα αμινοξέα, οι βιταμίνες, οι θειόλες, οι υδατάνθρακες, τα πεπτίδια, τα νουκλεοτίδια και τα νουκλεοσίδια έχουν μετρηθεί χρησιμοποιώντας NMR αρκετά συχνά (Kowalczyk et al., 2020).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η GC/MS (Εικόνα 1.3). Όπως αναφέρθηκε οι ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές προκειμένου να διαχωριστούν με αέρια χρωματογραφία. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μέσα στην χρωματογραφική στήλη με τον εξής τρόπο: το μείγμα εισάγεται σε αέρια μορφή και στη συνέχεια, συμπαρασύρεται από την κινητή φάση η οποία είναι το φέρον αέριο (αδρανές) και κινείται μέσα στη στήλη, η οποία περιέχει την υγρή στατική φάση (που συγκρατείται σε αδρανές στερεό υπόστρωμα). Η κατανομή των αναλυτών μεταξύ των δύο φάσεων πραγματοποιείται ανάλογα με την σχετική τους συγγένεια με τη στατική φάση, και επομένως, διαχωρίζονται και εκλύονται συναρτήσει του χρόνου (χρόνος κατακράτησης). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια των αναλυτών με την

στατική φάση, τόσο πιο αργά θα κινηθεί ο αναλύτης στην στήλη και ως εκ τούτου, θα εκλουστεί αργότερα.

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρία μαζών (MS) όπου βασίζεται στον ιοντισμό μορίων και στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων. Ο διαχωρισμός των παραγόμενων φορτισμένων σωματιδίων γίνεται με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) και η κύρια μέθοδος ιοντισμού που χρησιμοποιείται είναι ο ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI). Μετά ακολουθεί ο αναλυτής μαζών όπου χρησιμοποιείται κυρίως ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (quadrupole) ή φίλτρο μαζών, όπου για κάθε τιμή της έντασης του πεδίου μόνο ιόντα με συγκεκριμένο m/z περνούν από το τετράπολο και τα υπόλοιπα παρεκκλίνουν από την πορεία τους. Τα ιόντα κατάλληλου m/z προσκρούουν στον ανιχνευτή και προκαλούν την εκπομπή περισσότερων ηλεκτρονίων. Ως αποτέλεσμα, έχουμε την ενίσχυση του σήματος και τελικώς, την συλλογή του φάσματος μαζών κάθε ουσίας που αποτελεί το δαχτυλικό της αποτύπωμα.

Μετά τον διαχωρισμό λαμβάνεται το χρωματογράφημα, όπου η κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει ιδανικά και ένα διαφορετικό συστατικό του αρχικού μίγματος. Ο χρόνος που εμφανίζεται η κάθε κορυφή χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της ουσίας με βάσεις δεδομένων ενώ το μέγεθος της κορυφής (εμβαδόν ή ύψος) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της.



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση της οργάνολογίας του GC/MS. Πηγή: researchgate.net

1.5.3 Χημειομετρία

Ως χημειομετρία ορίζεται ο επιστημονικός κλάδος με τον οποίο οι αναλυτές αντλούν πληροφορίες από τα δεδομένα διαφόρων χημικών συστημάτων. Επειδή τα μεταβολικά δεδομένα συνήθως αποτελούνται από δεκάδες χαρακτηριστικά (ενώσεις, κορυφές), οι αναλυτές δεδομένων έχουν καταφύγει σε στατιστικές έννοιες και δοκιμές γνωστές ως στατιστικές πολλαπλών μεταβλητών που χρησιμοποιούν ταυτόχρονα ανάλυση μιας ή περισσότερων εξαρτημένων μεταβλητών έναντι δύο ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών. Με άλλα λόγια η χημειομετρία περιλαμβάνει τη χρήση πολυμεταβλητών στατιστικών μεθόδων για την απόκτηση έγκυρων συμπερασμάτων από μεγάλα σύνολα δεδομένων (Putnik et al., 2019).

Πρόσφατα, οι βιομηχανίες τροφίμων άρχισαν να χρησιμοποιούν την χημειομετρία για την αντιμετώπιση του προβλήματος της νοθείας σε τρόφιμα και των ανησυχιών του κοινού σχετικά με την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη επεξεργασία παραμέτρων για διάφορες συνθήκες και πρώτες ύλες και για την επίλυση άλλων προβλημάτων σχετικά με την επιστήμη των τροφίμων (Danzeis et al., 2016).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην χημειομετρία μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τις μη επιβλεπόμενες (unsupervised) και τις επιβλεπόμενες (supervised). Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα στις ακόλουθες τέσσερις πλευρές: κάλυψη του μεταβολίτη, ποσοτική αξιοπιστία, προσπάθεια για την κατασκευή μεθόδων και πολυπλοκότητα της επεξεργασίας δεδομένων. Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνήθως για να διερευνήσουν την συνολική δομή ενός συνόλου δεδομένων, εντοπίζοντας τάσεις και ομαδοποιήσεις στο σύνολο των δεδομένων. Αυτές οι μέθοδοι συμβάλλουν στην αμερόληπτη προβολή των δεδομένων. Οι επιβλεπόμενες τεχνικές χρησιμοποιούνται κυρίως για τον ακριβή προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση μιας συγκεκριμένης ομάδας μεταβολιτών ή μερικών ενδιαμέσων μεταβολιτών. Υποστηρίζουν εκ των προτέρων γνωστές δομές δεδομένων σε πρότυπα και κανόνες για την πρόβλεψη νέων δεδομένων (Cao et al., 2020; Yi et al., 2016).

Για την επεξεργασία των δεδομένων με την μεταβολωμική χρησιμοποιούνται συχνά η μέθοδος της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA, principal components analysis) και η μέθοδος της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA, partial least squares discriminant analysis).

- Η PCA είναι μια μη επιβλεπόμενη μέθοδος ομαδοποίησης ή ταξινόμησης. Είναι, δηλαδή, μια μέθοδος οπτικοποίησης των δεδομένων από τον πολυδιάστατο στο γεωμετρικό τρισδιάστατο χώρο, έτσι ώστε να γίνονται πιο κατανοητά τα αποτελέσματα και τα ευρήματα και δημιουργεί νέες μεταβλητές μη συσχετιζόμενες που καλούνται κύριες συνιστώσες (PC), χρησιμοποιώντας γραμμικούς συνδυασμούς των μεταβολιτών που εντοπίστηκαν, ενώ μεγιστοποιείται και η διακύμανση του δείγματος. Ξεκινάει με τη δημιουργία του πίνακα των δεδομένων όπου σειρές του πίνακα είναι τα δείγματα που εξετάστηκαν και οι στήλες του είναι οι εξεταζόμενες μεταβλητές. Οι νέοι άξονες είναι κάθετοι μεταξύ τους έτσι ώστε οι συντεταγμένες των παρατηρήσεων να είναι οι τιμές των κύριων συνιστωσών. Η πρώτη συνιστώσα περιγράφει τη μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων. Η δεύτερη συνιστώσα εξηγεί τη δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση, δηλαδή τη μέγιστη διαφοροποίηση της διακύμανσης που δεν μπορεί να εξηγήσει η πρώτη συνιστώσα, και εν συνεχεία επαναλαμβάνεται η διαδικασία με τις υπόλοιπες συνιστώσες (Cevallos-cevallos et al., 2009; Mastragelo et al., 2015; Dudzik et al., 2018; Xia & Wishart, 2011; Θεοδωρίδης, n.d.).
- Η PLS-DA είναι μια επιβλεπόμενη μέθοδος ομαδοποίησης ή ταξινόμησης Αυτό σημαίνει ότι χρησιμοποιούνται προηγούμενες γνώσεις σχετικά με τις κατηγορίες (Y) κατά τη διαδικασία της ταξινόμησης. Η PLS-DA προβάλλει τις μεταβλητές (X) σε

ένα χώρο λίγων διαστάσεων που μεγιστοποιεί τον διαχωρισμό μεταξύ των διαφόρων ομάδων δεδομένων στις πρώτες διαστάσεις (που ονομάζονται επίσης λανθάνουσες μεταβλητές). Αυτές οι λανθάνουσες μεταβλητές κατατάσσονται από το πόσο καλά εξηγούν τη διακύμανση του Y . Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη όταν πρέπει να αναλυθεί μεγάλος αριθμός ανεξάρτητων μεταβλητών (Xia & Wishart, 2011).

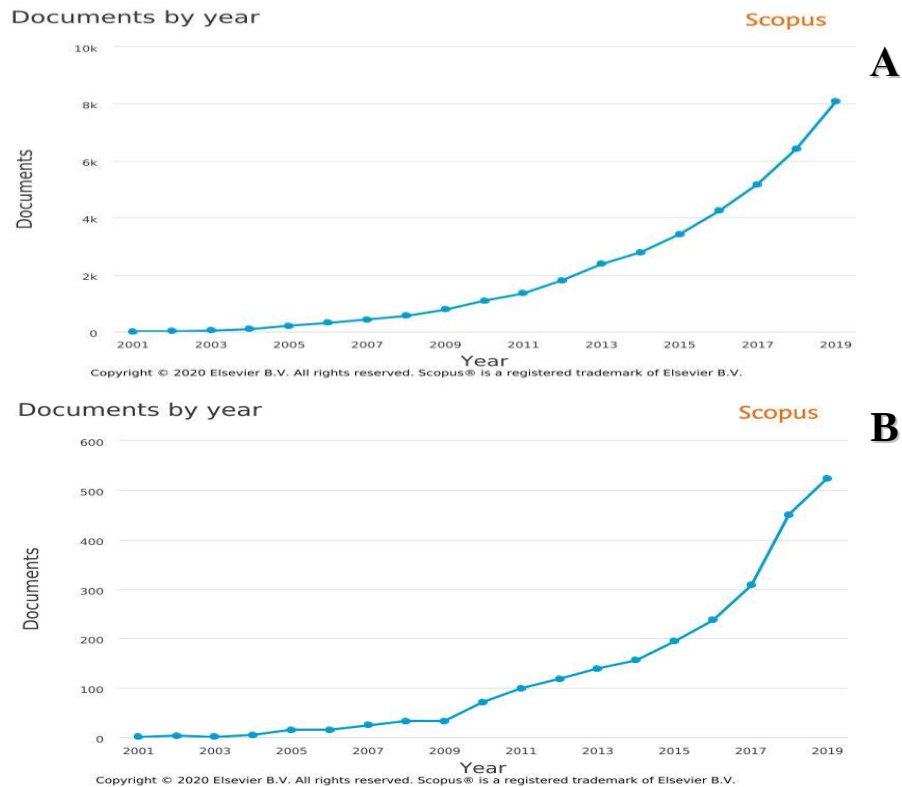
1.5.4 Εφαρμογή της μεταβολωμικής στον τομέα των τροφίμων

Οι δυνατότητες χρήσης της μεταβολωμικής στον τομέα των τροφίμων είναι μάλλον περιορισμένες, δεδομένου ότι η προσέγγιση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ως επί το πλείστον σε τομείς κλινικής και φαρμακευτικής έρευνας (Lytou et al., 2017).

Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία η μεταβολωμική έχει γίνει μια σημαντική μεθοδολογική προσέγγιση στον τομέα της επιστήμης των τροφίμων. Συνδυάζει εργαλεία αναλυτικής χημείας που χρησιμοποιούνται στην ασφάλεια των τροφίμων, όπως η υγρή χρωματογραφία και η αέρια χρωματογραφία με την φασματομετρία μαζών και παρέχει πολυάριθμες εφαρμογές στη μελέτη των μολυσματικών παραγόντων και των μεταβολιτών στα τρόφιμα που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για διάφορα θέματα όπως η ασφάλεια των τροφίμων ή οι νοθείες τροφίμων (Romero-gonza & Frenich, 2019).

Η ασφάλεια των τροφίμων συνεπάγεται διάφορα ζητήματα, συμπεριλαμβανομένης της νομοθεσίας σχετικά με την παρουσία επιλεγμένων ενώσεων σε τρόφιμα που ενδέχεται να βρίσκονται κάτω από ορισμένα όρια, την ανίχνευση μικροβιακής αλλοίωσης, περιβαλλοντικών μολυσματικών ουσιών καθώς και απαγορευμένων ενώσεων ή φυσικών τοξινών (Romero-gonza & Frenich, 2019). Συνεπώς, η μεταβολωμική προσέγγιση αποτελεί μια λύση για την εξασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, έτσι ώστε οι επιμολυντές να παρακολουθούνται ώστε να ικανοποιούν τη ζήτηση των καταναλωτών (Gallart-Ayala et al., 2015).

Η μεταβολωμική μπορεί επίσης να βρει εφαρμογή για τη βελτίωση της παραγωγής, της συντήρησης και της μεταφοράς των τροφίμων σε βιομηχανική κλίμακα. Ειδικότερα, η ανίχνευση νοθευμένων προϊόντων στα τρόφιμα εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι ορισμένες χημικές ουσίες ή ορισμένες συγκεντρώσεις χημικών ουσιών είναι αρκετά χαρακτηριστικές για ορισμένα είδη εκχυλισμάτων και ελαίων, όπως επίσης και η διάκριση μεταξύ προϊόντων διατροφής με επιθυμητά χαρακτηριστικά, τα οποία διαφορετικά δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την γεύση, το άρωμα ή το χρώμα (όπως η περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά, αυξημένη περιεκτικότητα σε βιταμίνες) και γίνονται ανιχνεύσιμα με τη μεταβολωμική. Επομένως, η συνεισφορά της μεταβολωμικής είναι πάρα πολύ σημαντική για τον τομέα των τροφίμων και σε βιομηχανικό επίπεδο (Krastanov, 2014). Η αυξητική πορεία των μελετών με χρήση μεταβολωμικής κατά την διάρκεια των ετών, σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, στον τομέα των τροφίμων, παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.2.



Σχήμα 1.2 Ο αριθμός των δημοσιευμένων άρθρων σχετικά με τον σχεδιασμό πειραμάτων με τη μέθοδο της μεταβολωμικής ανάλυσης (A) γενικά στα τρόφιμα και (B) ειδικά στην μελέτη των πουλερικών από το έτος 2001 έως το έτος 2019 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του Scopus

1.5.5 Συνεισφορά της μεταβολωμικής στην μελέτη των πουλερικών

Οι μελέτες της μεταβολωμικής για την εκτίμηση της αλλοίωσης και της αξιολόγησης της ποιότητας συγκεκριμένα του φιλέτου από στήθος κοτόπουλου είναι ελάχιστες. Η μεταβολωμική έχει διαδραματίσει βασικό ρόλο στην ανακάλυψη διατροφικών δεικτών γενικά στα κρέατα αλλά και στα πουλερικά, έχει χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση της νοθείας και της αυθεντικότητας των προϊόντων κρέατος (Surowiec et al., 2011), στην ανίχνευση ουσιών επικινδύνων για την ανθρώπινη υγεία μετά από βρώση ζωικών προϊόντων που τις περιέχουν και επομένως, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της ασφάλειας των πουλερικών αλλά και των προϊόντων τους (Lytou et al., 2017).

Συγκεκριμένα, η μελέτη των Surowiec et al., (2011) οι οποίοι χρησιμοποίησαν δείγματα από διαφορετικά είδη κρέατος (χοιρινό, μοσχάρι, κοτόπουλο), κατέδειξε ότι μπορεί να γίνει χρήση της μεταβολωμικής ανάλυσης με την τεχνική της GC/MS για την ανίχνευση μηχανικώς διαχωρισμένου κρέατος (MSM, Mechanically Separated Meat) που παράγεται με μηχανική κατεργασία των υπολειμμάτων και αναμειγνύεται σε προϊόντα με βάση το κρέας. Έτσι, επελέγησαν ενώσεις που θα μπορούσαν να είναι δυνητικοί δείκτες για την ανίχνευση των προϊόντων MRM σε εμπορικά προϊόντα.

Επιπλέον, ο σκοπός της μελέτης των Lytou et al., (2017), ήταν η διερεύνηση της επίδρασης σπιτικών μαρινάδων στην παρεμπόδιση της αλλοίωσης φιλέτων στήθους κοτόπουλου και η διερεύνηση παραμέτρων ποιότητας μέσω της μεταβολωμικής. Πράγματι, μέσω της επιλογής διαφόρων οργανικών οξέων (βασίζόμενοι στο γεγονός ότι αυτά τα οξέα περιέχονταν στα κύρια συστατικά μαρινάδων) και με την τεχνική της HPLC κατέληξαν ότι η μεταβολωμική μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα μέσω της εκτίμησης αλλαγών που μπορεί να προκληθούν από την αλληλεπίδραση οξέων με τον ιστό του κρέατος.

Επιπρόσθετα, οι Cajka et al., (2013) ανέπτυξαν μία ταχεία μέθοδο για την ανάπτυξη μεταβολωμικών δακτυλικών αποτυπωμάτων μυών κοτόπουλου και ζωοτροφών χρησιμοποιώντας την τεχνική της άμεσης ανάλυσης σε πραγματικό χρόνο συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (DART-MS, Direct Analysis in Real Time-Mass spectrometry), ώστε να διαφοροποιήσουν το κρέας κοτόπουλου με βάση μικρές διαφορές στη διατροφή για να αναπτύξουν ένα μοντέλο μέσω του οποίου θα μπορούσε να ανιχνευτεί η νοθεία ζωοτροφών με χρήση ζωικών υποπροϊόντων, με σκοπό τη διατροφή ενός είδους με μεταποιημένη ζωική πρωτεΐνη προερχόμενη από τα σώματα ή μέρη σωματών ζώων του ίδιου είδους.

Αναφερόμενοι στην ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών που μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα υπολείμματα σε βρώσιμους ζωικούς ιστούς, οι οποίοι αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, οι Hermo et al., (2013) χρησιμοποίησαν την μεταβολωμική με χρήση LC/MS, για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών και των προϊόντων μετασχηματισμού στο μυελού κοτόπουλου από αντιβιοτικά της οικογένειας β-λακταμών. Επίσης, οι Abasht et al., (2016) προσδιόρισαν μεταβολίτες με την χρήση των τεχνικών GC/MS και LC-MS/MS χρησιμοποιώντας δείγματα μυϊκού ιστού στήθους κοτόπουλου προσβεβλημένων λόγω μυοπάθειας "Wooden Breast" και μη προσβεβλημένων κοτόπουλων για τον εντοπισμό βιοδεικτών και την παροχή πληροφοριών για αλλοιωμένες βιοχημικές διεργασίες που συμβάλλουν στη σκλήρυνση των ιστών που σχετίζεται με αυτή την μυοπάθεια σε εμπορικά κοτόπουλα.

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Επί του παρόντος, χρησιμοποιούνται κυρίως μικροβιολογικές και οργανοληπτικές αναλύσεις για την ποσοτική εκτίμηση της αλλοίωσης και της ασφάλειας των τροφίμων, κυρίως των ζωικής προέλευσης προϊόντων. Οι αναλύσεις αυτές δεν μπορούν πλέον να θεωρηθούν ως οι καταλληλότερες, αφού είναι χρονοβόρες, υψηλού κόστους και απαιτούν έμπειρο ανθρώπινο δυναμικό. Η μεταβολωμική ανάλυση αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο για την εκτίμηση της αλλοίωσης των ζωικών προϊόντων και η χρήση αυτής της μεθόδου αναμένεται να επεκταθεί στη βιομηχανία τα επόμενα χρόνια, κυρίως στους τομείς της αυθεντικότητας και του ποιοτικού ελέγχου. Οι βιομηχανίες κρεατοπαραγωγής θα μπορούσαν να επωφεληθούν μέσω της διερεύνησης της θρεπτικής αξίας και της προέλευσης των

προϊόντων αλλά και μέσω των επιπτώσεων που μπορεί να έχουν οι συνθήκες συντήρησης και οι μέθοδοι επεξεργασίας στο τελικό προϊόν.

Ωστόσο, στη διεθνή βιβλιογραφία είναι ελάχιστες οι μελέτες μεταβολωμικής για την εκτίμηση της αλλοίωσης και της αξιολόγησης της φρεσκότητας του κρέατος και ειδικότερα του φιλέτου από στήθος κοτόπουλου. Ως εκ τούτου, η παρούσα μελέτη στοχεύει στην εφαρμογή της μεταβολωμικής για τον προσδιορισμό του πολικού κλάσματος μεταβολιτών σε φιλέτο στήθους κοτόπουλου με χρήση GC/MS για την απόκτηση γνώσης σχετικά με την αντικειμενική εκτίμηση της ασφάλειας και ποιότητας του φιλέτου στήθους κοτόπουλου, η οποία στη συνέχεια θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τη δημιουργία απλών και πρακτικών βιοδεικτών για άμεση εφαρμογή στη βιομηχανία.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Για την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, χορηγήθηκαν δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου της εταιρείας KOTINO AEBE από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, τα οποία είχαν συντηρηθεί σε 4 θερμοκρασίες: 0°C, 5 °C, 10 °C και 15 °C. Κατά την διάρκεια της συντήρησης ελήφθησαν δείγματα σύμφωνα με τον Πίνακα 2-1. Σε κάθε θερμοκρασία, το πείραμα της συντήρησης επαναλήφθηκε τέσσερις φορές. Ως εκ τούτου, συλλέχθηκαν συνολικά 28 δείγματα ανά θερμοκρασία καθώς και το σημείο 0 που αντιστοιχούσε στην ημερομηνία παραλαβής των φιλέτων στο εργαστήριο.

Πίνακας 2.1. Σημεία δειγματοληψίας ιστού από στήθος κοτόπουλου κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 0, 5, 10 και 15 °C

Θερμοκρασία /Ωρες συντήρησης	0°C	5 °C	10°C	15 °C
Σημείο 0	0	0	0	0
Σημείο 1	48	24	24	10
Σημείο 2	120	48	48	24
Σημείο 3	168	96	72	30
Σημείο 4	240	120	96	48
Σημείο 5	288	168	120	72
Σημείο 6	384	216	168	96
Σημείο 7	432	288	192	120

2.2 ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου αλέστηκαν σε μύλο ξηρής άλεσης με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Κατόπιν, ζυγίστηκε ποσότητα περίπου 100 mg ($\pm 0,1$ mg) σε φιαλίδια Eppendorf των 2 mL με βιδωτό πώμα, στα οποία είχαν προστεθεί δύο ανοξείδωτα σφαιρίδια (διαμέτρου 2,5 mm). Τα Eppendorf με τα κομμάτια του ιστού, εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο για μερικά δευτερόλεπτα ώστε να ανασταλεί η μεταβολική δραστηριότητα και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ GC/MS

Υλικά – Σκεύη

- Πλαστικά Eppendorf (2 mL) με βιδωτό πώμα και o-ring
- Σφαιρίδια από ανοξείδωτο ατσάλι, διαμέτρου 2,5 mm
- Δοχείο με ξηρό πάγο
- Μηχανικές πιπέτες (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 20 μ L)
- Φιαλίδια για GC με κωνικά inserts
- Ογκομετρικές φιάλες
- Δοχείο με υγρό άζωτο

Συσκευές

- Αναλυτικός ζυγός, METTLER AE200
- Ομογενοποιητής BeatBeater
- Κυκλοαναδευτήρας (Vortex), VELP Scientifica
- Φυγόκεντρος, Heraeus Biofuge pico
- Συσκευή λυοφιλίωσης, UNICRYO MC 4L, UNIEQUIP
- Θερμοθάλαμος με ταυτόχρονη ανάδευση
- Σύστημα Shimadzu GCMS QP-2010 Ultra

Αντιδραστήρια – Διαλύτες

- Υδατικό διάλυμα ευτεριωμένης γλυκίνης (Glycine-d5, SIGMA-ALDRICH) συγκέντρωσης 300 mg/mL, ως εσωτερικό πρότυπο
- Μεθανόλη, $\geq 99,8\%$, Honeywell
- Απεσταγμένο νερό
- Χλωροφόρμιο, CHCl_3 99,0-99,4% (GC), SIGMA-ALDRICH
- Πυριδίνη, άνυδρη 99,5%, ACROS
- Υδροχλωρική μεθοξαμίνη, 98+ %, ACROS ORGANICS
- N-Μεθυλο-N-(τριμεθυλοσιλυλο)-τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA), 97%, ALFA AESAR

2.3.1 Εκχύλιση πολικών μεταβολιτών από τον ιστό κοτόπουλου

Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1 v/v), το οποίο απαερώθηκε με αέριο N_2 και ψύχθηκε στους -18°C . Στα φιαλίδια Eppendorf που περιείχαν 100 mg αλεσμένου ιστού, προστέθηκαν 20 μL εσωτερικού προτύπου (γλυκίνη-d5, 300 $\mu\text{g/mL}$) και 800 μL από το μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$. Τα φιαλίδια ανά οκτώ τοποθετήθηκαν στον υποδοχέα του ομογενοποιητή BeatBeater σε υψηλή ταχύτητα (ένταση 3), για δύο λεπτά και αφού απομακρύνθηκαν από τον ομογενοποιητή τοποθετήθηκαν σε δοχείο με ξηρό πάγο. Ακολούθησε η προσθήκη 400 μL H_2O και ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 15-20 sec.

Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 10.000 rpm, ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (υδατική-χλωροφορμική). Από την υπερκείμενη πολική φάση (υδατική) ελήφθησαν 100 μL και μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf με προ-τρυπημένα πώματα. Παράλληλα, από κάθε εκχύλισμα, ελήφθησαν 100 μL από την πολική φάση και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο falcon (15 mL) για την προετοιμασία του ενοποιημένου δείγματος ελέγχου ποιότητας (pooled QC) (όπως αναφέρεται παρακάτω). Τα δείγματα καταψύχθηκαν άμεσα και στην συνέχεια ακολούθησε λυοφιλίωση για περίπου 20 ώρες. Στη συνέχεια, τα πώματα αντικαταστάθηκαν με καινούρια και αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

2.3.2 Ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας (QC-pooled sample)

Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης όλων των δειγμάτων κάθε παρτίδας (= τα 28 δείγματα σε κάθε θερμοκρασία συντήρησης), λαμβάνονταν 100 μL από το κάθε εκχύλισμα πολικών μεταβολιτών και μεταφέρονταν σε φιαλίδιο falcon. Επομένως, μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης όλων των παρτίδων δειγμάτων, το ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας (QC) περιείχε ισόποσο εκχύλισμα από κάθε δείγμα που μελετήθηκε (σύνολο 116). Στη συνέχεια, από το δείγμα QC μεταφέρθηκαν 100 μL σε 40 φιαλίδια Eppendorf, και τοποθετήθηκαν στους -80°C .

Τα δείγματα QC είναι αντιπροσωπευτικά των δειγμάτων που αναλύονται και χρησιμοποιούνται σε όλα τα αναλυτικά βήματα της πορείας ώστε να εξασφαλίζεται η ποιότητα της αναλυτικής διαδικασίας (QA) για κάθε ανιχνευόμενο μεταβολίτη (Dunn et al., 2011).

Τα δείγματα QC εφαρμόζονται για τρεις λόγους.

- Ο πρώτος είναι για να διασφαλιστεί η απόκτηση αναπαραγωγίμων δεδομένων.
- Ο δεύτερος λόγος είναι η παροχή δεδομένων για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας της πειραματικής διαδικασίας.
- Ο τρίτος είναι η παροχή δεδομένων που θα χρησιμοποιηθούν για την διόρθωση του σήματος (Dunn et al., 2011).

2.3.3 Παραγωγοποίηση πολικών μεταβολιτών

Τα δείγματα που είχαν υποστεί την διαδικασία της λυοφιλίωσης αφαιρέθηκαν από τους -80°C και αφέθηκαν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου (προς αποφυγή επαναπρόσληψης υγρασίας). Κατόπιν, προστέθηκαν 40 μL διαλύματος μεθοξυαμίνης (20 mg/mL σε άνυδρη πυριδίνη) (η προσθήκη του αντιδραστήριου γίνεται σε κάθε δείγμα ξεχωριστά, πωματίζεται και ακολουθεί η προσθήκη στο επόμενο δείγμα). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοθάλαμο για 90 λεπτά στους 30°C , υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των 90 λεπτών, τα δείγματα αφέθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν για 15 s στις 13.000 rpm. Ακολούθησε προσθήκη 70 μL MSTFA με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Η αντίδραση σιλυλίωσης πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 30 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντριση (Το αντιδραστήριο MSTFA όπως και η

πυριδίνη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του δ/τος μεθοξυαμίνης απαερώθηκαν με αέριο N₂). Μετά την ολοκλήρωση της παραγωγοποίησης, το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη που έφεραν micro-inserts (200 μ L) και πώμα με ελαστικό παρέμβυσμα και επικάλυψη από τεφλόν. Τα φιαλίδια αυτά περιείχαν 2 μ L μίγματος κ-αλκανίων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα (C8-C24) ώστε να προσδιοριστούν οι δείκτες κατακράτησης κατά την ανάλυση των δειγμάτων (Retention Index, RI) και να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση.

Σε κάθε παρτίδα δειγμάτων (Batch) διεξαγόταν λευκός προσδιορισμός (blank) εις διπλούν και ορισμένες επαναλήψεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC). Πιο συγκεκριμένα, για το Batch κάθε θερμοκρασίας, αναλύονταν αρχικά τέσσερα δείγματα QC και ένα δείγμα blank, στη συνέχεια ένα QC για κάθε τέσσερα δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου και ένα ακόμη blank στη μέση της παρτίδας. Επομένως, συνολικά κάθε batch περιελάμβανε 10 δείγματα QC, δύο δείγματα blank και 28 δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου, ταξινομημένα τυχαία. (Παράρτημα Π-1). Σε όλα τα δείγματα, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία με την διαφορά ότι στο λευκό (blank) δεν τοποθετήθηκε ιστός.

2.3.4 Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών

Ο προσδιορισμός των παραγώγων των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών Shimadzu GCMS QP2010 Ultra, με αυτόματο δειγματολήπτη AOC-20s. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα διατηρήθηκε στους 250°C. Η αναλογία διαμοιρασμού (split ratio) διατηρήθηκε στο 1:25 και όγκος έκχυσης ήταν 1 μ L. Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη διαχωρισμού MEGA-5HT (30 x 0,25 mm, df 0,25 μ m). Το φέρον αέριο ήταν ήλιον με σταθερή γραμμική ταχύτητα 36 cm/s.

Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων και της γραμμής μεταφοράς ήταν 250° και 290° C, αντιστοίχως. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών ήταν ιοντισμός ηλεκτρονίων (electron ionization EI), με την ενέργεια ορισμένη στα 70 eV και εύρος μαζών 50-600 m/z. Το λογισμικό καταγραφής ήταν το GCMS Solution (Shimadzu) και τα δεδομένα επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται παρακάτω (βλ. 3.1).

2.3.5 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 4.0 και περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο (Chong et al., 2018; Xia & Wishart, 2016; Xia et al., 2015).

2.4 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Πραγματοποιήθηκε από προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για λόγους σύγκρισης.

Η διαδικασία δειγματοληψίας ήταν η ακόλουθη :

- Αρχικά, από κάθε κομμάτι στήθους λήφθηκαν, ασηπτικώς από την επιφάνεια, 4 κομμάτια διαμέτρου 2,5 cm² και τοποθετήθηκαν σε σακούλα Stomacher.
- Στη συνέχεια, έγινε αραίωση του δείγματος με 100 mL Ringer διαλύματος και ομογενοποιήθηκε με τη χρήση Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 2 λεπτά.
- Τέλος, ακολούθησε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και ο εμβολιασμός με 0.1 mL (για τα θρεπτικά επιφανειακής επίστρωσης) ή 1 mL (για τα θρεπτικά ενσωμάτωσης) από την επιθυμητή αραίωση.
- Τα εμβολιασμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση και στη συνέχεια, έγινε παρατήρηση και καταμέτρηση των μικροοργανισμών.

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μικροβιολογικές αναλύσεις ήταν:

- Plate Count Agar (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση της OMX (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 25 °C για 3 ημέρες.
- *Pseudomonas* Agar Base (LAB108, LAB M., U.K.) με την προσθήκη του επιλεκτικού αντιβιοτικού Ceftrimide-Fusidin-Cephaloridine (Modified C.F.C X108, LAB M, UK), για την καταμέτρηση των *Pseudomonas* spp.. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 25 °C για 2 ημέρες.
- Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base, STAA (Ref. 4020792, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy) με την προσθήκη αντιβιοτικού (Ref. 4240052, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση του *Br. thermosphacta*. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 25 °C για 2 ημέρες.
- Επιλεκτικό υπόστρωμα de Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS (Ref.401728S2, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση των LAB (οξυγαλακτικά βακτήρια). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 30 °C για 3 ημέρες.
- Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση των *Enterobacteriaceae*. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 24 ώρες.
- Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (LAB036) με την προσθήκη chloramphenicol (X209) (LAB M, UK). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 25 °C για 3- 5 ημέρες.

2.5 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκε από προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για λόγους σύγκρισης.

Αποθήκευση δειγμάτων:

Κατά τη δειγματοληψία των πειραμάτων αλλοίωσης φιλέτου στήθους κοτόπουλου λήφθηκε, από κάθε φιλέτο, δείγμα (10-15 g) και τοποθετήθηκε μέσα σε αποστειρωμένο τρυβλίο. Τα δείγματα αυτά αποθηκεύτηκαν στους – 20 °C.

Προετοιμασία δειγμάτων:

Τα δείγματα αποψύχθηκαν για 12 h πριν από τον οργανοληπτικό έλεγχο στους 4 °C. Στη συνέχεια, έγινε η κωδικοποίηση των δειγμάτων και η τοποθέτηση τους στο χώρο διεξαγωγής του οργανοληπτικού ελέγχου.

Οργανοληπτικός έλεγχος:

Πάνελ 14 ατόμων αξιολόγησε τα δείγματα του φιλέτου στήθους κοτόπουλου ως προς την όψη και την οσμή. Η κλίμακα αξιολόγησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 1: επιθυμητό, 2: αποδεκτό, 3: μη αποδεκτό.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΠΡΟ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την GC/MS, επεξεργάστηκαν με την χρήση του λογισμικού MS-Dial (Tsugawa et al., 2015). Το λογισμικό αυτό χρησιμοποιείται αφού μπορεί να μετατρέψει τα αρχικά δεδομένα σε δεδομένα που μπορούν να επεξεργαστούν στατιστικά, καθώς παρέχει ένα διάγραμμα ροής για μη στοχευμένη μεταβολωμική ανάλυση. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, απαιτείται η μετατροπή των αρχείων του λογισμικού Shimadzu στα αντίστοιχα (*ABF) που το λογισμικό MS-Dial μπορεί να διαχειριστεί. Ακολουθεί η επεξεργασία τους, που περιλαμβάνει την αποσυνέλιξη των φασμάτων (deconvolution) και την ευθυγράμμιση (alignment) των χρωματογραφικών κορυφών. Η αποσυνέλιξη πραγματοποιείται ώστε να διαχωριστούν ουσίες οι οποίες συνεκκλούνται. Κατόπιν, οι χρωματογραφικές κορυφές που αντιστοιχούν σε ένα δείγμα ευθυγραμμίζονται με τις αντίστοιχες των υπόλοιπων δειγμάτων με χρήση των δεικτών κατακράτησης (RI). Για την ταυτοποίηση των κορυφών χρησιμοποιήθηκαν οι RI σε συνδυασμό με τον βαθμό ομοιότητας των φασμάτων μάζας πρότυπων ενώσεων και των αντίστοιχων από βιβλιοθήκες δεδομένων φασματομετρίας μαζών (NIST14 και GCMS DB_AllPublic-KovatsRI-VS2). Από την ανωτέρω διαδικασία ανιχνεύθηκαν μεταβολίτες οι οποίοι ταξινομήθηκαν βάσει του RI και προέκυψε πίνακας δεδομένων με τα ύψη του κάθε μεταβολίτη σε κάθε δείγμα. Σύμφωνα με τους Dunn et al., (2011) αφαιρέθηκαν οι μεταβολίτες που εμφανίζονται σε λιγότερο από το 50% των QC δειγμάτων, ουσίες που εμφανίστηκαν στα λευκά δείγματα (προέρχονταν από τα αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν), καθώς και πλασματικές ουσίες (artifacts) που παράγονται (σχεδόν πάντα) από την αποσυνέλιξη των δεδομένων. Κατόπιν, αθροίστηκαν τα ύψη των παραγώγων που αντιστοιχούσαν στο ίδιο μητρικό μόριο. Κλασσικό τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα αμινοξέα, λόγω μη πλήρους παραγωγοποίησης. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελούν τα σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη), όπου για κάθε μητρικό μόριο, σχηματίζονται δύο ισομερή (*syn* και *anti*) λόγω της μεθοξυαμίνωσης, οπότε και προκύπτουν δύο κορυφές στο χρωματογράφημα.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση (normalization) για την διόρθωση του σήματος ώστε να εξαλειφθούν σφάλματα, όπως για παράδειγμα ο θόρυβος (Yi et al., 2016). Το ύψος των κορυφών των μεταβολιτών διαιρέθηκε με την αντίστοιχη μάζα δείγματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση με την χρήση των δειγμάτων QC και το λογισμικό LOWESS. Τέλος, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση όλων των μεταβολιτών στα δείγματα QC και αφαιρέθηκαν από όλα τα δείγματα μεταβολίτες που εμφάνισαν σχετική τυπική απόκλιση (RSD) > 30%. Έτσι, προέκυψε ένας πίνακας μεταβολιτών για κάθε μία από τις τέσσερις θερμοκρασίες, που χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Στο παράρτημα Π-3, δίνεται πίνακας με τους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν και τα αντίστοιχα RI των μεταβολιτών αυτών.

3.2 ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα προ-επεξεργασμένα δεδομένα μεταφορτώθηκαν στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 4.0 και πριν την στατιστική ανάλυση, οι κανονικοποιημένες τιμές των μεταβολιτών λογαριθμήθηκαν και μετασχηματίστηκαν (mean-centered). Τα δείγματα χωρίστηκαν σε 8 κατηγορίες, όπως αναφέρθηκε σε παραπάνω ενότητα, ανάλογα με το χρονικό σημείο δειγματοληψίας ενώ το σημείο 0 αφορά το αρχικό δείγμα που παραλήφθηκε από τη βιομηχανία.

3.2.1 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 0°C

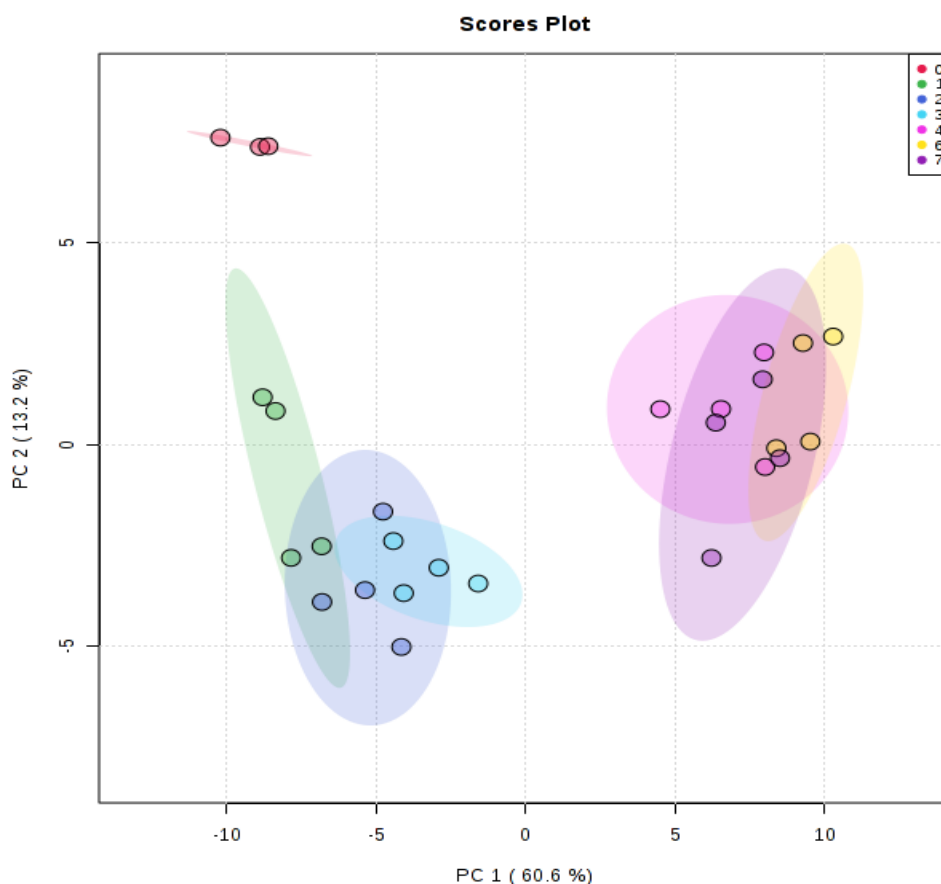
Τα δείγματα της θερμοκρασίας των 0°C, συλλέχθηκαν ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και έτσι προέκυψαν οι 7 κλάσεις του Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Κλάσεις φιλέτου στήθους κοτόπουλου συγκριτικά με τις ώρες συντήρησης στους 0°C.

Κλάσεις*	Σημεία δειγματοληψίας (ώρες συντήρησης)
0	0
1	48
2	120
3	168
4	240
6	384
7	432

* Κάθε ψηφίο συμβολίζει το σημείο δειγματοληψίας. Η κλάση 5 (288 h) αφαιρέθηκε καθώς θεωρήθηκε έκτροπη τιμή

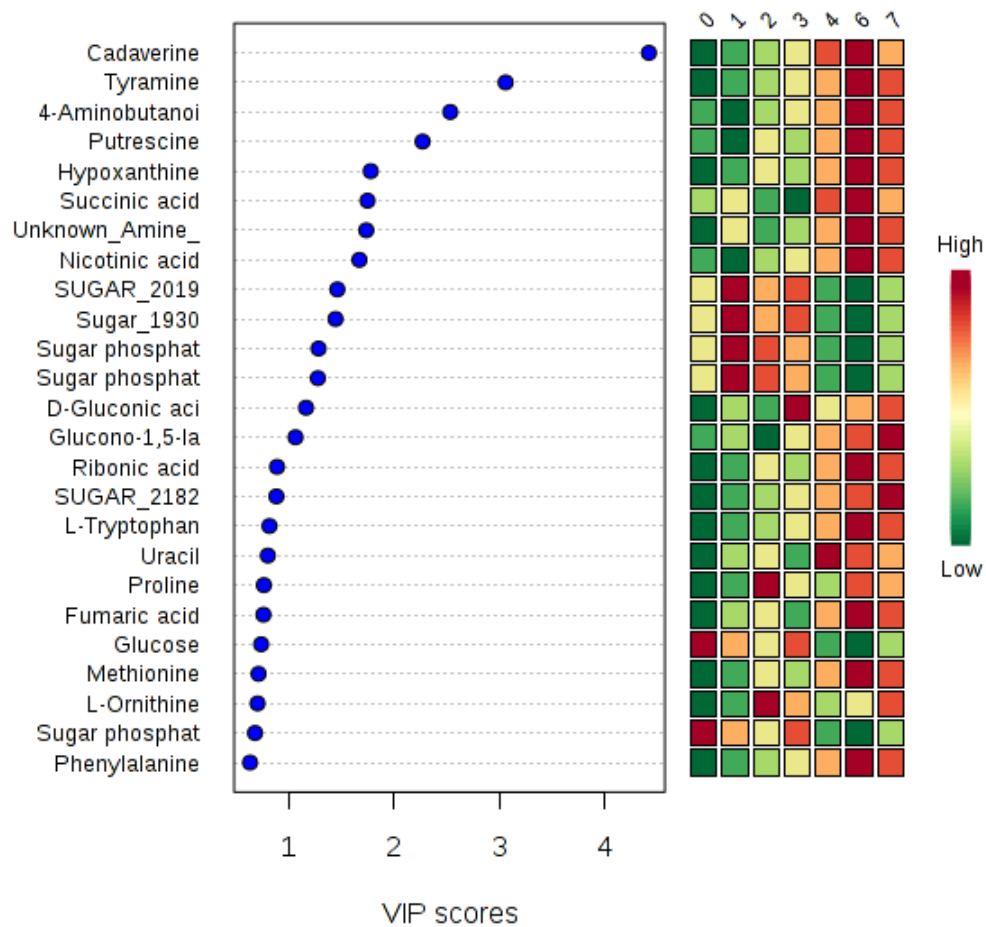
Τα δεδομένα των μεταβολιτών υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και προέκυψε το Διάγραμμα 3.1. Αρχικά, είναι εμφανές ότι τα δείγματα της κλάσης 0 (κόκκινη περιοχή), που αντιστοιχούν σε φρέσκο κοτόπουλο πριν υποβληθεί σε συντήρηση, σχηματίζουν μια συμπαγή ομάδα που απέχει σημαντικά από τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης, τα δείγματα που αντιστοιχούν στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης (από 48 έως 168h συντήρησης: κλάσεις 1-2-3/πράσινη-μπλε-γαλάζια περιοχή), παρουσιάζονται σαφώς διαχωρισμένα από τα δείγματα που λήφθηκαν σε μεταγενέστερα στάδια συντήρησης (από 240h έως 432h συντήρησης: κλάσεις 4-6-7/ροζ-κίτρινη-μωβ περιοχή). Οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν εξηγούν την διακύμανση (73,8%) των αρχικών δεδομένων (X) χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατηγορία που ανήκουν (Y).



Διάγραμμα 3.1. Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (scores plot) για την συντήρηση φιλέτου στήθους κοτόπουλου στους 0°C. Οι κλάσεις (0,1,2,3,4,6,7) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 3.1. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές, αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

Οι τέσσερις πρώτες συνιστώσες από την συγκεκριμένη ανάλυση επεξηγούν το 84,4% της μεταβλητότητας. Επίσης, η συνιστώσα PC1 (που αντιπροσωπεύει το 60,6% της μεταβλητότητας) περιγράφει το χρόνο συντήρησης του κοτόπουλου και κατ' επέκταση την φρεσκότητα των δειγμάτων και δίνει την καλύτερη ομαδοποίηση. Ως ένα είδος μη επιβλεπόμενων μεθόδων (unsupervised), η PCA χρησιμοποιείται γενικά για την καταγραφή της ομαδοποίησης με βάση τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δειγμάτων (Cao et al., 2020).

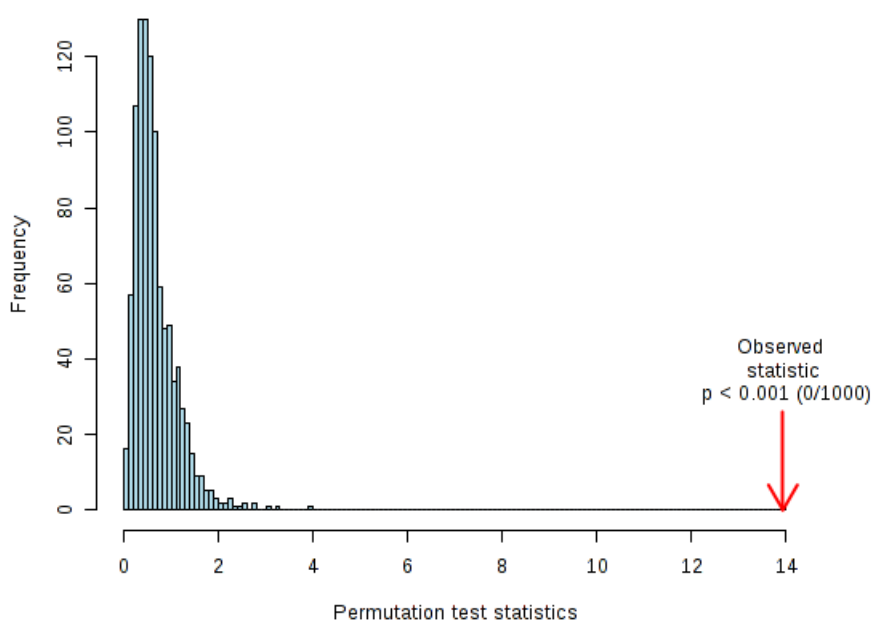
Παρόμοιος διαχωρισμός παρουσιάστηκε όταν τα ίδια δεδομένα υποβλήθηκαν σε PLS-DA. Στο Διάγραμμα 3.2 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι 25 πιο σημαντικοί μεταβολίτες, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores (Variable Importance for Prediction), αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA.



Διάγραμμα 3.2. Οι 25 σημαντικότεροι μεταβολίτες φιλέτου στήθους κοτόπουλου κατά τη συντήρηση στους 0°C που συνεισφέρουν στο μοντέλο PLS-DA. Τα έγχρωμα κελιά στην δεξιά στήλη δείχνουν την διάμεση τιμή της ποσότητας κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κατηγορία που περιγράφεται στον Πίνακα 3-1

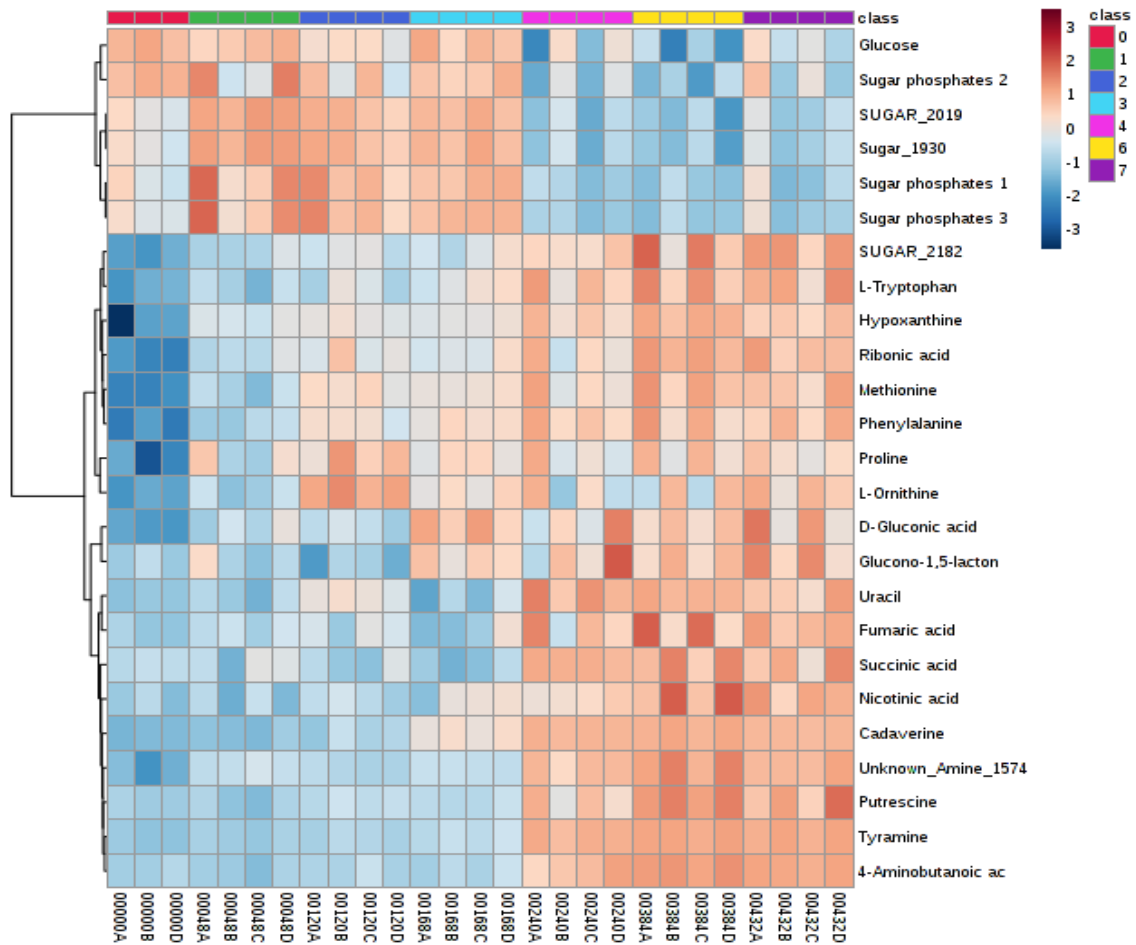
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test) του μοντέλου. Σε αυτή την ανάλυση χρησιμοποιούνται τα ίδια δεδομένα αλλά τα δείγματα τοποθετούνται σε τυχαίους επανασηματισμούς και αναπτύσσεται ένα νέο μοντέλο και αξιολογείται η επίδοσή του. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές (>1000) και συγκρίνεται η επίδοση του αρχικού μοντέλου με τα τυχαία που αναπτύχθηκαν ελέγχοντας αν η διαφορά τους είναι στατιστικώς σημαντική (Fredrickson & Chen, 2019; Bijlsma et al., 2006). Η επίδοση των μοντέλων έγινε με χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/ sum of squares within). Οι λόγοι αυτοί παριστάνονται γραφικά σε ιστόγραμμα, το οποίο ονομάζεται «κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων» (Διάγραμμα 3.3). Όσο πιο μακριά (δεξιά) βρίσκεται ο λόγος B/W του «πραγματικού» μοντέλου, τόσο πιο σημαντική η διάκριση και

επομένως οι διαφορές των κλάσεων του πραγματικού μοντέλου είναι στατιστικά σημαντικές.



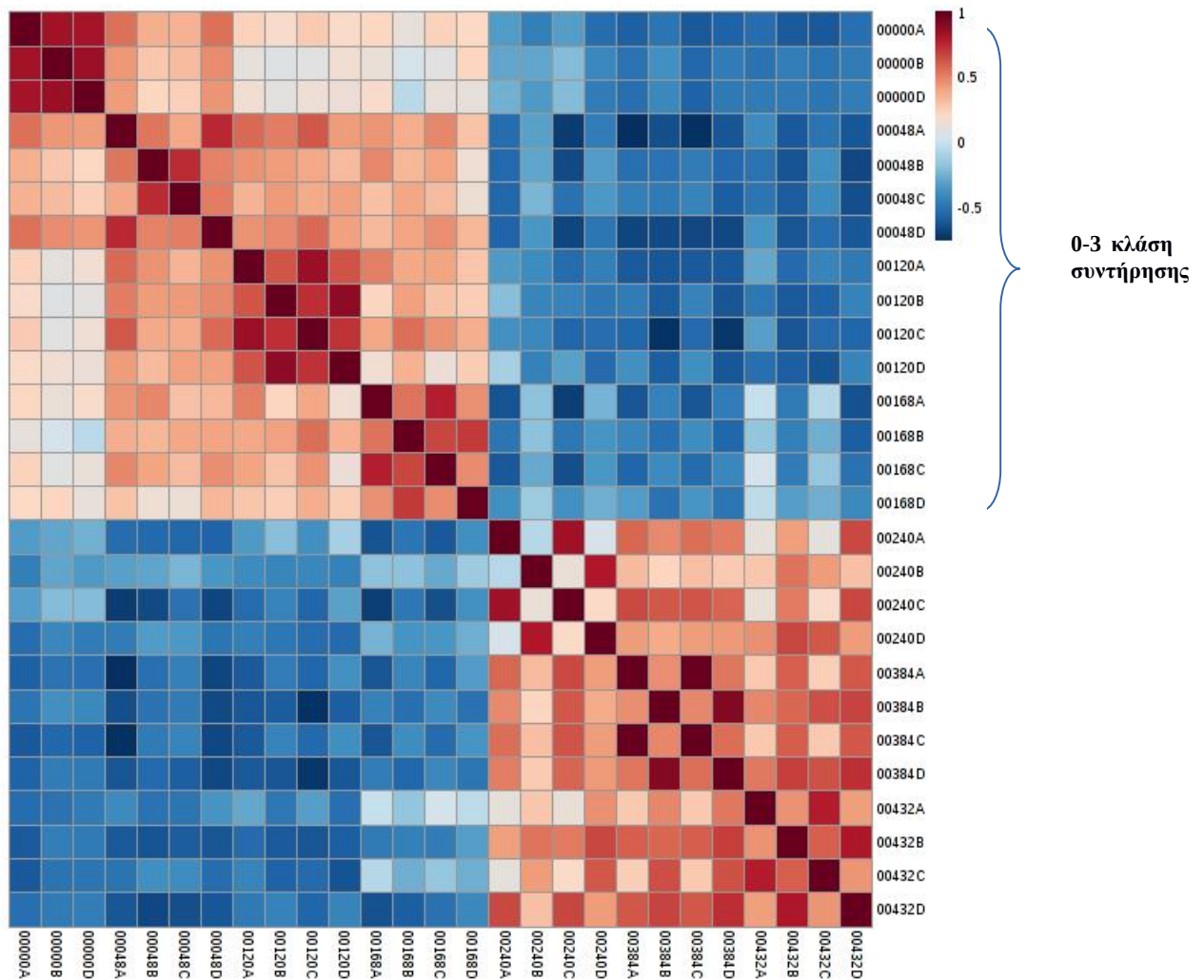
Διάγραμμα 3.3. Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA. Η επίδοση των μοντέλου έγινε με χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within).

Στη συνέχεια, στο Διάγραμμα 3.4 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) υπό την μορφή θερμικού χάρτη (Heatmap). Μέσω των «Heatmaps» γίνεται πιο εύκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων λόγω των μοτίβων που ακολουθούν οι μεταβολίτες ανάμεσα στα δείγματα. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η χαμηλή συγκέντρωση ενός μεταβολίτη, ενώ με κόκκινο συμβολίζεται η υψηλή συγκέντρωση. Επομένως, είναι εύκολο να διαπιστώσει κανείς πως μεταβάλλονται οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες (βάσει των VIP Scores) ανάλογα με τις ημέρες συντήρησης των δειγμάτων. Οι πρώτες 6 ενώσεις (σάκχαρα και παράγωγα σακχάρων) μειώνονται καθώς προχωράει η αλλοίωση (βαίνοντας από την κλάση 0 προς την κλάση 7), ενώ οι υπόλοιπες ουσίες φαίνεται να αυξάνονται κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σε αυτές περιλαμβάνονται κυρίως αμινοξέα, οργανικά οξέα και βιογενείς αμίνες.



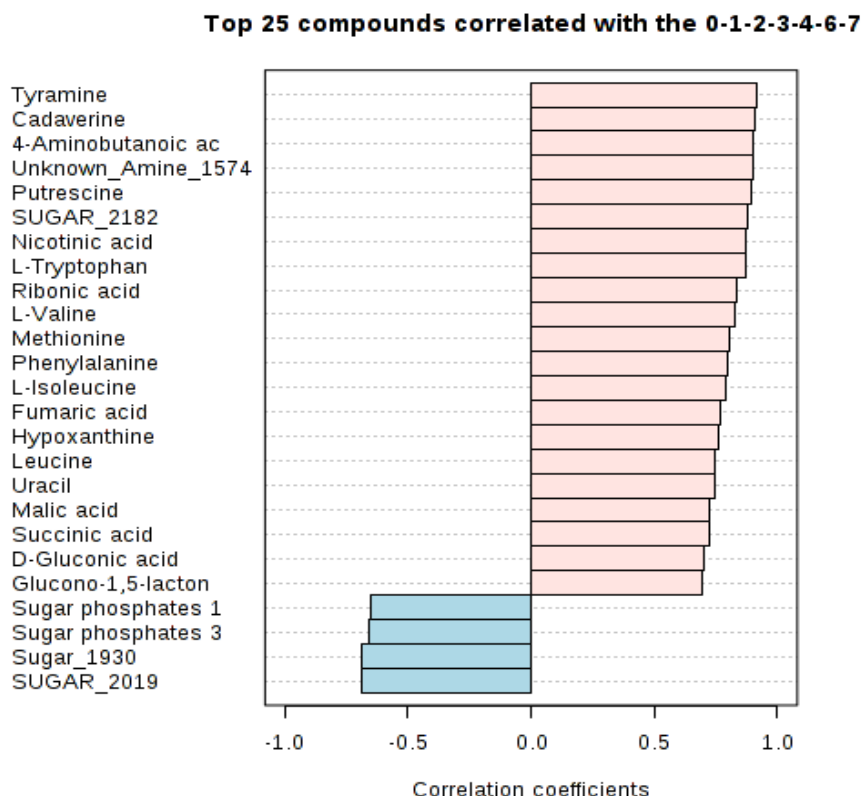
Διάγραμμα 3.4: Θερμικός χάρτης (Heatmap) αποτελεσμάτων HCA που απεικονίζει την ομαδοποίηση των σημαντικότερων μεταβολιτών (βάσει των VIP Scores) μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων δειγμάτων (οι κλάσεις 0-7 περιγράφονται στον Πίνακα 3.1). Τα έγχρωμα κελιά του χάρτη αντιστοιχούν στην σχετική αφθονία κάθε μεταβολίτη. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε χαμηλή σχετική αφθονία και όσο το χρώμα μεταβάλλεται προς το κόκκινο η σχετική αφθονία του μεταβολίτη αυξάνεται.

Στο Διάγραμμα 3.5 απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Δείγματα με αρνητική συσχέτιση συμβολίζονται με μπλε χρώμα, ενώ δείγματα με θετική συσχέτιση συμβολίζονται με κόκκινο. Αυτό που γίνεται εύκολα αντιληπτό είναι ότι τα δείγματα που ανήκουν στις κλάσεις 0-3 και αντιστοιχούν σε χρόνους συντήρησης των φιλέτων από 0h έως 168h (βρίσκονται στο πρώτο ήμισυ μέρος του κάθετου άξονα και αριστερά στον οριζόντιο) παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με αυτά που ανήκουν στις κλάσεις 4-7, οι οποίες αντιστοιχούν σε φιλέτα που είχαν συντηρηθεί από 240-432h (βρίσκονται στο κάτω μέρος του κάθετου άξονα και δεξιά στον οριζόντιο).



Διάγραμμα 3.5: Heatmap που απεικονίζει την συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Η κλίμακα χρώματος αντιπροσωπεύει τους συντελεστές συσχέτισης όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r . Με κόκκινο και μπλε απεικονίζεται η θετική και η αρνητική συσχέτιση, αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, το Pattern Hunter, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την μελέτη, καθώς δίνει την συσχέτιση που μπορεί να έχουν κάποιοι μεταβολίτες, σύμφωνα με ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Το μοτίβο 0-1-2-3-4-6-7 που επιλέχθηκε ώστε να προκύψει το Διάγραμμα 3.6, χρησιμοποιείται για την εύρεση των μεταβολιτών που αυξάνονται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο, σε ένα σύνολο δεδομένων με 7 σημεία (7 κλάσεις δειγμάτων = αριθμός δειγματοληψιών). Μεταβολίτες με ροζ χρώμα εμφανίζουν θετική συσχέτιση (δηλ. αυξάνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση), ενώ αυτοί με γαλάζιο αρνητική (δηλ. μειώνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση).



Διάγραμμα 3.6. Οι 25 σημαντικότεροι μεταβολίτες που συσχετίζονται (θετικά ή αρνητικά) με το μοτίβο (1-2-3-4-6-7), όπως προέκυψαν από ανάλυση συσχέτισης Pearson r. Με ροζ απεικονίζονται οι μεταβολίτες που αυξάνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση ενώ με γαλάζιο όσοι μειώνεται η σχετική αφθονία τους. Ο άξονας x απεικονίζει την τιμή του συντελεστή συσχέτισης.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων (Partitional Clustering) με την μέθοδο K-means. Η μέθοδος αυτή είναι μη επιβλεπόμενη και ορίστηκε εξ αρχής να ομαδοποιήσει τα δεδομένα σε 3 κατηγορίες (συστάδες), οι οποίες κατανέμουν τα δείγματα με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται η ομοιογένεια εντός των συστάδων. Ο διαχωρισμός που έγινε σύμφωνα με αυτόν τον αλγόριθμο παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2. Επιπλέον, στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται η μέση τιμή της Ολικής Μικροχλωρίδας (OMX ως $\log \text{ CFU/cm}^2$) και η βαθμολογία της οργανοληπτικής εξέτασης βάση της οσμής των δειγμάτων. Η 1^η συστάδα αποτελείται από 3 δείγματα που αντιστοιχούν στο αρχικό σημείο 0h (φρέσκο). Η 2^η συστάδα περιέχει δείγματα τα οποία είχαν συντηρηθεί από 48-168h στους 0°C. Η OMX της 2^{ης} συστάδας κυμάνθηκε στα επίπεδα $3 < \log \text{ CFU/cm}^2 < 5$, ενώ το εύρος τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης κυμάνθηκε από 1,21 έως 1,71, και επομένως τα δείγματα θεωρούνται αποδεκτά. Η 3^η συστάδα περιέχει τα δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου που συντηρήθηκαν από 240 έως 432h στους 0°C. Η OMX της 3^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε επίπεδο $\log \text{ CFU/cm}^2 > 5$, ενώ το εύρος τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης κυμάνθηκε από 2,00 έως 2,57 και επομένως τα δείγματα θεωρούνται ως οριακώς μη αποδεκτά.

Πίνακας 3.2: Οι συστάδες των δειγμάτων όπως προέκυψαν από την Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων K-means για την θερμοκρασία των 0° C

Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων K-means				
ΣΥΣΤΑΔΕΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ (h)	TVC ^a	Οσμή ^b
Cluster 1	00000A, 00000B, 00000D	0	2,97	1,13-1,00 (1,06)
Cluster 2	00048A, 00048B, 00048C, 00048D	48	3,22	1,21-1,21 (1,21)
	00120A, 00120B, 00120C, 00120D	120	3,67	1,40-1,29 (1,34)
	00168A, 00168B, 00168C, 00168D	168	4,54	1,71-1,29 (1,5)
Cluster 3	00240A, 00240B, 00240C, 00240D	240	5,47	2,57-2,00 (2,28)
	00384A, 00384B, 00384C, 00384D	384	5,17	2,57-1,67 (2,12)
	00432A, 00432B, 00432C, 00432D	432	5,7	2,29-2,00 (2,14)

^a: Total Vial Counts που απεικονίζουν τη μέση τιμή OMX (log CFU/cm²)

^b: Βαθμολογία οργανοληπτικής αξιολόγησης που αφορά την οσμή των δειγμάτων. Παρουσιάζεται το εύρος των τιμών (μέση τιμή). Η βαθμολογία πραγματοποιήθηκε σε κλίμακα (1-3) με βάση το επίπεδο αλλοίωσης/φρεσκότητας (1: επιθυμητό/ 2: αποδεκτό/ 3: μη αποδεκτό)

3.2.2 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 5°C

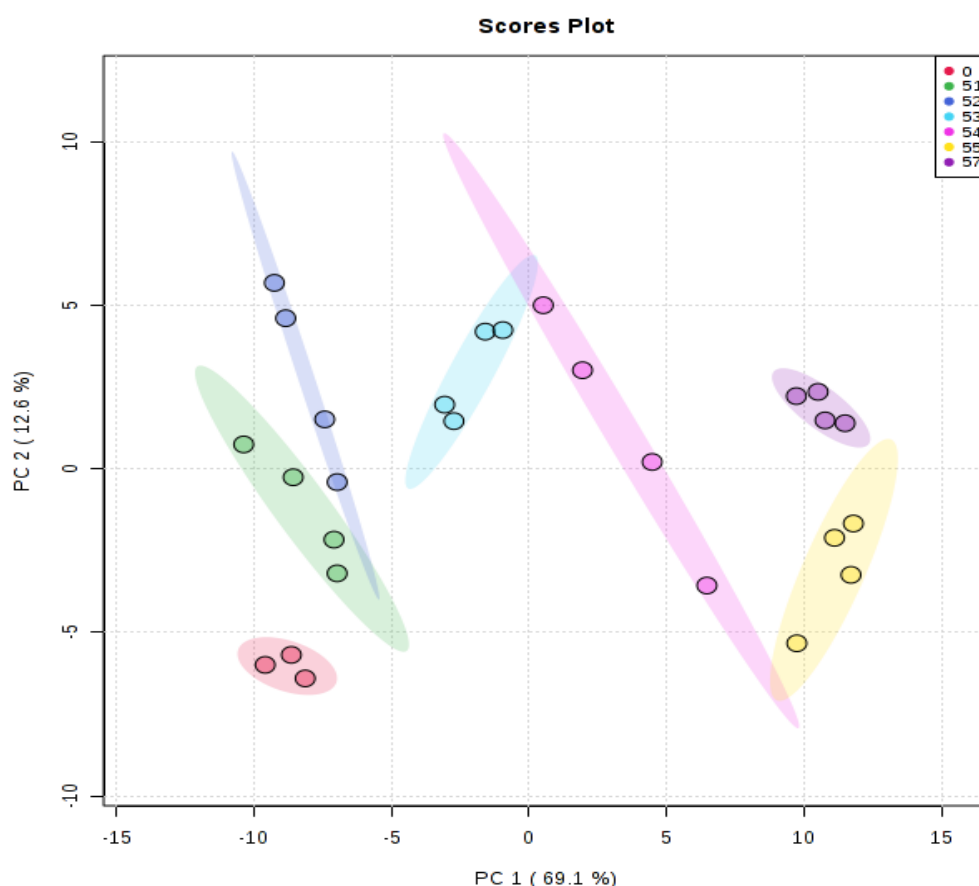
Τα δεδομένα που προέκυψαν έπειτα από τη στατιστική ανάλυση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν κατά την συντήρησή τους στους 5°C, παρουσιάζονται παρακάτω. Οι κλάσεις που κατανεμήθηκαν τα δείγματα και τα σημεία της δειγματοληψίας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Κλάσεις φιλέτου στήθους κοτόπουλου συγκριτικά με τις ώρες συντήρησης στους 5°C

Κλάσεις*	Σημεία δειγματοληψίας (ώρες συντήρησης)
0	0
51	24
52	48
53	96
54	120
55	168
57	288

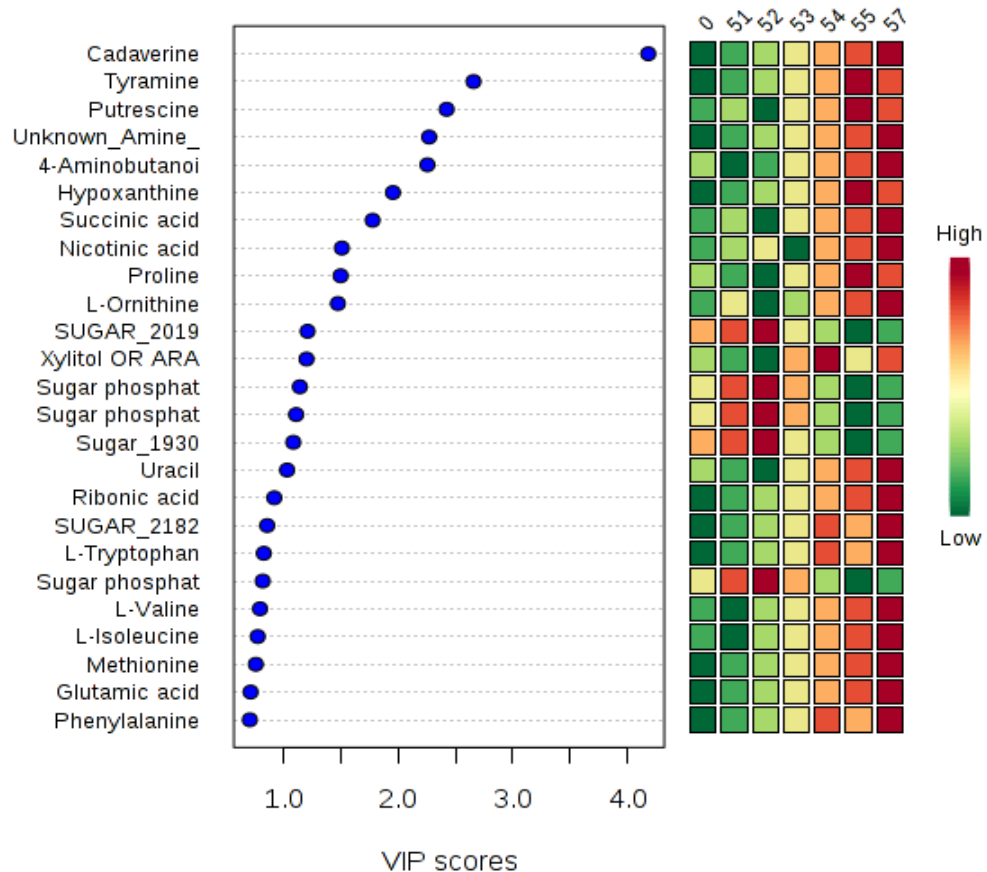
* Το 1^ο ψηφίο συμβολίζει τη θερμοκρασία, ενώ το 2^ο ψηφίο το σημείο δειγματοληψίας. Η κλάση 56 (216 h) αφαιρέθηκε καθώς θεωρήθηκε έκτροπη τιμή

Τα δεδομένα των μεταβολιτών υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και προέκυψε το Διάγραμμα 3.7. Παρατηρείται ότι τα δείγματα που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο σημείο δειγματοληψίας ομαδοποιούνται ικανοποιητικώς σχηματίζοντας 7 κλάσεις. Επιπρόσθετα, ο μέγιστος διαχωρισμός των κλάσεων συμβαίνει στον άξονα χ, δηλαδή κατά μήκος της κύριας συνιστώσας PC1, η οποία αντιπροσωπεύει το 69,1% της μεταβλητότητας. Συμπερασματικά, η συνιστώσα PC1 περιγράφει κυρίως τον χρόνο συντήρησης και επομένως την φρεσκότητα των δειγμάτων.



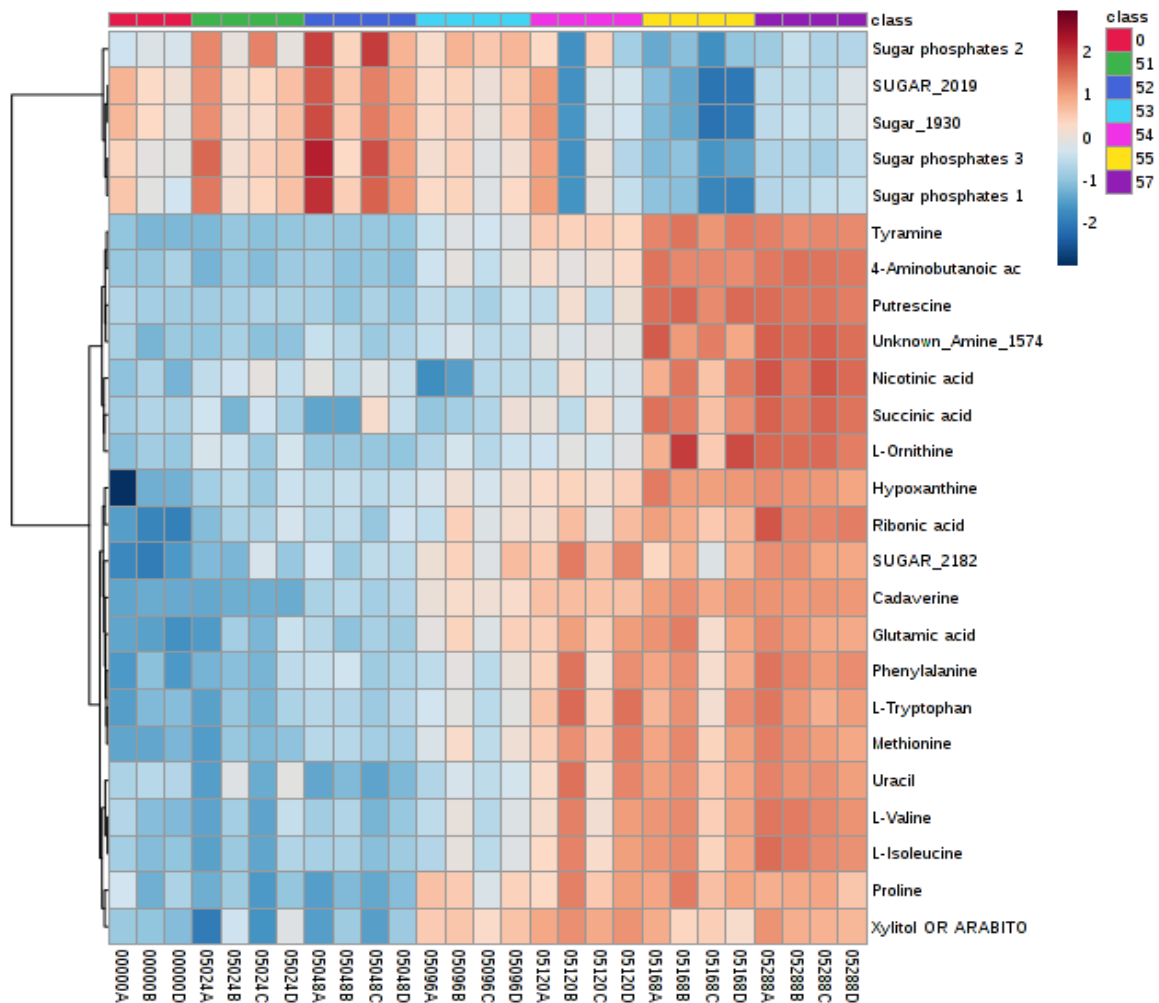
Διάγραμμα 3.7. Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (scores plot) για την συντήρηση φιλέτου στήθους κοτόπουλου στους 5°C. Οι κλάσεις (0,51,52,53,54,55,57) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 3.3. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές, αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

Παρόμοιος διαχωρισμός παρουσιάστηκε όταν τα ίδια δεδομένα υποβλήθηκαν σε PLS-DA. Στο Διάγραμμα 3.8 παρουσιάζονται οι 25 πιο σημαντικοί μεταβολίτες, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores, αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA. Επιπλέον, στο Παράρτημα Π-4, παρουσιάζεται σε ιστόγραμμα η κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων, σύμφωνα με την δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test) του μοντέλου. Ο λόγος B/W (sum of squares between/sum of squares within) βρίσκεται αρκετά δεξιά με αποτέλεσμα η διάκριση και επομένως οι διαφορές των κλάσεων του πραγματικού μοντέλου να είναι στατιστικώς σημαντικές.



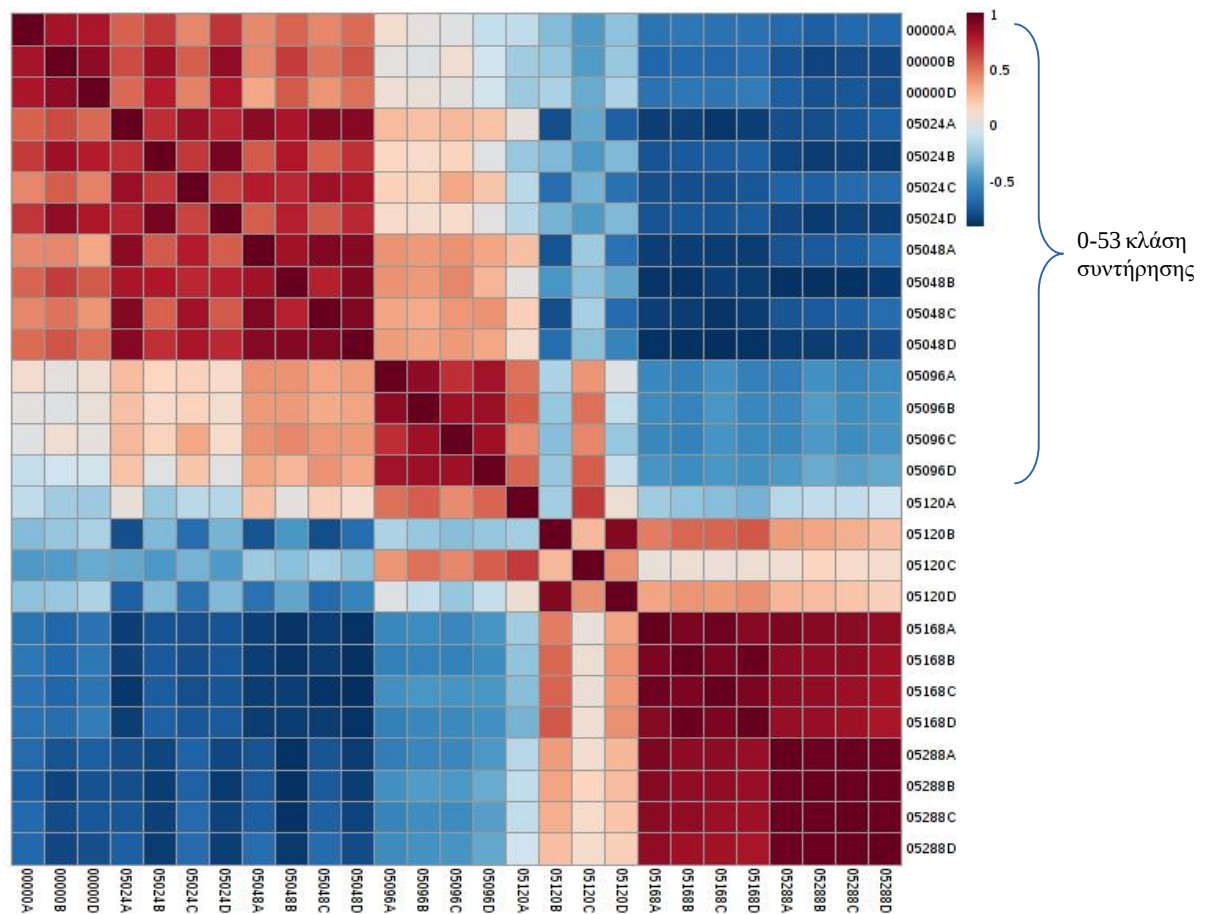
Διάγραμμα 3.8. Οι 25 σημαντικότεροι μεταβολίτες φιλέτου στήθους κοτόπουλου κατά τη συντήρηση στους 5°C που συνεισφέρουν στο μοντέλο PLS-DA. Τα έγχρωμα κελιά στην δεξιά στήλη δείχνουν την διάμεση τιμή της ποσότητας κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κατηγορία που περιγράφεται στον Πίνακα 3-3

Στη συνέχεια, στο Διάγραμμα 3.9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) υπό την μορφή θερμικού χάρτη (Heatmap). Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η χαμηλή συγκέντρωση ενός μεταβολίτη, ενώ με κόκκινο συμβολίζεται η υψηλή συγκέντρωση. Εύκολα διαπιστώνεται η μεταβολή των πιο σημαντικών μεταβολιτών (βάσει των VIP Scores) ανάλογα με τις ημέρες συντήρησης των δειγμάτων. Οι πρώτες 6 ενώσεις (σάκχαρα και παράγωγα σακχάρων) μειώνονται καθώς προχωράει η αλλοίωση (βαίνοντας από την κλάση 0 προς την κλάση 7), ενώ οι υπόλοιπες ουσίες φαίνεται να αυξάνονται κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σε αυτές περιλαμβάνονται κυρίως αμινοξέα, οργανικά οξέα και βιογενείς αμίνες.



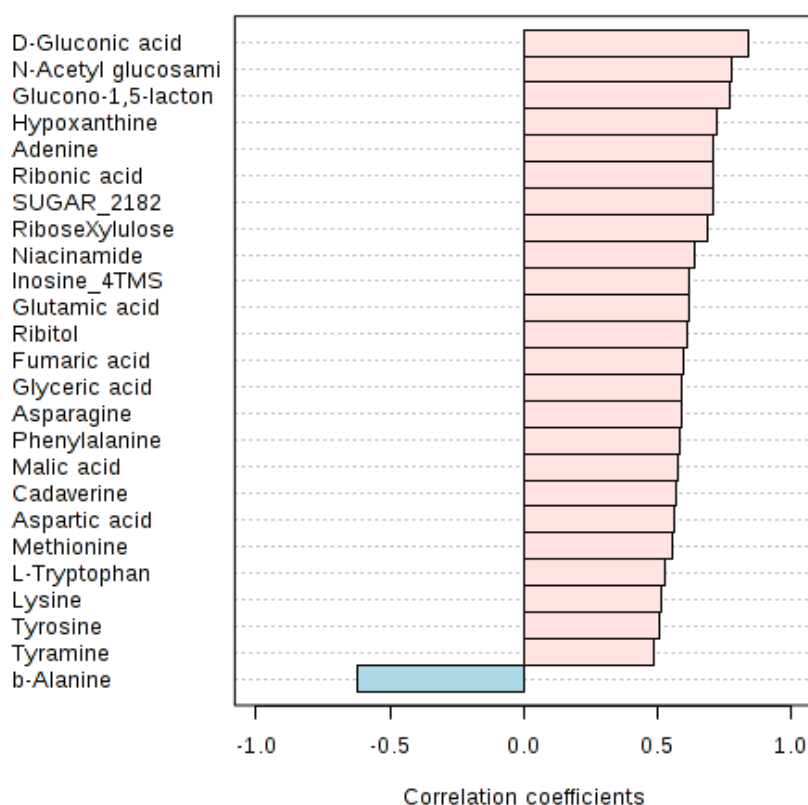
Διάγραμμα 3.9: Θερμικός χάρτης (Heatmap) αποτελεσμάτων HCA που απεικονίζει την ομαδοποίηση των σημαντικότερων μεταβολιτών (βάσει των VIP Scores) μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων δειγμάτων (οι κλάσεις 0-57 περιγράφονται στον Πίνακα 3.3). Τα έγχρωμα κελιά του χάρτη αντιστοιχούν στην σχετική αφθονία κάθε μεταβολίτη. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε χαμηλή σχετική αφθονία και όσο το χρώμα μεταβάλλεται προς το κόκκινο η σχετική αφθονία του μεταβολίτη αυξάνεται.

Στο Διάγραμμα 3.10 απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Δείγματα με αρνητική συσχέτιση συμβολίζονται με μπλε χρώμα, ενώ δείγματα με θετική συσχέτιση συμβολίζονται με κόκκινο. Αυτό που γίνεται εύκολα αντιληπτό είναι ότι τα δείγματα που ανήκουν στις κλάσεις 0-53 και αντιστοιχούν σε χρόνους συντήρησης των φιλέτων από 0h έως 96h (βρίσκονται στο πρώτο ήμισυ μέρος του κάθετου άξονα και αριστερά στον οριζόντιο) παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με αυτά που ανήκουν στις κλάσεις 54-57, οι οποίες αντιστοιχούν σε φιλέτα που είχαν συντηρηθεί από 120-288h (βρίσκονται στο κάτω μέρος του κάθετου άξονα και δεξιά στον οριζόντιο).



Διάγραμμα 3.10: Heatmap που απεικονίζει την συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Η κλίμακα χρώματος αντιπροσωπεύει τους συντελεστές συσχέτισης όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r . Με το κόκκινο και το μπλε απεικονίζεται η θετική και η αρνητική συσχέτιση, αντίστοιχα

Επιπρόσθετα, το Pattern Hunter, δίνει την συσχέτιση που μπορεί να έχουν κάποιοι μεταβολίτες, σύμφωνα με ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Το μοτίβο 0-51-52-53-54-55-57 που επιλέχθηκε, ώστε να προκύψει το Διάγραμμα 3.11, χρησιμοποιείται για την εύρεση των μεταβολιτών που αυξάνονται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο, σε ένα σύνολο δεδομένων με 7 σημεία (7 κλάσεις δειγμάτων = αριθμός δειγματοληψιών). Μεταβολίτες με ροζ χρώμα εμφανίζουν θετική συσχέτιση (δηλ. αυξάνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση), ενώ αρνητική συσχέτιση (δηλ. μειώνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση) εμφανίζει η β-αλανίνη.

Top 25 compounds correlated with the 0-51-52-53-54-55-5'

Διάγραμμα 3.11. Οι 25 κυριότεροι μεταβολίτες που συσχετίζονται (θετικά ή αρνητικά) με το δεδομένο μοτίβο (51-52-53-54-55-57), όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r. Με ρόζ απεικονίζονται οι μεταβολίτες που αυξάνεται η συγκέντρωσή τους κατά τη συντήρηση ενώ με γαλάζιο όσοι μειώνεται η συγκέντρωσή τους. Ο άξονας x δείχνει την τιμή της συσχέτισης

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων (Partitional Clustering) με την μέθοδο K-means. Τα δεδομένα διαχωρίστηκαν σε 3 συστάδες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-4. Επιπλέον, στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται η μέση τιμή της Ολικής Μικροχλωρίδας (OMX ως $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) και η βαθμολογία της οργανοληπτικής εξέτασης βάσει της οσμής των δειγμάτων. Η 1^η συστάδα περιλαμβάνει τα δείγματα που είχαν συντηρηθεί από 0-48h στους 5°C. Το επίπεδο της OMX της 1^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε $\log \text{CFU}/\text{cm}^2 < 4$, ενώ το εύρος τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης κυμάνθηκε σε τιμές $< 1,7$ και επομένως τα δείγματα θεωρούνται αποδεκτά. Η 2^η συστάδα περιέχει δείγματα τα οποία είχαν συντηρηθεί από 96-120h στους 5°C. Η OMX της 2^{ης} συστάδας κυμάνθηκε στα επίπεδα $4,5 < \log \text{CFU}/\text{cm}^2 < 5,5$, ενώ οι μέσες τιμές της οργανοληπτικής αξιολόγησης κυμάνθηκαν από 1,5 έως 2,3 και επομένως τα δείγματα θεωρούνται αποδεκτά έως οριακά αποδεκτά. Η 3^η συστάδα περιέχει τα δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου που συντηρήθηκαν από 168 έως 288h στους 5°C, ενώ φαίνεται να έχει ταξινομηθεί εσφαλμένα ένα δείγμα (05120B) που αντιστοιχεί στις 120h και θα έπρεπε να εμπίπτει στη 2^η συστάδα. Η OMX της 3^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε επίπεδο $\log \text{CFU}/\text{cm}^2 > 6$, ενώ οι μέσες τιμές της οργανοληπτικής αξιολόγησης κυμάνθηκαν σε επίπεδα $> 2,4$ και επομένως τα δείγματα θεωρούνται ως μη αποδεκτά.

Πίνακας 3.4: Οι συστάδες των δειγμάτων όπως προέκυψαν από την Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων k-means για την θερμοκρασία των 5°C

Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων K-Means				
ΣΥΣΤΑΔΕΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ (h)	TVC ^a	Οσμή ^b
Cluster 1	00000A, 00000B, 00000D	0	2,97	1,13-1,00 (1,06)
	05024A, 05024B, 05024C, 05024D	24	3,31	1,73-1,73 (1,73)
	05048A, 05048B, 05048C, 05048D	48	3,83	1,47-1,33 (1,4)
Cluster 2	05096A, 05096B, 05096C, 05096D	96	4,59	1,73- 1,33 (1,53)
	05120A, 05120C, 05120D	120	5,28	2,47-2,13 (2,3)
Cluster 3	05120B	120	4,72	2,13
	05168A, 05168B, 05168C, 05168D	168	6	2,73- 2,47 (2,6)
	05288A, 05288B, 05288C, 05288D	288	6,18	2,93- 1,93 (2,43)

^a: Total Vial Counts που απεικονίζουν τη μέση τιμή OMX (log CFU/cm²)

^b: Βαθμολογία οργανοληπτικής αξιολόγησης που αφορά την οσμή των δειγμάτων. Παρουσιάζεται το εύρος των τιμών (μέση τιμή). Η βαθμολογία πραγματοποιήθηκε σε κλίμακα (1-3) με βάση το επίπεδο αλλοίωσης/φρεσκότητας (1: επιθυμητό/ 2: αποδεκτό/ 3: μη αποδεκτό)

3.2.3 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 10°C

Τα δείγματα του φιλέτου στήθους κοτόπουλου συντηρήθηκαν στους 10°C και έπειτα από τη στατιστική ανάλυση τους προέκυψαν τα δεδομένα που παρουσιάζονται παρακάτω. Οι κλάσεις που κατανεμήθηκαν τα δείγματα και τα σημεία της δειγματοληψίας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

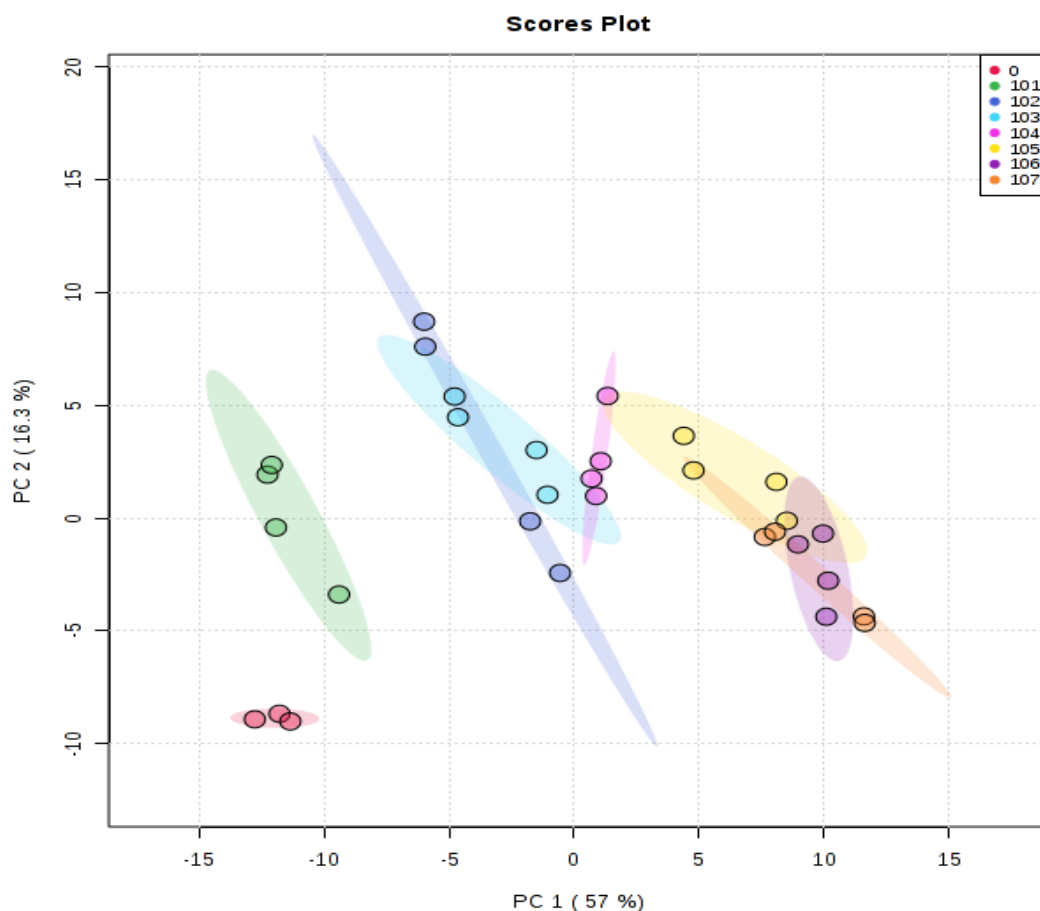
Πίνακας 3.5: Κλάσεις φιλέτου στήθους κοτόπουλου συγκριτικά με τις ώρες συντήρησης στους 10°C

Κλάσεις*	Σημεία δειγματοληψίας (ώρες συντήρησης)
0	0
101	24
102	48
103	72
104	96
105	120
106	168
107	192

* Το 1^ο και 2^ο ψηφίο συμβολίζουν τη θερμοκρασία, ενώ το 3^ο ψηφίο αντιστοιχεί στο σημείο δειγματοληψίας

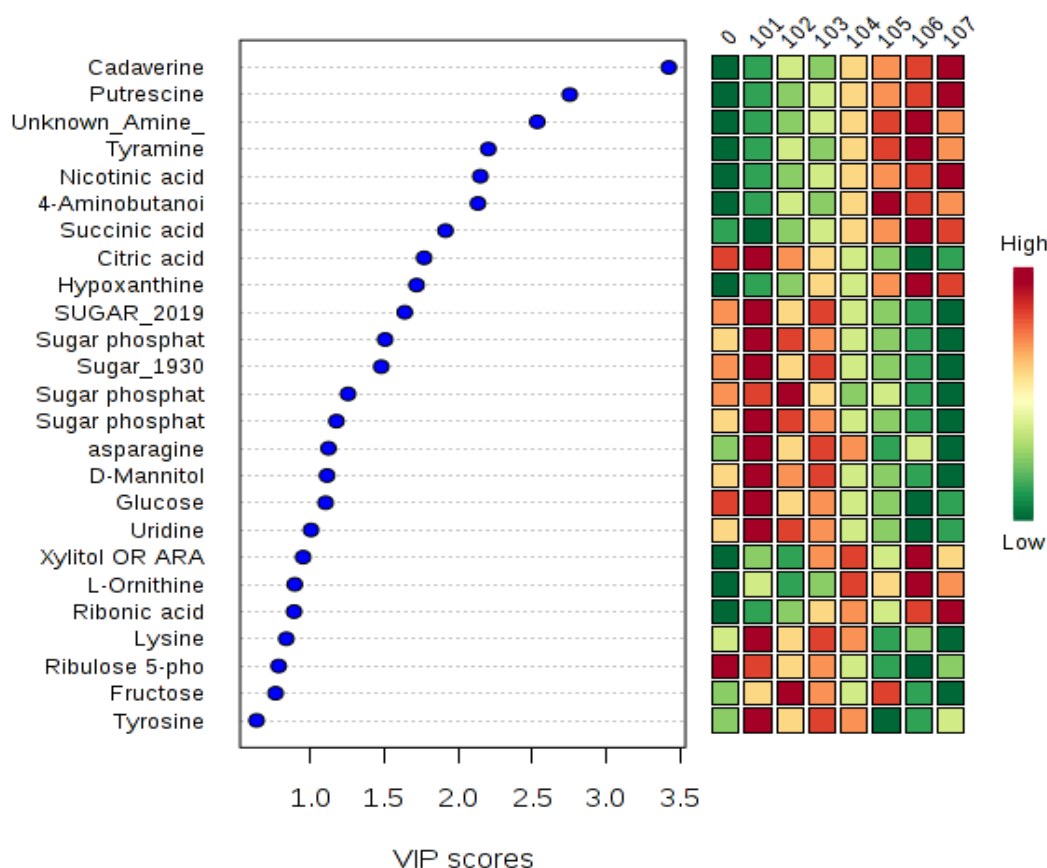
Αρχικά, τα δεδομένα των μεταβολιτών υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.12. Παρατηρείται ότι τα δείγματα που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο σημείο δειγματοληψίας ομαδοποιούνται και σχηματίζουν 8

κλάσεις. Επιπρόσθετα, ο μέγιστος διαχωρισμός των κλάσεων συμβαίνει στον άξονα χ, δηλαδή κατά μήκος της κύριας συνιστώσας PC1. Οι δύο πρώτες συνιστώσες αντιπροσωπεύουν το 73,3 % της μεταβλητότητας και η συνιστώσα PC1 (που αντιπροσωπεύει το 57% της μεταβλητότητας) περιγράφει κυρίως τον χρόνο συντήρησης και επομένως την φρεσκότητα των δειγμάτων.



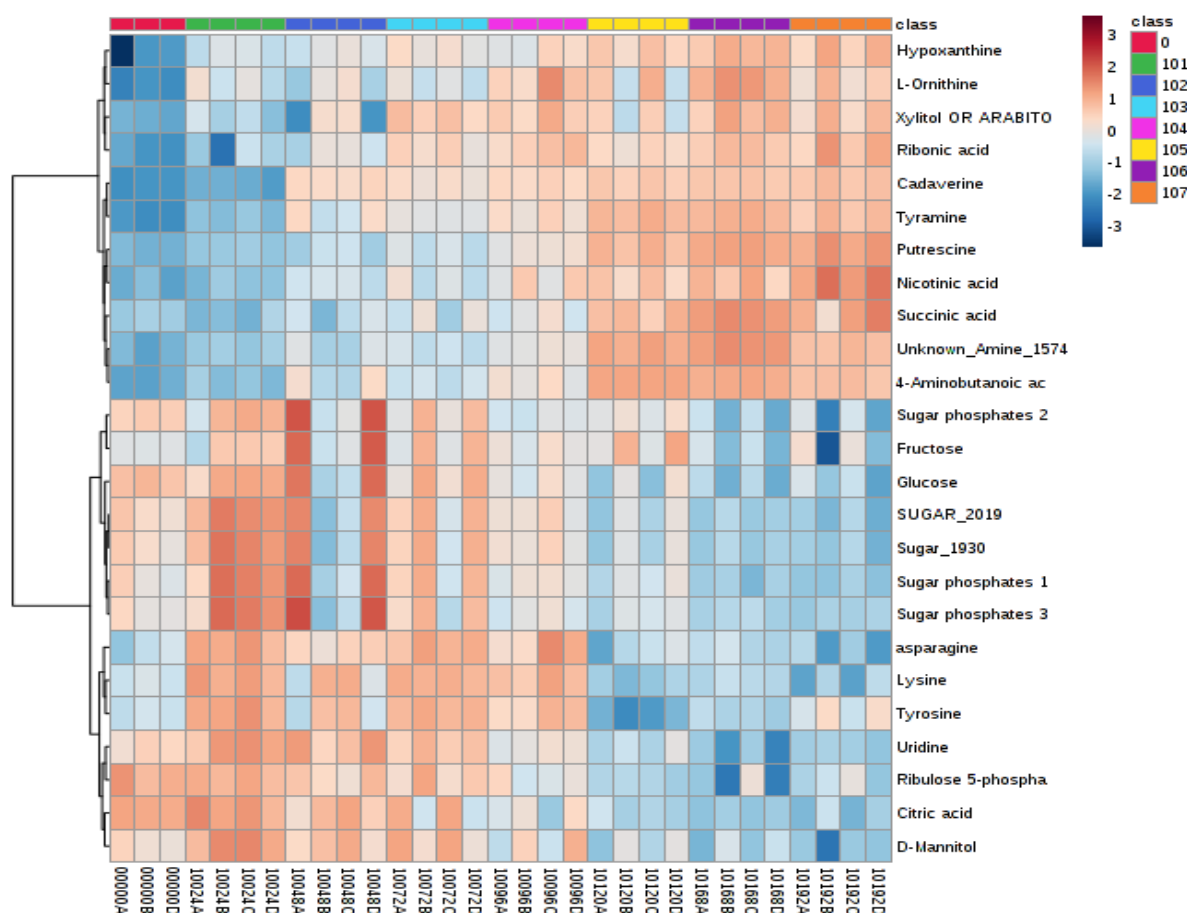
Διάγραμμα 3.12. Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (scores plot) για την συντήρηση φιλέτου στήθους κοτόπουλου στους 10°C. Οι κλάσεις (0-107) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 3.5. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές, αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

Μετά από στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με PLS-DA παρουσιάστηκε παρόμοιος διαχωρισμός και προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα Στο Διάγραμμα 3.13 παρουσιάζονται οι 25 πιο σημαντικοί μεταβολίτες, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores, αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA. Επίσης, στο παράρτημα Π-Α, παρουσιάζεται σε ιστόγραμμα η κατανομή των τυχαίων ταξινομήσεων όπου σύμφωνα με τη δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test) του μοντέλου, ο λόγος B/W (sum of squares between/sum of squares within) βρίσκεται αρκετά δεξιά με αποτέλεσμα οι διαφορές των κλάσεων του πραγματικού μοντέλου να είναι στατιστικώς σημαντικές.



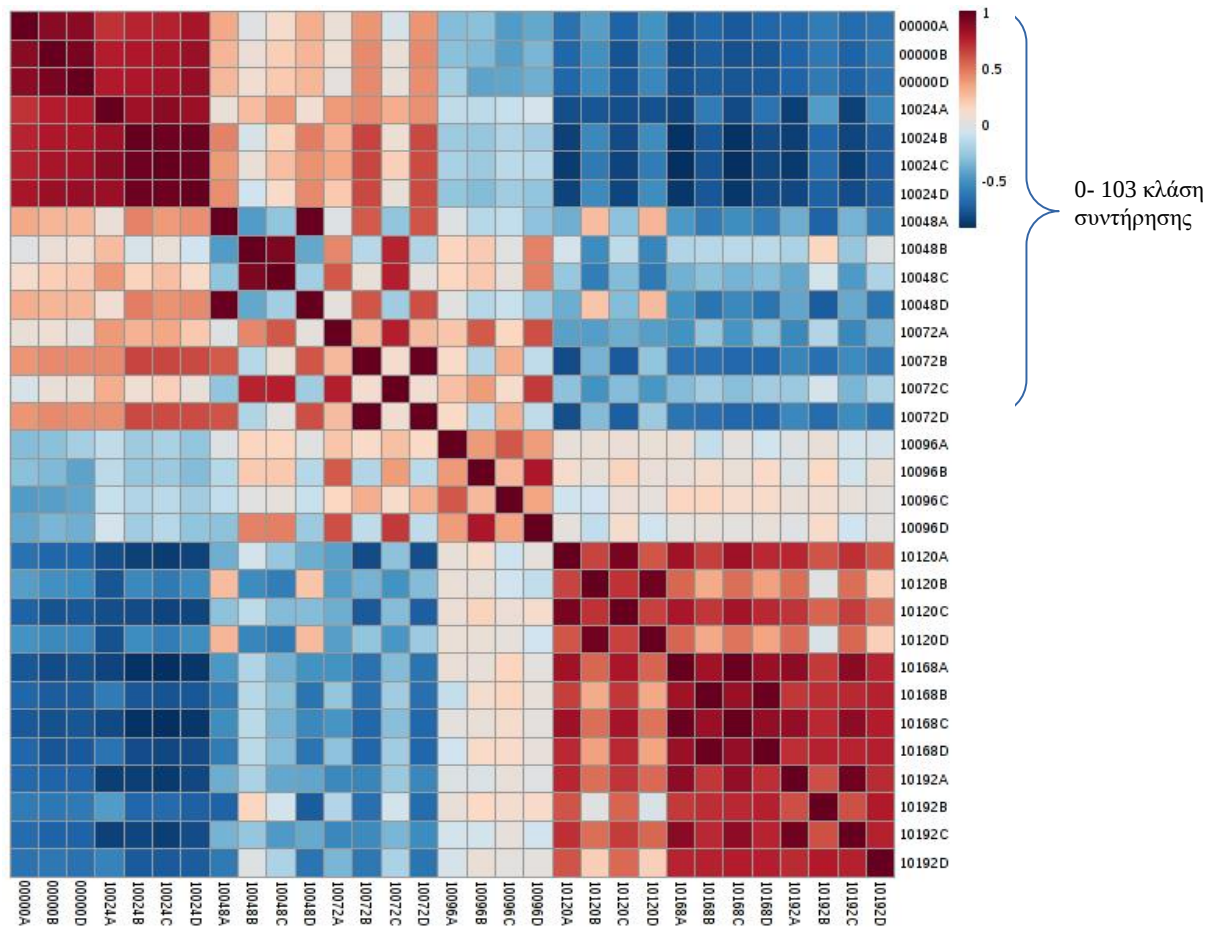
Διάγραμμα 3.13. Οι 25 σημαντικότεροι μεταβολίτες της θερμοκρασία των 10°C που συνεισφέρουν στο μοντέλο από την τεχνική PLS-DA. Οι έγχρωμες μπάρες στην δεξιά στήλη δείχνουν την διάμεση τιμή της συγκέντρωσης του κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κατηγορία που περιγράφεται στον Πίνακα 3.5

Ακολουθεί το Διάγραμμα 3.14, όπου απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) υπό την μορφή θερμικού χάρτη (Heatmap). Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η χαμηλή συγκέντρωση ενός μεταβολίτη, ενώ με κόκκινο συμβολίζεται η υψηλή συγκέντρωση. Οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες (βάσει των VIP Scores), μεταβάλλονται ανάλογα με τις ημέρες συντήρησης των δειγμάτων. Οι πρώτες 11 ενώσεις (βιογενείς αμίνες και οργανικά οξέα) αυξάνονται καθώς προχωράει η αλλοίωση, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες φαίνεται να μειώνονται κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σε αυτές περιλαμβάνονται κυρίως σάκχαρα, παράγωγα σακχάρων, και αμινοξέα.



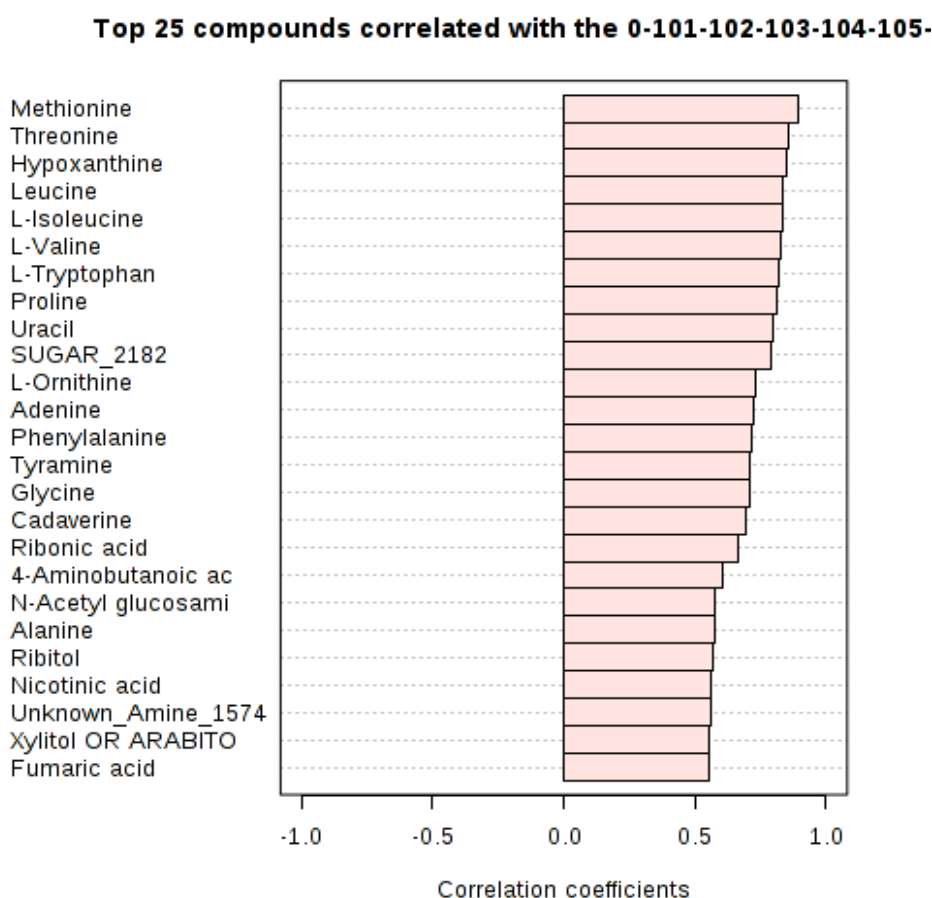
Διάγραμμα 3.14 Θερμικός χάρτης (Heatmap) αποτελεσμάτων HCA που απεικονίζει την ομαδοποίηση των σημαντικότερων μεταβολιτών (βάσει των VIP Scores) μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων δειγμάτων (οι κλάσεις 0-107 περιγράφονται στον Πίνακα 3.5). Τα έγχρωμα κελιά του χάρτη αντιστοιχούν στην σχετική αφθονία κάθε μεταβολίτη. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε χαμηλή σχετική αφθονία και όσο το χρώμα μεταβάλλεται προς το κόκκινο η σχετική αφθονία του μεταβολίτη αυξάνεται.

Στο Διάγραμμα 3.15 απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Δείγματα με αρνητική συσχέτιση συμβολίζονται με μπλε χρώμα, ενώ δείγματα με θετική συσχέτιση συμβολίζονται με κόκκινο. Τα δείγματα που ανήκουν στις κλάσεις 0-103 και αντιστοιχούν σε χρόνους συντήρησης των φιλέτων από 0h έως 72h (βρίσκονται στο πρώτο ήμισυ μέρος του κάθετου άξονα και αριστερά στον οριζόντιο), παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με αυτά που ανήκουν στις κλάσεις 104-107, οι οποίες αντιστοιχούν σε φιλέτα που είχαν συντηρηθεί από 96-192h (βρίσκονται στο κάτω μέρος του κάθετου άξονα και δεξιά στον οριζόντιο).



Διάγραμμα 3.15: Heatmap που απεικονίζει την συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Η κλίμακα χρώματος αντιπροσωπεύει τους συντελεστές συσχέτισης όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r . Με το κόκκινο και το μπλε απεικονίζεται η θετική και η αρνητική συσχέτιση, αντίστοιχα

Στη συνέχεια, το Pattern Hunter, δίνει την συσχέτιση που μπορεί να έχουν κάποιοι μεταβολίτες, σύμφωνα με ένα μοτίβο. Το μοτίβο που επιλέχθηκε στην περίπτωση αυτή είναι το 0-101-102-103-104-105-106-107, ώστε να προκύψει το Διάγραμμα 3.16 και χρησιμοποιείται για την εύρεση των μεταβολιτών που αυξάνονται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο, σε ένα σύνολο δεδομένων με 8 σημεία (8 κλάσεις δειγμάτων = αριθμός δειγματοληψιών). Μεταβολίτες με ροζ χρώμα εμφανίζουν θετική συσχέτιση (δηλ. αυξάνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση).



Διάγραμμα 3.16. Οι 25 κυριότεροι μεταβολίτες που συσχετίζονται (θετικά ή αρνητικά) με το δεδομένο μοτίβο (101-102-103-104-105-106-107), όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r . Με ροζ απεικονίζονται οι μεταβολίτες που αυξάνεται η συγκέντρωσή τους κατά τη συντήρηση. Ο άξονας x δείχνει την τιμή της συσχέτισης

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων (Partitional Clustering) με την μέθοδο K-means. Ορίστηκε η ομαδοποίηση των δεδομένων σε 3 κατηγορίες (συστάδες), στις οποίες κατανεμήθηκαν οι 8 κλάσεις και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται και η μέση τιμή της Ολικής Μικροχλωρίδας (OMX ως $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) και η βαθμολογία της οργανοληπτικής εξέτασης βάση της οσμής των δειγμάτων. Η 1^η συστάδα περιλαμβάνει τα δείγματα που είχαν συντηρηθεί από 0-24h στους 10°C. Το επίπεδο της OMX της 1^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε επίπεδα $\log \text{CFU}/\text{cm}^2 < 3,5$, ενώ σύμφωνα με το εύρος τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης τα δείγματα θεωρούνται επιθυμητά (1,00 για τα δείγματα των 0h) και οριακώς επιθυμητά (<1,50 για τα δείγματα των 24h). Η 2^η συστάδα περιλαμβάνει τα δείγματα που είχαν συντηρηθεί από 48h-96h στους 10°C. Το επίπεδο της OMX της 2^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε επίπεδα $4,7 < \log \text{CFU}/\text{cm}^2 < 6,3$, ενώ το εύρος των μέσων τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης κυμάνθηκε από 2,2 έως 2,70. Επομένως, τα δείγματα αυτά θεωρούνται οριακώς αποδεκτά έως μη αποδεκτά. Η 3^η συστάδα περιλαμβάνει τα δείγματα που είχαν συντηρηθεί από 120h-192h στους 10°C. Το επίπεδο της

OMX της 3^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε επίπεδα $\log \text{CFU}/\text{cm}^2 > 6,3$ ενώ το εύρος τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι $>2,8$, και επομένως τα δείγματα θεωρούνται ως μη αποδεκτά.

Πίνακας 3.6: Οι συστάδες των δειγμάτων όπως προέκυψαν από την Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων k-means κατά την θερμοκρασία συντήρησης των 10°C

Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων K-Means				
ΣΥΣΤΑΔΕΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ (h)	TVC ^a	ODORS ^b
Cluster 1	00000A, 00000B, 00000D	0	2,97	1,13-1,00 (1,06)
	10024A, 10024B, 10024C, 10024D	24	3,32	1,67-1,27 (1,47)
Cluster 2	10048A, 10048B, 10048C, 10048D	48	4,73	2,27-2,13 (2,2)
	10072A, 10072B, 10072C, 10072D	72	5,77	2,80-1,87 (2,33)
	10096A, 10096B, 10096C, 10096D	96	6,31	2,73-2,67 (2,7)
Cluster 3	10120A, 10120B, 10120C, 10120D	120	6,25	2,93-2,80 (2,87)
	10168A, 10168B, 10168C, 10168D	168	6,5	2,93-2,93 (2,93)
	10192A, 10192B, 10192C, 10192D	192	7,01	3,00-2,67 (2,84)

^a: Total Vial Counts που απεικονίζουν τη μέση τιμή OMX ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$)

^b: Βαθμολογία οργανοληπτικής αξιολόγησης που αφορά την οσμή των δειγμάτων. Παρουσιάζεται το εύρος των τιμών (μέση τιμή). Η βαθμολογία πραγματοποιήθηκε σε κλίμακα (1-3) με βάση το επίπεδο αλλοίωσης/φρεσκότητας (1: επιθυμητό/ 2: αποδεκτό/ 3: μη αποδεκτό)

3.2.4 Φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο στους 15°C

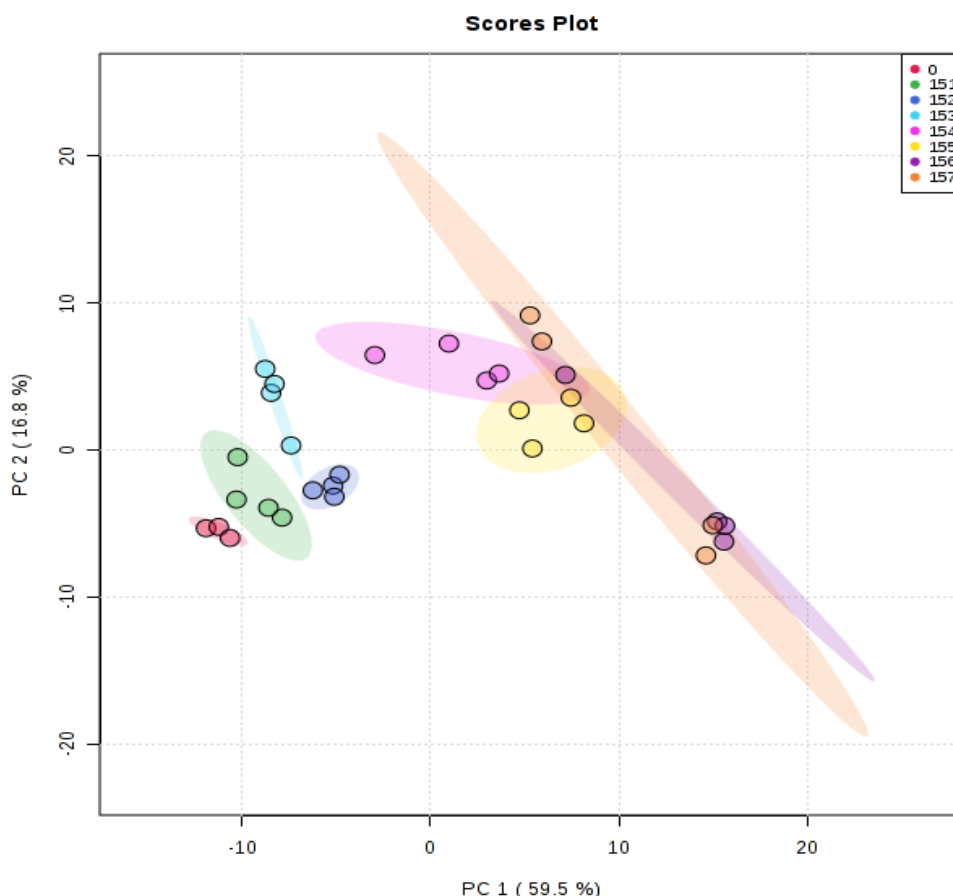
Η ανώτερη θερμοκρασία συντήρησης των δειγμάτων του φιλέτου στήθους κοτόπουλου που εξετάστηκε ήταν οι 15°C και τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται ακολούθως. Οι κλάσεις που κατανεμήθηκαν τα δείγματα και τα σημεία της δειγματοληψίας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7: Κλάσεις φιλέτου στήθους κοτόπουλου συγκριτικά με τις ώρες συντήρησης στους 15°C

Κλάσεις*	Σημεία δειγματοληψίας (ώρες συντήρησης)
0	0
151	10
152	24
153	30
154	48
155	72
156	96
157	120

* Το 1^ο και 2^ο ψηφίο συμβολίζουν τη θερμοκρασία, ενώ το 3^ο ψηφίο αντιστοιχεί στο σημείο δειγματοληψίας

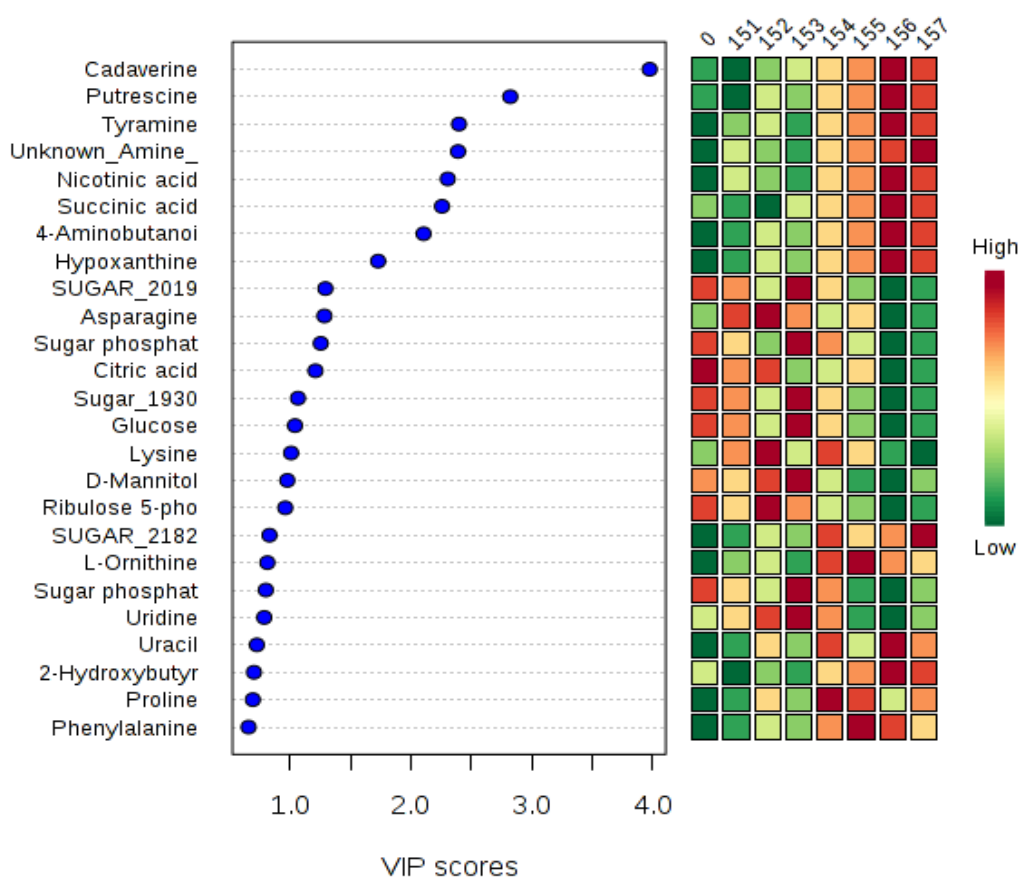
Αρχικά τα δεδομένα των μεταβολιτών υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και προέκυψε το Διάγραμμα 3.19. Τα δείγματα που αντιστοιχούν στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης (0- 30h συντήρησης: κλάσεις 0-101-102-103/ κόκκινη-πράσινη-μπλε-γαλάζια περιοχή) είναι σαφώς διαχωρισμένα από τα δείγματα που λήφθηκαν σε μεταγενέστερα στάδια συντήρησης (48h-120h συντήρησης: κλάσεις 104-105-106-107/ ροζ-κίτρινη-μωβ-πορτοκαλί περιοχή). Οι τέσσερις πρώτες συνιστώσες που προέκυψαν εξηγούν την διακύμανση (88,5%) των αρχικών δεδομένων (χ) χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατηγορία που ανήκουν (y).



Διάγραμμα 3.17. Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (scores plot) για την συντήρηση φιλέτου στήθους κοτόπουλου στους 15°C. Οι κλάσεις (0-157) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 3.8. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές, αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

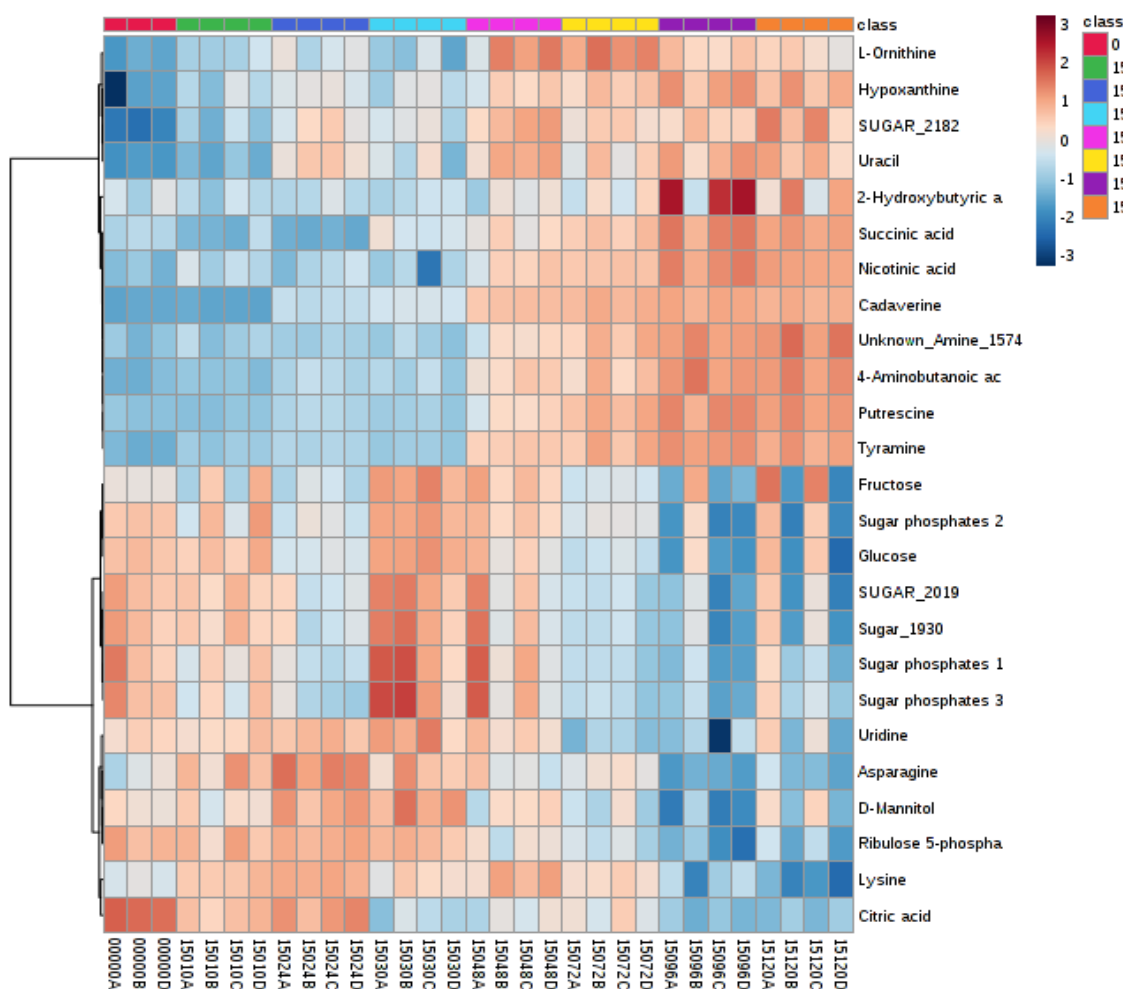
Παρόμοιος διαχωρισμός παρουσιάστηκε όταν τα ίδια δεδομένα υποβλήθηκαν σε PLS-DA. Στο Διάγραμμα 3.18 παρουσιάζονται οι 25 πιο σημαντικοί μεταβολίτες, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores, αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA. Σύμφωνα με τη δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test) του μοντέλου (Παράρτημα Π-4), ο λόγος B/W (sum of squares between/sum of squares within) βρίσκεται

αρκετά δεξιά με αποτέλεσμα η διάκριση και επομένως οι διαφορές των κλάσεων του πραγματικού μοντέλου να είναι στατιστικά σημαντικές.



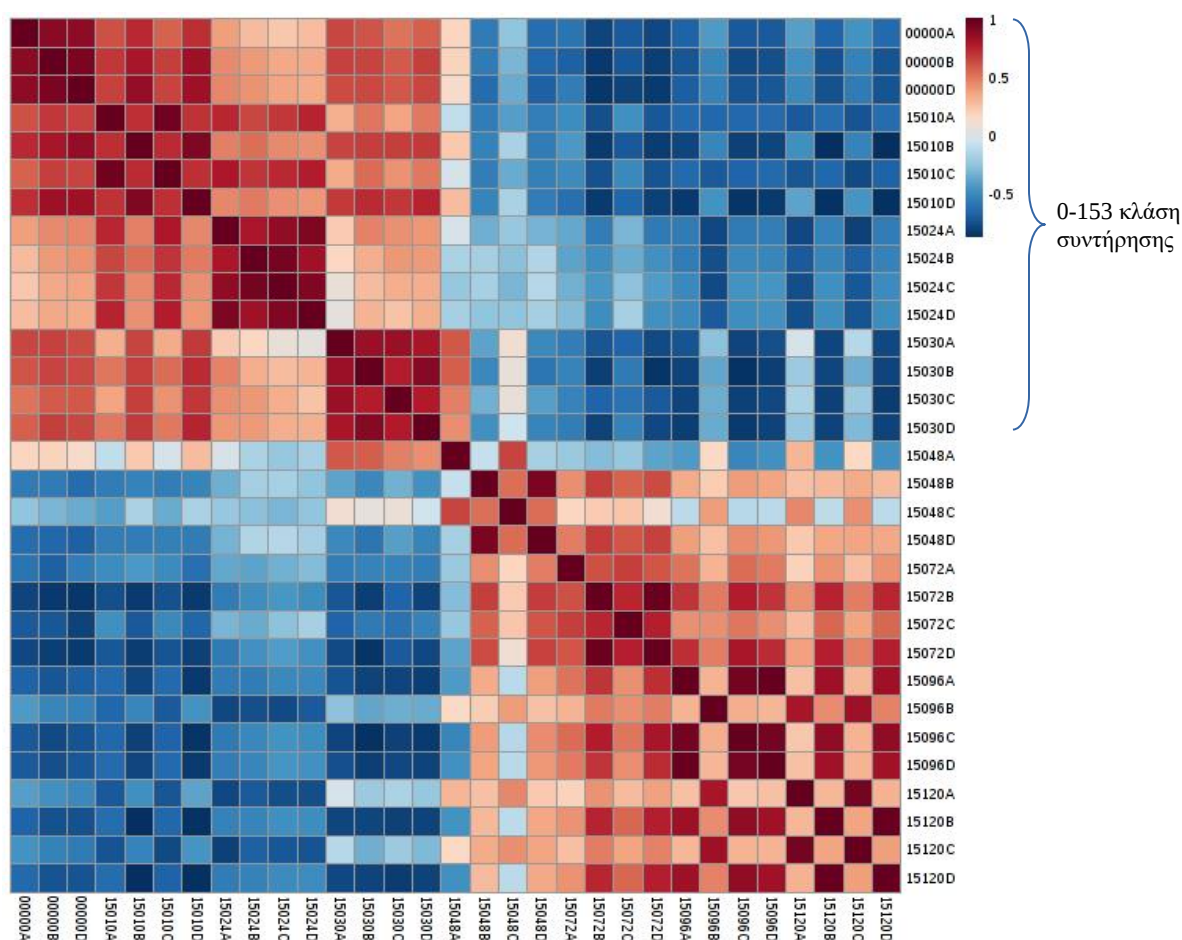
Διάγραμμα 3.18. Οι 25 σημαντικότεροι μεταβολίτες της θερμοκρασία των 15°C που συνεισφέρουν στο μοντέλο από την τεχνική PLS-DA. Οι έγχρωμες μπάρες στην δεξιά στήλη δείχνουν την διάμεση τιμή της συγκέντρωσης του κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κατηγορία που περιγράφεται στον Πίνακα 3.7

Επιπλέον, στο Διάγραμμα 3.19 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) υπό την μορφή θερμικού χάρτη (Heatmap). Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η χαμηλή συγκέντρωση ενός μεταβολίτη, ενώ με κόκκινο συμβολίζεται η υψηλή συγκέντρωση. Επομένως, είναι εύκολο να διαπιστώσει κανείς πως μεταβάλλονται οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες (βάσει των VIP Scores) ανάλογα με τις ημέρες συντήρησης των δειγμάτων. Οι πρώτες 12 ενώσεις (κυρίως οργανικά οξέα και βιογενείς αμίνες) αυξάνονται καθώς προχωράει η αλλοίωση, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες φαίνεται να μειώνονται κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σε αυτές περιλαμβάνονται αμινοξέα, σάκχαρα και παράγωγα σακχάρων.



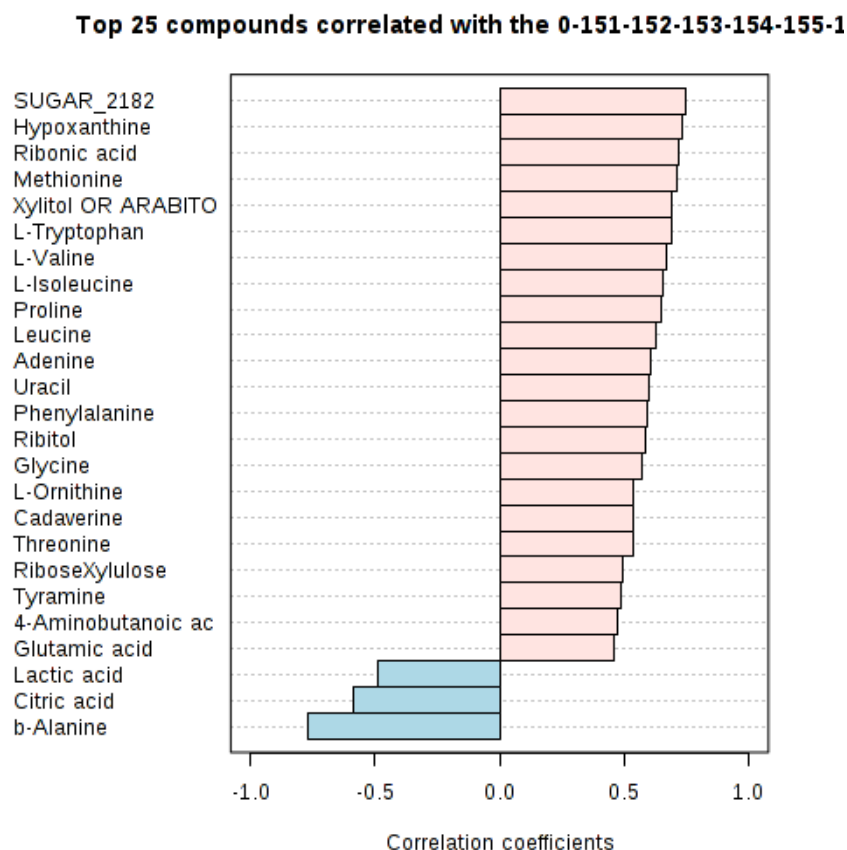
Διάγραμμα 3.19. Θερμικός χάρτης (Heatmap) αποτελεσμάτων HCA που απεικονίζει την ομαδοποίηση των σημαντικότερων μεταβολιτών (βάσει των VIP Scores) μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων δειγμάτων (οι κλάσεις 0-157 περιγράφονται στον Πίνακα 3.7). Τα έγχρωμα κελιά του χάρτη αντιστοιχούν στην σχετική αφθονία κάθε μεταβολίτη. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε χαμηλή σχετική αφθονία και όσο το χρώμα μεταβάλλεται προς το κόκκινο η σχετική αφθονία του μεταβολίτη αυξάνεται.

Στο Διάγραμμα 3.20 απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων της θερμοκρασίας των 15°C. Δείγματα με αρνητική συσχέτιση συμβολίζονται με μπλέ χρώμα, ενώ δείγματα με θετική συσχέτιση με κόκκινο. Τα δείγματα που ανήκουν στις κλάσεις 0-153 και αντιστοιχούν σε χρόνους συντήρησης των φιλέτων από 0h έως 30h (βρίσκονται στο πρώτο ήμισυ μέρος του κάθετου άξονα και αριστερά στον οριζόντιο) παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με αυτά που ανήκουν στις κλάσεις 154-57, οι οποίες αντιστοιχούν σε φιλέτα που είχαν συντηρηθεί από 48-120h (βρίσκονται στο κάτω μέρος του κάθετου άξονα και δεξιά στον οριζόντιο).



Διάγραμμα 3.20: Heatmap που απεικονίζει την συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Η κλίμακα χρώματος αντιπροσωπεύει τους συντελεστές συσχέτισης όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r. Με το κόκκινο και το μπλε απεικονίζεται η θετική και αρνητική συσχέτιση αντίστοιχα.

Επιπλέον, το Pattern Hunter, δίνει την συσχέτιση που μπορεί να έχουν κάποιοι μεταβολίτες, σύμφωνα με ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Το μοτίβο 0-151-152-153-154-155-156-157 που επιλέχθηκε ώστε να προκύψει το Διάγραμμα 3.21, χρησιμοποιείται για την εύρεση των μεταβολιτών που αυξάνονται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο, σε ένα σύνολο δεδομένων με 8 σημεία (8 κλάσεις δειγμάτων = αριθμός δειγματοληψιών). Μεταβολίτες με ροζ χρώμα εμφανίζουν θετική συσχέτιση (δηλ. αυξάνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση), ενώ αυτοί με γαλάζιο αρνητική (δηλ. μειώνεται η σχετική αφθονία τους κατά τη συντήρηση). Οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.21 είναι το γαλακτικό οξύ, το κιτρικό οξύ και η β-αλανίνη.



Διάγραμμα 3.21. Οι 25 κυριότεροι μεταβολίτες που συσχετίζονται (θετικά ή αρνητικά) με το δεδομένο μοτίβο(151-152-153-154-155-156-157), όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r. Με ρόζ απεικονίζονται οι μεταβολίτες που αυξάνεται η συγκέντρωσή τους κατά τη συντήρηση ενώ με γαλάζιο όσοι μειώνεται η συγκέντρωσή τους. Ο άξονας x δείχνει την τιμή της συσχέτισης

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων (Partitional Clustering) με την μέθοδο K-means. Λόγω της μεγάλης θερμοκρασίας (15°C), ορίστηκε η ομαδοποίηση των δεδομένων σε 2 κατηγορίες (συστάδες) στις οποίες κατανεμήθηκαν οι 8 κλάσεις και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-8. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται η μέση τιμή της Ολικής Μικροχλωρίδας (OMX ως $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) και η βαθμολογία της οργανοληπτικής εξέτασης βάση της οσμής των δειγμάτων. Η 1^η συστάδα περιλαμβάνει τα δείγματα που είχαν συντηρηθεί από 0-30h στους 15°C, ενώ φαίνεται να έχει ταξινομηθεί εσφαλμένα το δείγμα 15048A που αντιστοιχεί στις 48h και θα έπρεπε να εμπίπτει στην 2^η συστάδα. Το επίπεδο της OMX της 1^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε επίπεδο $2,9 < \log \text{CFU}/\text{cm}^2 < 5,5$, ενώ το εύρος τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι μικρότερο του 2, και επομένως τα δείγματα θεωρούνται ως αποδεκτά. Η 2^η συστάδα περιέχει τα δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου που συντηρήθηκαν από 48 έως 120h στους 15°C. Η OMX της 2^{ης} συστάδας κυμάνθηκε σε επίπεδο $\log \text{CFU}/\text{cm}^2 > 6,5$, ενώ το εύρος των μέσων τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι μεγαλύτερο από 2,7 και επομένως τα δείγματα θεωρούνται ως μη αποδεκτά.

Πίνακας 3.8: Οι συστάδες των δειγμάτων όπως προέκυψαν από την Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων k-means για την θερμοκρασία συντήρησης των 15°C

Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων K-Means				
ΣΥΣΤΑΔΕΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ (h)	TVC ^a	ODORS ^b
Cluster 1	00000A, 00000B, 00000D	0	2,97	1,13- 1,00 (1,06)
	15010A, 15010B, 15010C, 15010D	10	3,33	1,87-1,47 (1,67)
	15024A, 15024B, 15024C, 15024D	24	5,06	1,67-1,53 (1,6)
	15030A, 15030B, 15030C, 15030D	30	5,44	2,13-1,60 (1,87)
	15048A	48	6,39	2,47
Cluster 2	15048B, 15048C, 15048D	48	6,61	2,87-2,47 (2,74)
	15072A, 15072B, 15072C, 15072D	72	6,56	3,00-2,93 (2,97)
	15096A, 15096B, 15096C, 15096D	96	6,70	3,00 - 2,80(2,85)
	15120A, 15120C, 15120B, 15120D	120	6,95	2,83

^a: Total Vial Counts που απεικονίζουν τη μέση τιμή OMX (log CFU/cm²)

^b: Βαθμολογία οργανοληπτικής αξιολόγησης που αφορά την οσμή των δειγμάτων. Παρουσιάζεται το εύρος των τιμών (μέση τιμή). Η βαθμολογία πραγματοποιήθηκε σε κλίμακα (1-3) με βάση το επίπεδο αλλοίωσης/φρεσκότητας (1: επιθυμητό/ 2: αποδεκτό/ 3: μη αποδεκτό)

3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ

Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες, όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση ANOVA, PCA και PLS-DA, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.9. Περιλαμβάνονται σάκχαρα και φωσφορικά παράγωγα αυτών, αμινοξέα, οργανικά οξέα, προϊόντα διάσπασης νουκλεοτιδίων, βιογενείς αμίνες, αμινοξέα και άλλες ενώσεις. Οι μεταβολίτες αυτοί μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες ανεξαρτήτως θερμοκρασίας συντήρησης των δειγμάτων:

1. σε μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωσή τους παρουσιάζει αυξητική τάση κατά την διάρκεια της συντήρησης
2. σε μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωσή τους μειώνεται κατά την διάρκεια της συντήρησης

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αμίνες που αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών κατά τη σήψη του ζωικού ιστού, όπως η πουτρεσκίνη, η καδαβερίνη, η ορνιθίνη και η τυραμίνη. Επίσης, συγκαταλέγονται η υποξανθίνη η οποία αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών, το ηλεκτρικό οξύ, το οποίο αποτελεί ενδιάμεσο του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA), το νικοτινικό οξύ (ή νιασίνη), το οποίο αποτελεί μορφή της βιταμίνης B3, καθώς και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), το οποίο αποτελεί ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν σάκχαρα και φωσφορικά

παράγωγα αυτών, το κιτρικό οξύ, αμινοξέα όπως η λυσίνη, η ασπαραγίνη, και η προλίνη, η μαννιτόλη, η ουριδίνη και η 5-φωσφορική ριβουλόζη.

Πίνακας 3.9. Σημαντικοί μεταβολίτες ^a που είτε αυξάνονται (↑) είτε μειώνονται (↓) σημαντικά κατά την διάρκεια συντήρησης του φιλέτου στήθους κοτόπουλου σε διάφορες θερμοκρασίες

Σημαντικοί μεταβολίτες	0° C	5° C	10° C	15° C	MSI Level ^d	Αναγνωριστικό από βάση δεδομένων
Καδαβερίνη	↑	↑	↑	↑	2	CHEBI:18127
Τυραμίνη	↑	↑	↑	↑	3	CHEBI:15760
γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)	↑	↑	↑	↑	3	CHEBI:16865
Πουτρεσκίνη	↑	↑	↑	↑	2	CHEBI:17148
Υποξανθίνη	↑	↑	↑	↑	2	CHEBI:17368
Ηλεκτρικό οξύ	↑	↑	↑	↑	1	CHEBI:15741
Unknown_Αμίνη_1574 ^c	↑	↑	↑	↑	3	CHEBI:17568
Νικοτινικό οξύ	↑	↑	↑	↑	3	CHEBI:15940
Γλυκονο-1,5-λακτόνη	↑	n.s.	n.s.	n.s.	3	CHEBI:16217
D- γλυκονικό οξύ	↑	n.s.	n.s.	n.s.	2	HMDB0000625
L-ορνιθίνη	n.s.	↑	n.s.	n.s.	3	CHEBI:15729
Ξυλιτόλη	n.s.	↑	n.s.	n.s.	3	CHEBI:17151
Ουρακίλη	n.s.	↑	n.s.	n.s.	2	N/A
Sugar_2019	↓	↓	↓	↓	3	N/A
Sugar_1930	↓	↓	↓	↓	2	N/A
Φωσφορικό σάκχαρο 1	↓	↓	↓	n.s. ^b	3	N/A
Φωσφορικό σάκχαρο 2	n.s.	n.s.	↓	↓	2	N/A
Φωσφορικό σάκχαρο 3	↓	↓	↓	n.s.	2	N/A
Κιτρικό οξύ	n.s.	n.s.	↓	↓	1	CHEBI:30769
Ασπαραγίνη	n.s.	n.s.	↓	↓	3	CHEBI:22653
D-μαννιτόλη	n.s.	n.s.	↓	↓	2	CHEBI:16899
Γλυκόζη	n.s.	n.s.	↓	↓	2	CHEBI:17234
Προλίνη	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	3	CHEBI:26271
Ουριδίνη	n.s.	n.s.	↓	n.s.	2	CHEBI:16704
Λυσίνη	n.s.	n.s.	n.s.	↓	1	CHEBI:18019
5-φωσφορική ριβουλόζη	n.s.	n.s.	n.s.	↓	3	CHEBI:17363
Sugar_2182	n.s.	n.s.	n.s.	↓	3	N/A

^a Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων Kruskal-Wallis ANOVA, Pearson r correlation, heatmap και vip scores από PLS-DA / ^b Not significant / ^c ο αριθμός αναφέρεται στο Retention Index./ ^d 1:πρότυπη ουσία, 2:definitive 3:putative

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, διακρίνονται μεταβολές σε κύριους μεταβολίτες όπως είναι η τυραμίνη, η πουτρεσκίνη και η καδαβερίνη, σε αμινοξέα όπως η λυσίνη, η ασπαραγίνη, η προλίνη και η ορνιθίνη αλλά και στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ. Οι τρεις πρώτοι μεταβολίτες, είναι προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών που σχηματίζονται από την

βακτηριακή αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων, που συμβαίνει στην υδρόλυση πρωτεϊνών κατά τη σήψη του ζωικού ιστού (Wen et al., 2019). Υπάρχει σημαντική αύξηση στην συγκέντρωση των βιογενών αμινών εξαιτίας της αυτόλυσης και της έναρξης της βακτηριακής αλλοίωσης (Belitz, 2009). Τα ελεύθερα αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ποιότητας και φρεσκότητας (Leggio et al., 2012) αφού αποικοδομούνται για τον σχηματισμό αμινών (Wen et al., 2019), η παρουσία των οποίων επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα των τροφίμων (Mantloná et al., 2010). Επίσης, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ είναι ένα μη πρωτεϊνικό αμινοξύ το οποίο αποτελεί μεταβολικό προϊόν φυτών και μικροοργανισμών που παράγεται από την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού οξέος (Dhakal et al., 2012). Η αύξηση των μεταβολιτών αυτών κατά την διάρκεια της συντήρησης του φιλέτου στήθους κοτόπουλου τόσο χρονικά αλλά και κατά την αύξηση της θερμοκρασίας, ενδεχομένως να οφείλεται σε μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία πραγματοποιείται ταχέως. Έχει αναφερθεί ότι τα είδη *Pseudomonas*, *Proteus* και *Lactobacillus* στο κατεψυγμένο κρέας έχουν ισχυρή ικανότητα αποκαρβοξυλίωσης για τη μετατροπή των αμινοξέων σε αμίνες (Wen et al., 2018). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Wang et al., 2017, μικροοργανισμοί όπως οι *Aeromonas salmonicida* 35, *Pseudomonas fluorescens* H5 και *Pseudomonas fragi* H8 που απομονώθηκαν από κρέας κοτόπουλου που συντηρήθηκε υπό ψύξη, μπορούν να υδrolύσουν την πρωτεΐνη του κρέατος, να αυξήσουν το ολικό πτητικό βασικό άζωτο και να δημιουργήσουν αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και ενώσεις θείου κατά την αποθήκευση.

Οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια (βλ. 1.4.1) έχουν άμεση συμμετοχή στον μεταβολισμό άλλων ουσιών μέσω διαφορετικών βιοχημικών διεργασιών και είναι σημαντικοί δείκτες για τη μέτρηση της φρεσκότητας του κρέατος. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε αύξηση της υποξανθίνης, κατά τη διάρκεια της συντήρησης για όλες τις θερμοκρασίες, η οποία αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης του IMP και έχει πικρή γεύση, επομένως διαδραματίζει σημαντικό σημαντικό ρόλο στις αλλαγές της γεύσης του κρέατος κατά την αποθήκευση (Li et al., 2017).

Οργανικά οξέα, όπως το ηλεκτρικό οξύ και το νικοτινικό οξύ συγκαταλέγονται στους μεταβολίτες που παρουσίασαν αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Το ηλεκτρικό οξύ συγκαταλέγεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και έχει αναφερθεί ότι προέρχεται από στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Wen et al., 2019).

Επιπλέον, παρατηρείται μείωση των φωσφορικών και μη σακχάρων, όπως η 5 φωσφορική ριβουλόζη και η γλυκόζη, τα οποία αποτελούν σημαντικούς δείκτες αλλοίωσης, καθώς εμπλέκονται στον κύκλο της γλυκόζης (Nychas & Tassou, 1997). Αλλά και μεταβολές στα ελεύθερα αμινοξέα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ποιότητας και φρεσκότητας λόγω αποικοδόμησής τους για τον σχηματισμό αμινών.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι μελέτες της μεταβολομικής για την εκτίμηση της αλλοίωσης και της αξιολόγησης της ποιότητας του φιλέτου από στήθος κοτόπουλου είναι ελάχιστες. Ωστόσο, συγκρίνοντας τους σημαντικούς μεταβολίτες που προκύπτουν από την παρούσα εργασία με τις ενώσεις που προτείνονται από την βιβλιογραφία ως αξιόπιστοι βιοδείκτες ποιότητας, μπορούμε να παρατηρήσουμε σημαντικές ομοιότητες.

Σύμφωνα με την μελέτη των Aliani et al., (2013) που πραγματοποιήθηκε σε στήθος κοτόπουλου, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του σφαγίου μετά τη σφαγή και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης με ψύξη είχαν σημαντικές ομοιότητες με την παρούσα μελέτη. Η συγκέντρωση της γλυκόζης παρέμεινε παρόμοια καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου, ενώ αυτή της 6-φωσφορικής γλυκόζης μειώθηκε γραμμικά. Οι συγκεντρώσεις της ινοσίνης, της ριβόζης και της υποξανθίνης αυξήθηκαν σταδιακά μετά τη σφαγή. Η γλυκόζη και η 6-φωσφορική γλυκόζη υπήρχαν σε πρώιμο στάδιο μετά τη σφαγή και παρέμειναν σε παρόμοιες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας.

Επιπλέον, σύμφωνα με τους Fraqueza et al., (1996) διαπιστώθηκε ότι η τυραμίνη αυξάνει σημαντικά στο κρέας πουλερικών κατά την αποθήκευση σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Ομοίως, αποτελέσματα της έρευνας των (Vinci & Antonelli, 2002) έδειξαν ότι τα επίπεδα των βιογενών αμινών ήταν δείκτες αλλοίωσης τόσο στο κόκκινο κρέας όσο και στο κρέας κοτόπουλου. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της τυραμίνης φαίνεται πως αυξήθηκε νωρίτερα και ταχύτερα κατά τη διάρκεια της συντήρησης στο κρέας κοτόπουλου σε σχέση με το βόειο κρέας. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία βραχύτερων μυϊκών ινών στο κοτόπουλο και συνεπώς στην παρουσία πρωτεϊνών με βραχύτερες αλυσίδες σε σύγκριση με εκείνες του αγελαδινού κρέατος και επομένως, υπάρχει διευκόλυνση της προσβολής από πρωτεολυτικά ένζυμα και αυξανόμενες ποσότητες πρόδρομων αμινοξέων που συνεισφέρουν στην βιοσύνθεση των αμινών. Σύμφωνα με τους Wen et al., (2018), οι *Pseudomonads* αποτελούν τους κύριους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς στο κρέας κοτόπουλου, ακολουθούμενοι από τους *Shewanellaceae* οι οποίοι παράγουν την καδαβερίνη (Xiaochang Liu et al., 2018).

Ενδιαφέροντα ευρήματα απαντώνται και σε έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε άλλα είδη κρέατος. Στην εργασία των Lana et al., (2015) μελετήθηκαν οι μεταβολές τη ποιότητας βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στον 1 °C για 0, 1, 10, 17 και 44 ημέρες και διαπιστώθηκε ότι το γλουταμινικό οξύ, η σερίνη και η αργινίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράμετροι ή δείκτες της γεύσης του κρέατος.

3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, ο προσδιορισμός του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών του φιλέτου στήθους κοτόπουλου, με χρήση GC/MS, αποδείχθηκε ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση των μεταβολών που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο, κατά την διάρκεια της συντήρησής του σε διάφορες θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής ανάλυσης, προέκυψε ομαδοποίηση των δειγμάτων σε κλάσεις, οι οποίες αντιπροσώπευαν τα διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας. Επομένως, οι διάφοροι μεταβολίτες εμπεριέχουν πληροφορία σχετικά με τον χρόνο συντήρησης του φιλέτου κοτόπουλου. Ανιχνεύθηκαν 27 σημαντικοί μεταβολίτες, όπως αμινοξέα, σάκχαρα (και παράγωγά τους), αμίνες, οργανικά οξέα και άλλες ενώσεις, οι οποίες παρουσίασαν είτε σημαντική αύξηση είτε σημαντική μείωση κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Επομένως, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες αλλοίωσης ή φρεσκότητας, αντιστοίχως.

Η υποξανθίνη, η οποία αποτελεί προϊόν διάσπασης νουκλεοτιδίων, παρουσίασε αύξηση κατά την διάρκεια της συντήρησης σε όλες τις θερμοκρασίες. Αμίνες, όπως η πουτρεσκίνη, η καδαβερίνη και η τυραμίνη αυξήθηκαν επίσης, γεγονός αναμενόμενο βάσει της βιβλιογραφίας, δεδομένου ότι η παραγωγή τους συνδέεται άμεσα με τον πληθυσμό των ψευδομονάδων (*Pseudomonas*) και των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae spp*).

Από τη σύγκριση των μεταβολωμικών δεδομένων με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά δεδομένα, φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω στατιστική επεξεργασία για την απόδειξή της.

Η ποιότητα του φιλέτου στήθους κοτόπουλου, είναι μια πολύπλοκη έννοια που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως συμβατικές μέθοδοι, όμως η μεταβολωμική ανάλυση φαίνεται να αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανεύρεση δεικτών αλλοίωσης, προκειμένου να αναπτυχθούν ταχείες και εκλεκτικές μέθοδοι προσδιορισμού της φρεσκότητας του κοτόπουλου και εν γένει άλλου τύπου κρεάτων.

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abasht, B., Mutryn, M. F., Michalek, R. D., & Lee, W. R. (2016). *Oxidative Stress and Metabolic Perturbations in Wooden Breast Disorder in Chickens*. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153750>
- Ali, S., Kang, G., Yang, H., Jeong, J., Hwang, Y., Park, G., & Joo, S. (2007). *A Comparison of Meat Characteristics between Duck and Chicken Breast*. 20(6), 1002–1006.
- Aliani, M., Farmer, L. J., Kennedy, J. T., Moss, B. W., & Gordon, A. (2013). Post-slaughter changes in ATP metabolites, reducing and phosphorylated sugars in chicken meat. *MESC*, 94(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.032>
- Aparecida da Silva-Buzanello, R., Schuch, A., Nogues, D., Falcao de Melo, P., Gasparin, A., Torquato, A., Canan, C., Soares, A., (2018). Physicochemical and biochemical parameters of chicken breast meat influenced by stunning methods. *Poultry Science*, 97, 3786–3792, <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey281>
- Balamatsia., C.C., Patsias, A., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N., (2007). Possible role of volatile amines as quality indicating metabolites in modified atmosphere- packaged chicken fillets: Corellation with microbiological and sensory attributes. *Food Chemistry*. 104 (4), 1622-1628
- Bijlsma, S., Bobeldijk, I., Verheij, E. R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I. A., van Ommen, B., Smilde, A. K. (2006). Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation. *Analytical Chemistry*, 78, 567–574. <https://doi.org/10.1021/ac051495j>
- Cajka, T., Danhelova, H., & Zachariasova, M. (2013). *Application of direct analysis in real time – mass spectrometry (DART – MS) in chicken meat metabolomics aiming at retrospective control of feed fraud Application of direct analysis in real time ionization – mass spectrometry (DART – MS) in chicken meat metabolomics aiming at the retrospective control of feed fraud. June 2014*. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0495-z>
- Cajka., T., Showalter, M.R., Riddellova, K., Fiehn, O. (2016). Advances in Mass Spectrometry for Food Authenticity Testing: An Omics Perspective. *Advances in Food Authenticity Testing* 171-200 doi:10.1016/B978-0-08-100220-9.00007-2
- Cao, M., Zhang, J., Zhang, R., Wang, J., Gu, W., Kang, W., Lian, K., & Ai, L. (2020). An untargeted and pseudotargeted metabolomic combination approach to identify differential markers to distinguish live from dead pork meat by liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1610, 460553. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460553>

- Cevallos-cevallos, J. M., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11–12), 557–566. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.002>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. (2018). *MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis*. 46(May), 486–494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Conte-júnior, C. A., Carolina, A., Lucia, M., Monteiro, G., Costa-lima, B., Gomes, A., & M, E. T. (2015). *LWT - Food Science and Technology Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species* *sar Aquiles L a.* 60, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.025>
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Trends in Analytical Chemistry Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., Baek, K., & Korea, R. (2012). *PRODUCTION OF GABA (γ - AMINOBUTYRIC ACID) BY MICROORGANISMS: A REVIEW ABSTRACT GABA (γ - aminobutyric acid) is a four carbon non-protein amino acid that is widely distributed in plants , animals and microorganisms . As a metabolic product of plants a.* 1230–1241.
- Dudzik, D., Barbas-bernardos, C., García, A., & Barbas, C. (2018). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics . a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 149–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.044>
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-mcintyre, S., Anderson, N. Consortium, H. (2011). Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, (335). <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>, 6 (7), 1061–1066
- European Council Regulation No. 1234/2007, (2007). (Acts adopted under the EC Treaty / Euratom Treaty whose publication is obligatory), (Annex XIV-B-II.2), 263. URL <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.douri=CONSLEG:2007R1234:20110101:EN:PDF>.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., & Goodacre, R. (2004). *Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning*. 514, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.060>
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. In *Functional genomics* (pp. 155–171). Kluwer Academic Publishers
- Fiehn, O. (2006). Metabolite profiling in Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 323(4), 439–447. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:439>
- Fiehn, O. (2007). Validated high quality automated metabolome analysis of Arabidopsis: Quality control charts and standard operating procedures. *Concepts in Plant Metabolomics*, 1–18

- Fiehn, O. (2013). Fiehn GC / MS Metabolomics RTL Library. *Application Note, Agilent Technologies*, 221
- Fiehn, O. (2016). *Metabolomics by Gas Chromatography – Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling* (Issue April). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72(15), 3573–3580. <https://doi.org/10.1021/ac991142i>
- Field, N. E. (2004). *Guest Editorial Metabolomics — A New Exciting Field within the “omics” Sciences*. 7, 396–397.
- Fraqueza, M. J., Alfaia, C. M., & Barreto, A. S. (1996). Biogenic amine formation in turkey meat under modified atmosphere packaging with extended shelf life: Index of freshness. *Poultry Science*, 91(6), 1465–1472. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01577>
- Fredrickson, M. M., & Chen, Y. (2019). Permutation and randomization tests for network analysis. *Social Networks*, 59(August), 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.socnet.2019.08.001>
- Gallart-Ayala, H., Chereau, S., Dervilly-Pinel, G., Le Bizec, B. (2015). Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. *Bioanalysis*, 7(1) <https://doi.org/10.4155/bio.14.267>
- Gallo, M., & Ferranti, P. (2016). The evolution of analytical chemistry methods in foodomics. *Journal of Chromatography A*, 1428, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.007>
- Gao, Y., Chen, Y., Yue, X., He, J., Zhang, R., Xu, J., Zhou, Z., Wang, Z., Zhang, R., & Abliz, Z. (2018). Analytica Chimica Acta Development of simultaneous targeted metabolite quantification and untargeted metabolomics strategy using dual-column liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1037(1), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.042>
- Gonzalez-riano, C., Garcia, A., & Barbas, C. (2016). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Metabolomics studies in brain tissue: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 141–168. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.008>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., & Tauler, R. (2016). Trends in Analytical Chemistry Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *Trends in Analytical Chemistry*, 82, 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>
- Hermo, M.P., Gómez-Rodríguez, P., Barbosa, J., Barrón, D. (2013). Metabolomic assays of amoxicillin, cephapirin and ceftiofur in chicken muscle: Application to treated chicken samples by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85, 169-178
- Hernández-Cázares, A.S., Aristoy, M.C., Toldrá, F. (2010). Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness. *Food Chemistry* 123 (3), 949-954

- Howgate, P. (2006). A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *Int. Journal Food Science Technology*, 41 341-353 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01077.x>
- Janeckova, H., Kalivodova, A., Najdekr, L., Friedecky, D., Hron, K., Bruheim, P., & Adam, T. (2015). *Untargeted metabolomic analysis of urine samples in the diagnosis of some*. 159(4), 582–585
- Javaid, S., Javid, A., Farooq, U., Kiran, U., Akmal, T., (2017). Variations in meat chemical composition of some captive avian species. *Journal of Rural Development and Agriculture* 2(1), 57-65
- Johnson, J., Atkin, D., Lee, K., Sell, M., & Chandra, S. (2019). Determining meat freshness using electrochemistry: Are we ready for the fast and furious? *Meat Science*, 150(December 2018), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.12.002>
- Kanani, H. H., & Klapa, M. I. (2007). *Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography – mass spectrometry*. 9, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.08.001>
- Keramidou, I., Mimis, A., Pappa, E. (2011). Performance evaluation of the poultry sector in Greece. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9 (2), 431-437
- Khulal, U., Zhao, J., Hu, W., & Chen, Q. (2016). *Nondestructive quantifying total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in chicken using hyperspectral imaging (HSI) technique combined with different data dimension reduction algorithms*. 197, 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.084>
- Koutsoumanis, K., & Sofos, J. N. (2004). *Microbial contamination of carcasses and cuts*. December. <https://doi.org/10.1016/B0-12-464970-X/00070-2>
- Kowalczyk, T., Ciborowski, M., Kisluk, J., Kretowski, A., & Barbas, C. (2020). BBA - Molecular Basis of Disease Mass spectrometry based proteomics and metabolomics in personalized oncology. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165690. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165690>
- Krastanov, A. (2014). *Metabolomics — The State of Art METABOLOMICS – THE STATE OF ART*. 2818(2010). <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0001-Y>
- Lana, A., Longo, V., Dalmaso, A., Alessandro, A. D., Teresa, M., & Zolla, L. (2015). Omics integrating physical techniques: Aged Piedmontese meat analysis. *FOOD CHEMISTRY*, 172, 731–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.146>
- Lázaro, C. A., Monteiro, M. L. G., Canto, A. C. V. S., Mano, S. B., & Franco, R. M. (2009). *Effects of ultraviolet light on biogenic amines and other quality indicators of chicken meat during refrigerated storage*. 2304–2313. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03642>
- Lechtenfeld, O.J, Hertkorn, N., Shen, Y., Witt, M., Benner, R. (2015). Marine sequestration of carbon in bacterial metabolites, *Nat. Commun*, 6, 6711
- Leggio, A., Belsito, E. L., Marco, R. De, Liguori, A., & Siciliano, C. (2012). Simultaneous extraction and derivatization of amino acids and free fatty acids in meat products. *Journal of Chromatography A*, 1241, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.029>

- Li, Q, Zhang, L., Lu, H., Song, S., Luo, Y. (2017). Comparison of postmortem changes in ATP-related compounds, protein degradation and endogenous enzyme activity of white muscle and dark muscle from common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4 degrees C. *Lwt-Food Science Technology*, 78,317-324 doi: 10.1016/j.lwt.2016.12.035
- Li, Y., Tang, X., Shen, Z., & Dong, J. (2019). Prediction of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content of chilled beef for freshness evaluation by using viscoelasticity based on airflow and laser technique. *Food Chemistry*, 287(January), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.213>
- Liu, Xiaochang, Huang, Z., Jia, S., Zhang, J., Li, K., & Luo, Y. (2018). The roles of bacteria in the biochemical changes of chill-stored bighead carp (*Aristichthys nobilis*): Proteins degradation, biogenic amines accumulation, volatiles production and nucleotides catabolism. *Food Chemistry*, 255 (February), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.069>
- Liu, Xiaojing, & Locasale, J. W. (2017). Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>
- Lytou, A.E, Panagou, E.Z., Nychas, G.J.E. (2017). Effect of different marinating conditions on the evolution of spoilage microbiota and metabolomic profile of chicken breast fillets. *Food Microbiology*, 66,141-149
- Mantlová, G., Cablová, A., & Svec, P. (2010). *The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese Leona Bu n.* 27, 880–888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.014>
- Manuela, P., Cardoso, D. C., Filipa, A., & Vicente, B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *MESC*, 93(3), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-stolle, F., García, A., & Barbas, C. (2015). Analytica Chimica Acta From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC- (EI) -Q-MS. *Analytica Chimica Acta*, 900, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.001>
- Mataragas, M., Skandamis, P. N., & Drosinos, E. H. (2008). *International Journal of Food Microbiology Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen / product combinations.* 126, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.014>
- Nychas G, Marshall D, Sofos J.(2007). Meat, Poultry, and Seafood. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition*, 105-140 doi: 10.1128/9781555815912.ch6
- Okuma, H., Okazaki, W., Usami, R., & Horikoshi, K. (2000). *Development of the enzyme reactor system with an amperometric detection and application to estimation of the incipient stage of spoilage of chicken.* 411, 37–43
- Park, I.S., Cho, Y.J., Kim, N. (2000). Characterization and meat freshness application of a serial three-enzyme reactor system measuring ATP-degradative compounds. *Analytica Chimica Acta* 404, 75–81

- Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (n.d.). *A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products*. 1–31
- Putnik, P., Granato, D., Gomes Da Cruz, A., Ye Rodionova, O., Pomerantsev, A., Rocchetti, G., Lucini, L., Bursac Kovacevic, D. (2019). Trends in chemometrics and meat products. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 333, 012016 doi: 10.1088/1755-1315/333/1/012016
- Romero-gonza, R., & Frenich, A. G. (2019). *ScienceDirect Metabolomics approaches for the determination of multiple contaminants in food ' a Lo Rosali*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.006>
- Rukchon, C., Nopwinyuwong, A., & Trevanich, S. (2014). Talanta Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. *Talanta*, 130, 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.048>
- Schwahn, K., Souza, L. P. De, Fernie, A. R., & Tohge, T. (2013). *Metabolomics - assisted refinement of the pathways of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in the tomato clade*. <https://doi.org/10.1111/jipb.12274>
- Scotia, N. (2011). *Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques : A Critical Review* D . Dave and A . E . Ghaly Department of Process Engineering and Applied Science. 6(4), 486–510.
- Surowiec, I., Fraser, P.D., Patel, R., Halket, J., Bramley, P.M. (2011). Metabolomic approach for the detection of mechanically recovered meat in food products. *Food Chemistry*, 125 (4), 1468-1475
- Toldrá, F. (2006). Meat: Chemistry and biochemistry. *Handbook of food science, technology and engineering*, 28,1–28.18
- Toldra, F. (2006). *The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions*. 17, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.08.007>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., ... Arita, M (2015). MS/DIAL: data independent MS / MS deconvolution focomprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12(6), 523–531. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Vinaixa, M., Schymanski, E. L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R. M., & Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 78, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>
- Vazquez-roig, P., & Picó, Y. (2015). Trends in Analytical Chemistry Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.014>
- Viant, M. R. (2007). *Metabolomics of aquatic organisms : the new ' omics ' on the block*. 332(Viant 2003), 301–306.
- Vinci, G., & Antonelli, M. L. (2002). *Biogenic amines : quality index of freshness in red and white meat*. 13, 519–524

- Wang, G., Wang, H., Han, Y., Xing, T., Ye, K., Xu, X., & Zhou, G. (2017). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. *Food Microbiology*, 63, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.015>
- Wen, D., Cheng, S., Liu, Y., Yu, Q. (2018). Analysis of bacterial community diversity of chilled chicken at different enrichment temperatures using high-throughput Sequencing. *Food Science*, 39, 56-161
- Wen, D., Liu, Y., & Yu, Q. (2019). Metabolomic approach to measuring quality of chilled chicken meat during storage. *Poultry Science*, 501. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.070>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns , functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature Protocols*, 6(6), 743–760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. In *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 14.10.1- 14.10.91 <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Xia, J., Sinelnikov, I. V, Han, B., & Wishart, D. S. (2015). *MetaboAnalyst 3 . 0 — making metabolomics more meaningful*. 43(April), 251–257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv380>
- Yi, L., Dong, N., Yun, Y., Deng, B., & Ren, D. (2016). Analytica Chimica Acta Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics : A review. *Analytica Chimica Acta*, 914, 17–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.001>
- Yu, D.J., Na, J.C., Kim, S.H., Kim, J.H., Kang, G.H., Kim, H.K., Seo, O.S. & Lee, J.C. (2008). Effects of dietary selenium sources on the growth performance and selenium retention of meat in broiler chickens. *Proceedings XIII World's Poultry Congress*.
- Zdragas, A., Mazaraki, K., Vafeas, G., Giantzi, V., Papadopoulos, T., & Ekateriniadou, L. (2012). *Prevalence , seasonal occurrence and antimicrobial resistance of Salmonella in poultry retail products in Greece*. 308–313. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03298>.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Χημεία Τροφίμων* (4th Edition). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 590-620
- Θεοδωρίδης, Γ. (n.d.). *Κεφάλαιο 2 : Βιολογία Συστημάτων , Τεχνολογίες Omics*. 1–21
- Κοτζεκίδου, Π.- Ρουκά (1993). «*Μικροβιολογία Τροφίμων*». Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων, Τομέας Γεωργικών Βιομηχανιών- Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τομέας Γεωπονίας Α. Π. Θ.

Διαδίκτυο

EFSA., 2012 The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA J., 10, 2597.

EFSA., 2018 The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017, EFSA J., 16(12), 5500,

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI): <https://www.ebi.ac.uk/chebi/aboutChebiForward.do>

FAO 2013: Poultry Development review <http://www.fao.org/3/i3531e/i3531e.pdf>

FAO 2019: Gateway to poultry production and products <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/en/>

MS-DIAL: <http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>

NIST EI-MS Database <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>

Shimadzu Tutorial: Fundamentals of GC_MS: https://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=Fundamentals_gcms1

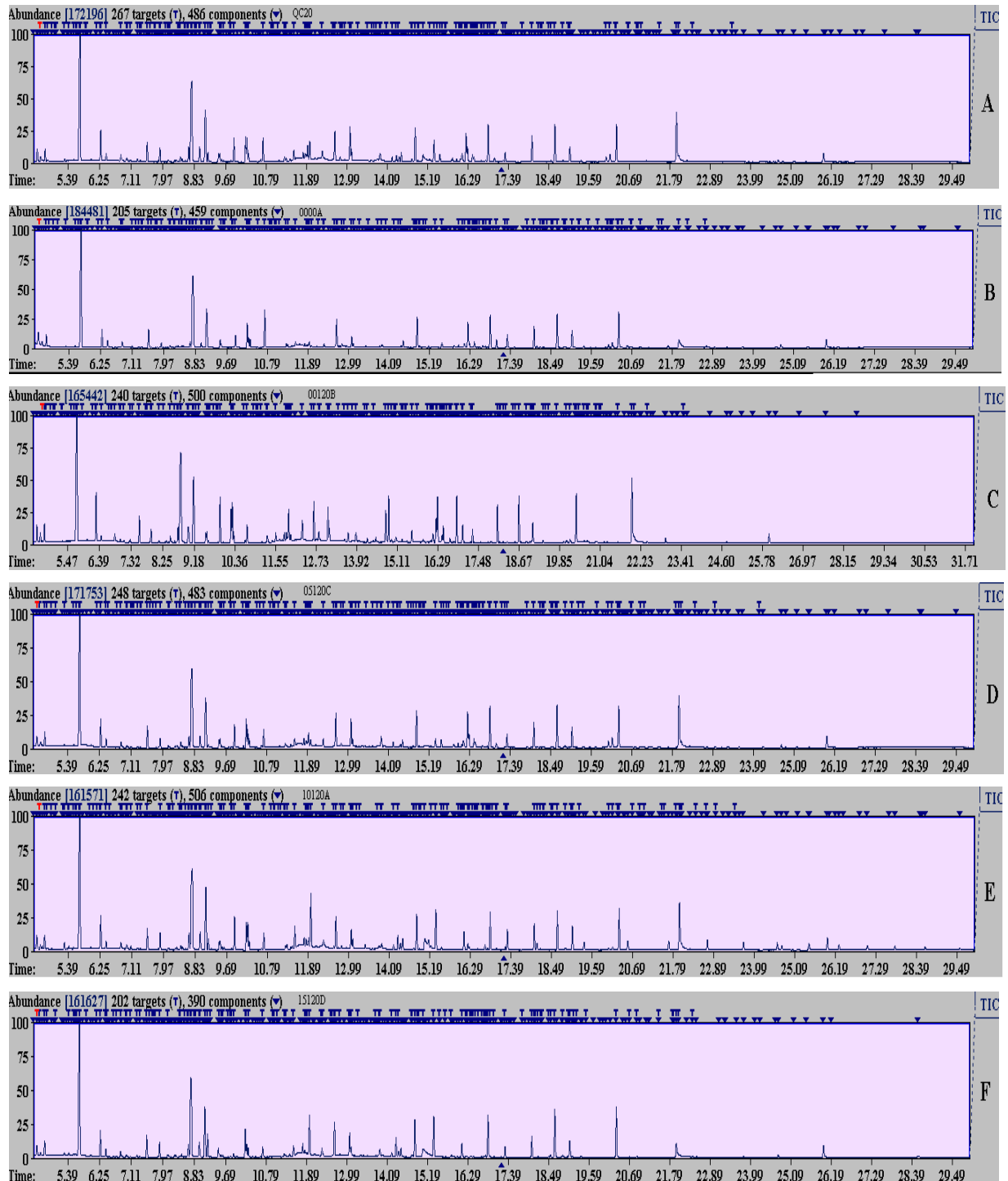
The Golm Metabolome Database (GMD)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π-1. Αλληλουχία των δειγμάτων στις παρτίδες (Batch) για την τοποθέτησή τους στο GC

BATCH 0 °C	BATCH 5 °C	BATCH 10 °C	BATCH 10 °C
QC1	QC11	QC21	QC31
QC2	QC12	QC22	QC32
QC3	QC13	QC23	QC33
QC4	QC14	QC24	QC34
BLANK1	BLANK3	BLANK5	BLANK7
00168A	05096B	10168D	15010A
00240C	05168D	10048A	15024A
00120A	05216C	10168A	15120B
00384B	05216B	10024C	15072C
QC5	QC15	QC25	QC35
00120D	05168C	10168C	15120D
00168D	05120C	10192B	15048C
00240D	05096A	10168B	15010C
00432B	05168B	10192D	15024D
QC6	QC16	QC26	QC36
00048C	05168A	10072A	15024C
00432D	05096D	10120B	15120C
00120B	05216A	10024B	15048D
00288A	05096C	10024A	15096B
QC7	QC17	QC27	QC37
00168B	05288C	10024D	15030B
00240B	05288B	10096B	15030D
00432C	05024B	10096D	15048B
00168C	05120D	10120C	15010D
BLANK2	BLANK4	BLANK6	BLANK8
QC8	QC18	QC28	QC38
00288D	05216D	10072D	15024B
00288C	05048D	10048C	15096D
00048D	05048C	10096C	15048A
00120C	05024D	10072B	15030C
QC9	QC19	QC29	QC39
00240A	05120B	10096A	15120A
00048A	05288A	10120D	15096A
00048B	05024A	10048D	15072B
00384D	05288D	10120A	15072D
QC10	QC20	QC30	QC40
00288B	05024C	10072C	15010B
00384A	05048B	10048B	15030A
00384C	05120A	10192C	15096C
00432A	05048A	10192A	15072A
00000A	00000B	00000C	00000D

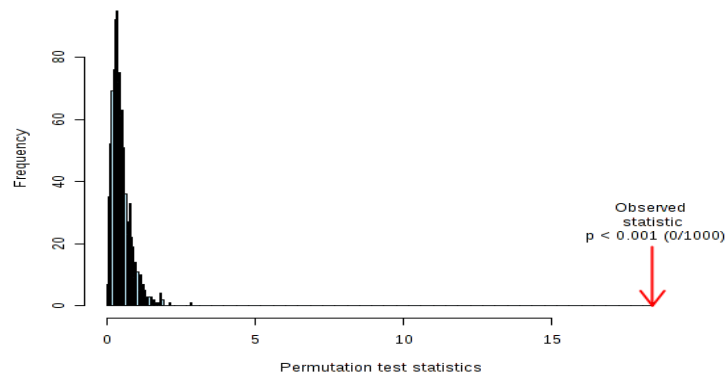
Π-2. Ενδεικτικά χρωματογραφήματα μεταβολιτών με GCMS δειγμάτων (A) QC, (B) κατά την παραλαβή, (C) στην συντήρηση των 0°C, (D) στην συντήρηση των 5°C, (E) στην συντήρηση των 10°C, (F) στην συντήρηση των 15°C



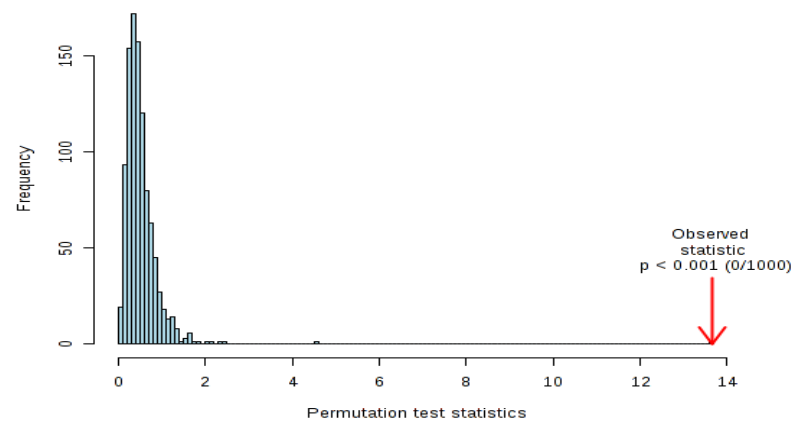
Π-3. Κατάλογος μεταβολιτών (ως TMS παράγωγα) που προέκυψαν και οι αντίστοιχοι δείκτες κατακράτησης Kovats

RI	m/z	Μεταβολίτες	RI	m/z	Μεταβολίτες	RI	m/z	Μεταβολίτες
1066	73	Γαλακτικό οξύ	156		Γλουταμικό οξύ	1883	264	Αδενίνη TMS
	116	Αλανίνη	1539	232	Ασπαρτικό οξύ 3TMS		179	Τυροσίνη
	86	Λευκίνη	1543	174	γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)		103	Φρουκτόζη
1167	147	3-Υδροξυβουτυρικό οξύ 2 TMS	1544	230	4-Υδροξυ-L-προλίνη 3TMS	1919		Γλυκογόνο-1,5-λακτόνη 1
1135	131	2-Υδροξυβουτυρικό οξύ 2 TMS	1570	292	Threonic acid	1927	319	Μαννόζη_1_major
	86	Ισολευκίνη	1572	115	Κρεατινίνη 3TMS	1928	174	Τυραμίνη 3TMS
	72	L-Βαλίνη	1574		UNKNOWN_αμίνη_1574	1929		Sugar_1930
	116	Σερίνη	1595	142	UNKNOWN_1595			Γλυκόζη
1277	174	Αιθανολαμίνη_3TMS	1597		UNKNOWN_1597	1970	319	D-Μαννιτόλη_6TMS
1289	299	Φωσφορικό οξύ 3TMS	1613	100	Υποταυρίνη	1979	147	Ασκορβικό οξύ 4TMS
1299	180	Νικοτινικό οξύ TMS		73	Φαινυλαλανίνη	1992	358	UNKNOWN_1992
1307	142	Προλίνη 2TMS	1712	103	Ριβόζη+Ξυλουλόζη	2006	174	UNKNOWN_2006
1318	174	Γλυκίνη 3TMS	1742	103	Ξυλιτόλη_5TMS	2017	103	Παντοθενικό οξύ 3TMS
1323	147	Ηλεκτρικό οξύ 2TMS	1753	174	Πουτρεσκίνη_4TMS	2018	204	SUGAR_2019
1347	147	Γλυκερικό οξύ 3TMS	1759	147	Ribitol_5TMS	2045	333	D-Γλυκονικό οξύ 6TMS
1350	241	Ουρακίλη 2TMS	1765	73	UNKNOWN_1765	2131	305	Ινοσιτόλη 6TMS
1354	245	Φουμαρικό οξύ 2TMS	1799	292	Ριβονικό οξύ_5TMS	2157	315	5- Φωσφορική αραβινόζη
1369	58	4-Methylbenzoic acid_TMS	1807	299	Φωσφοαιθανολαμίνη_4TMS	2165	357	5- φωσφορική ριβουλόζη+ 5φωσφορική ξυλουλόζη
1403	117	Θρεονίνη_3TMS_major	1808	217	Xylonic acid_5TMS	2182	319	SUGAR_2182
	56	Μεθειονίνη	1822	265	Υποξανθίνη 2TMS	2226	202	L-Θρυπτοφάνη 3TMS
1439	248	b-Αλανίνη_3TMS	1839	142	L-Ορνιθίνη_4TMS			Φωσφορικό σάκχαρο 1
1474		UNKNOWN_1474	1843	204	SUGAR_1844			Φωσφορικό σάκχαρο 2
1487	179	Νικοτιναμίδιο TMS	1848	273	Κιτρικό οξύ_4TMS			Φωσφορικό σάκχαρο 3
1499		UNKNOWN_1499	1851	174	Καδαβερίνη 4TMS	2454	217	Ουριδίνη 3TMS
1508	147	Μηλικό οξύ 3 TMS		174	Λυσίνη	2546	73	Ινοσίνη 4TMS
	100	Ασπαραγίνη	1876	173	Αφυδροασκορβικό οξύ	2552	387	N-Acetyl glucosamine 6-phosphate_1
1515	160	Αδιπικό οξύ 2TMS						

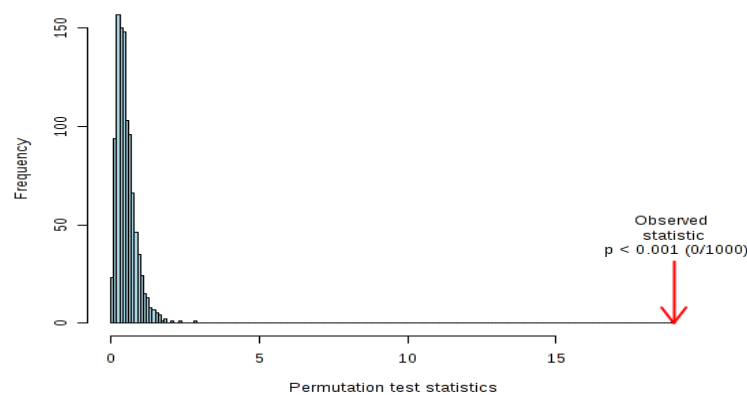
Π-4. Διαγράμματα κατανομής τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA για τις θερμοκρασίες των 5 °C, 10 °C και 15 °C



Διάγραμμα 1. Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA για την θερμοκρασία των 5°C. Η επίδοση των μοντέλου έγινε με χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within)



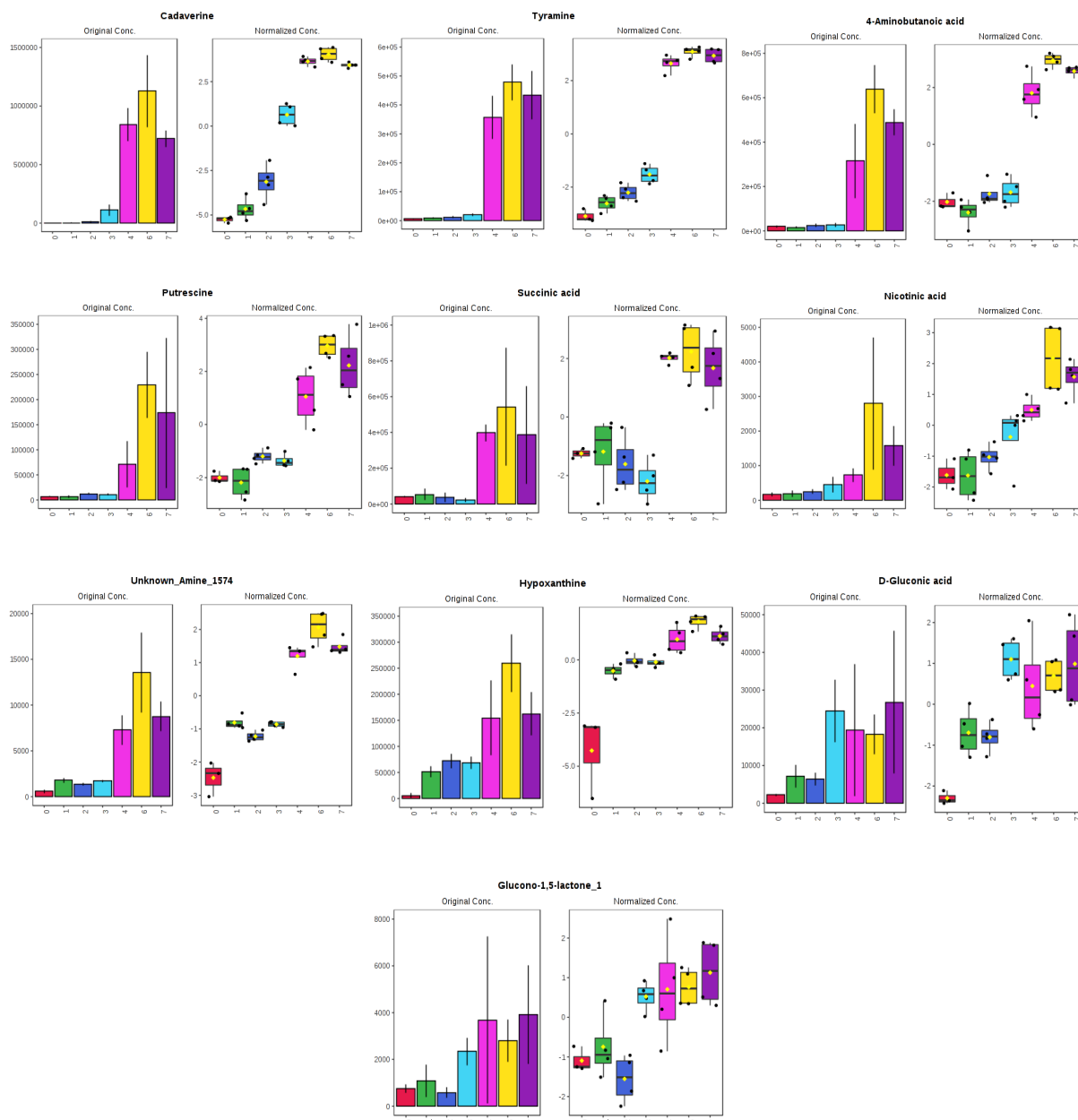
Διάγραμμα 2. Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA για την θερμοκρασία των 10°C. Η επίδοση των μοντέλου έγινε με χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within)

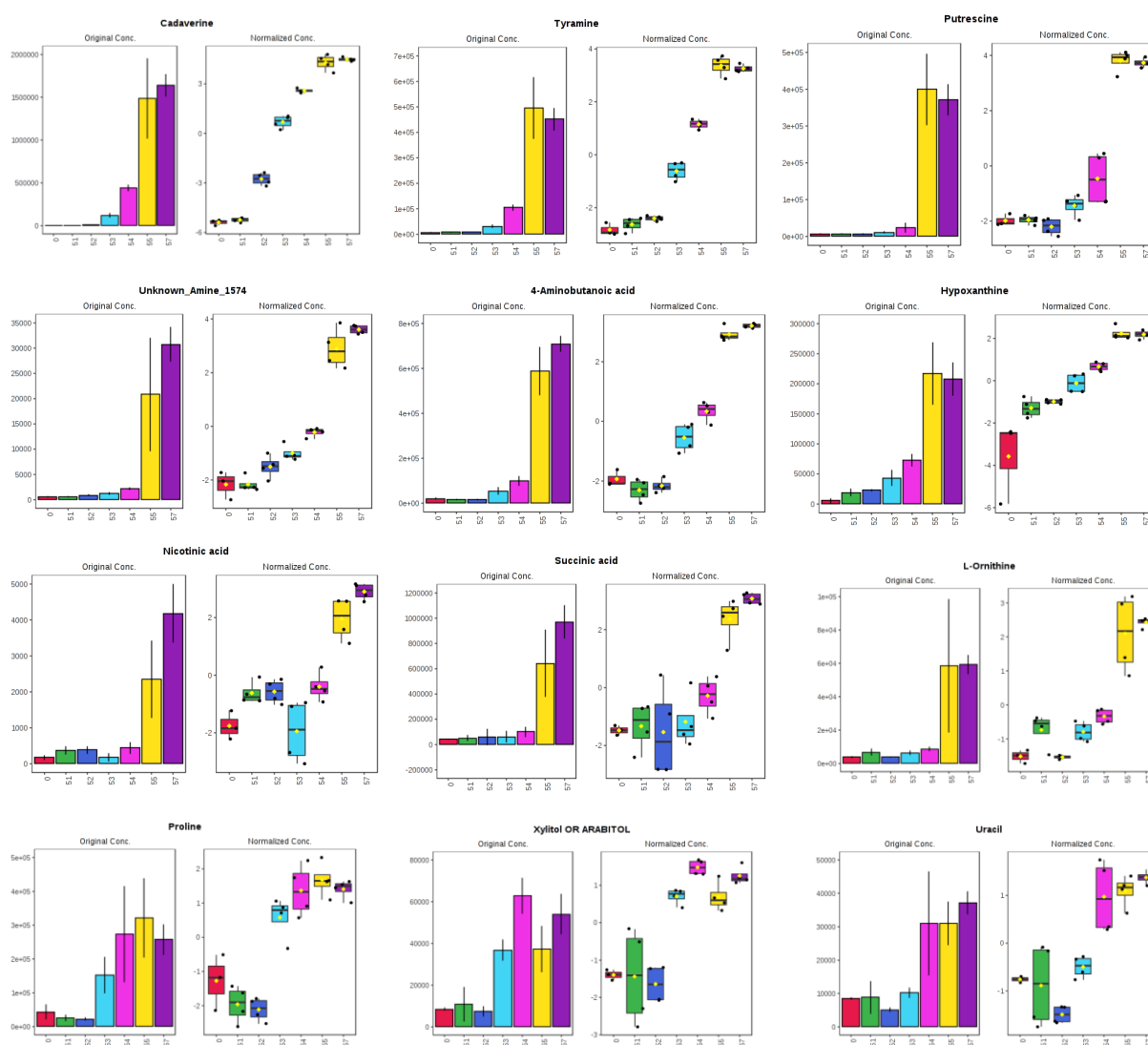
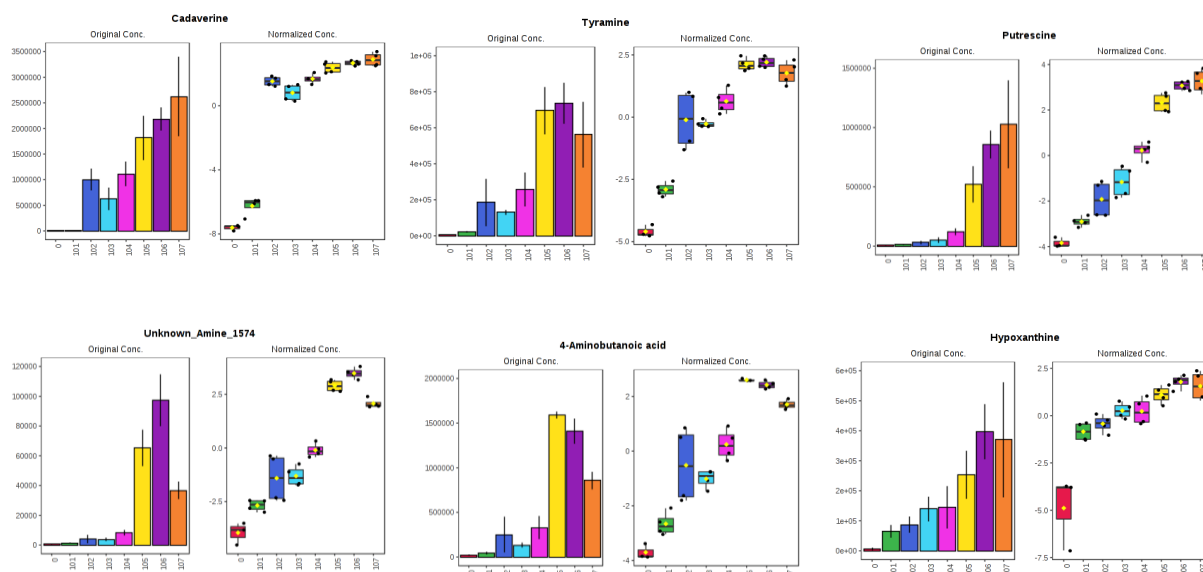


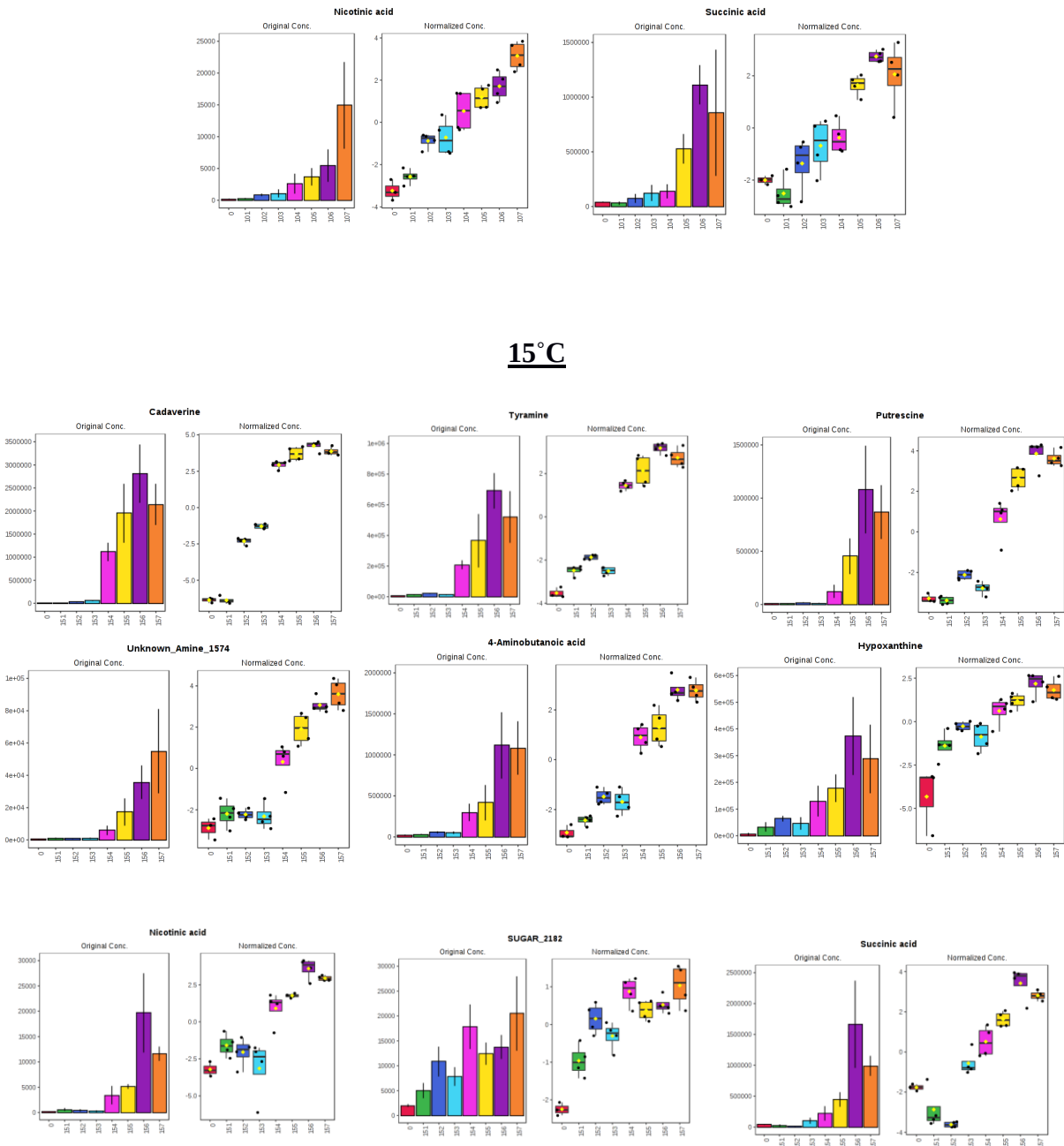
Διάγραμμα 3. Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA για την θερμοκρασία των 15°C. Η επίδοση των μοντέλου έγινε με χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within)

Π-5. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του φιλέτου στήθους κοτόπουλου

0°C

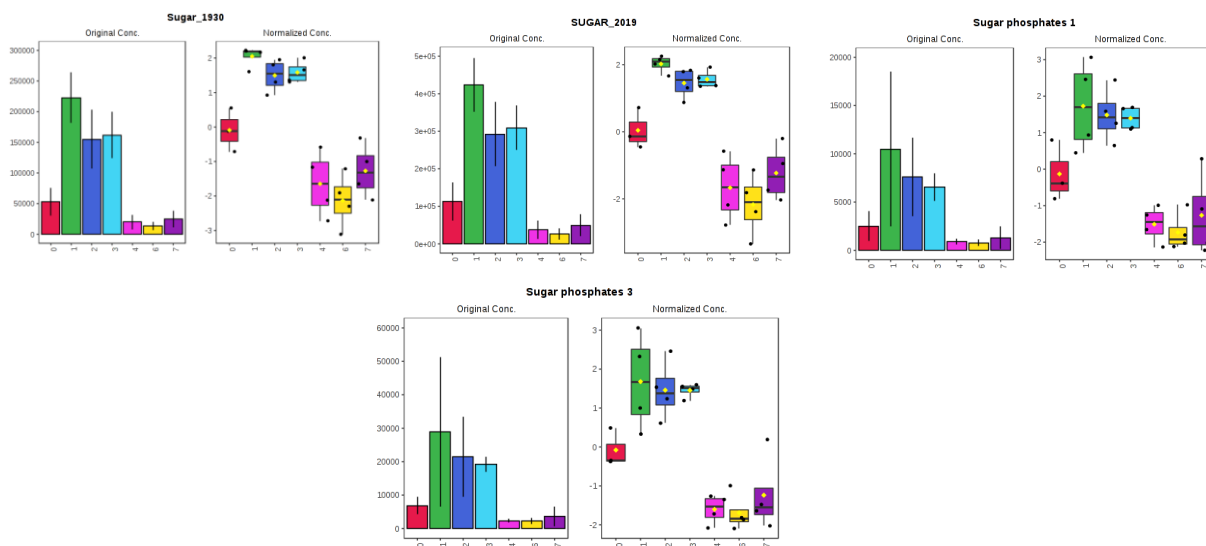


5°C10°C

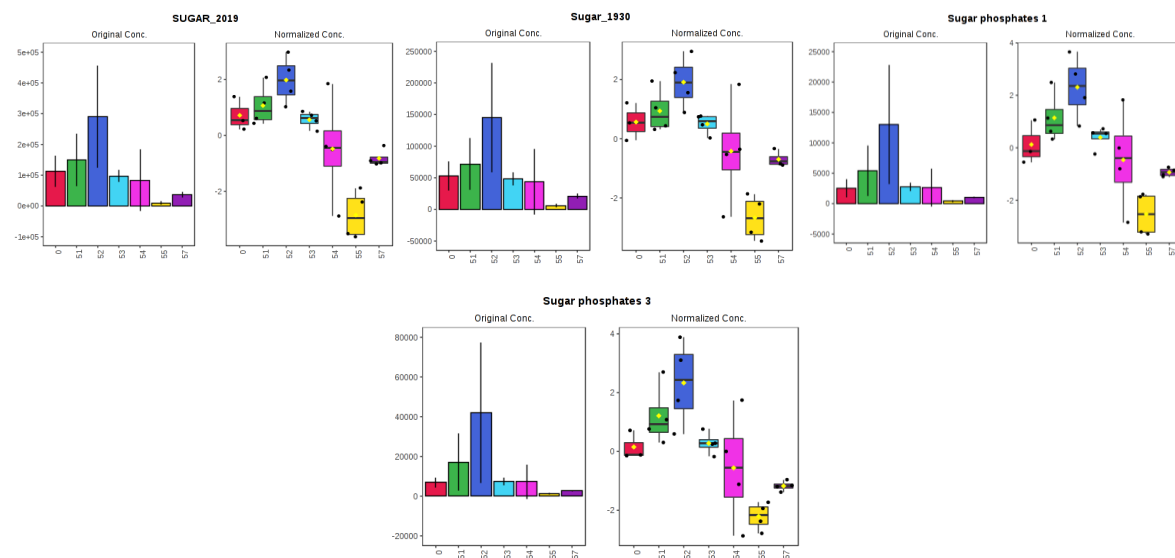


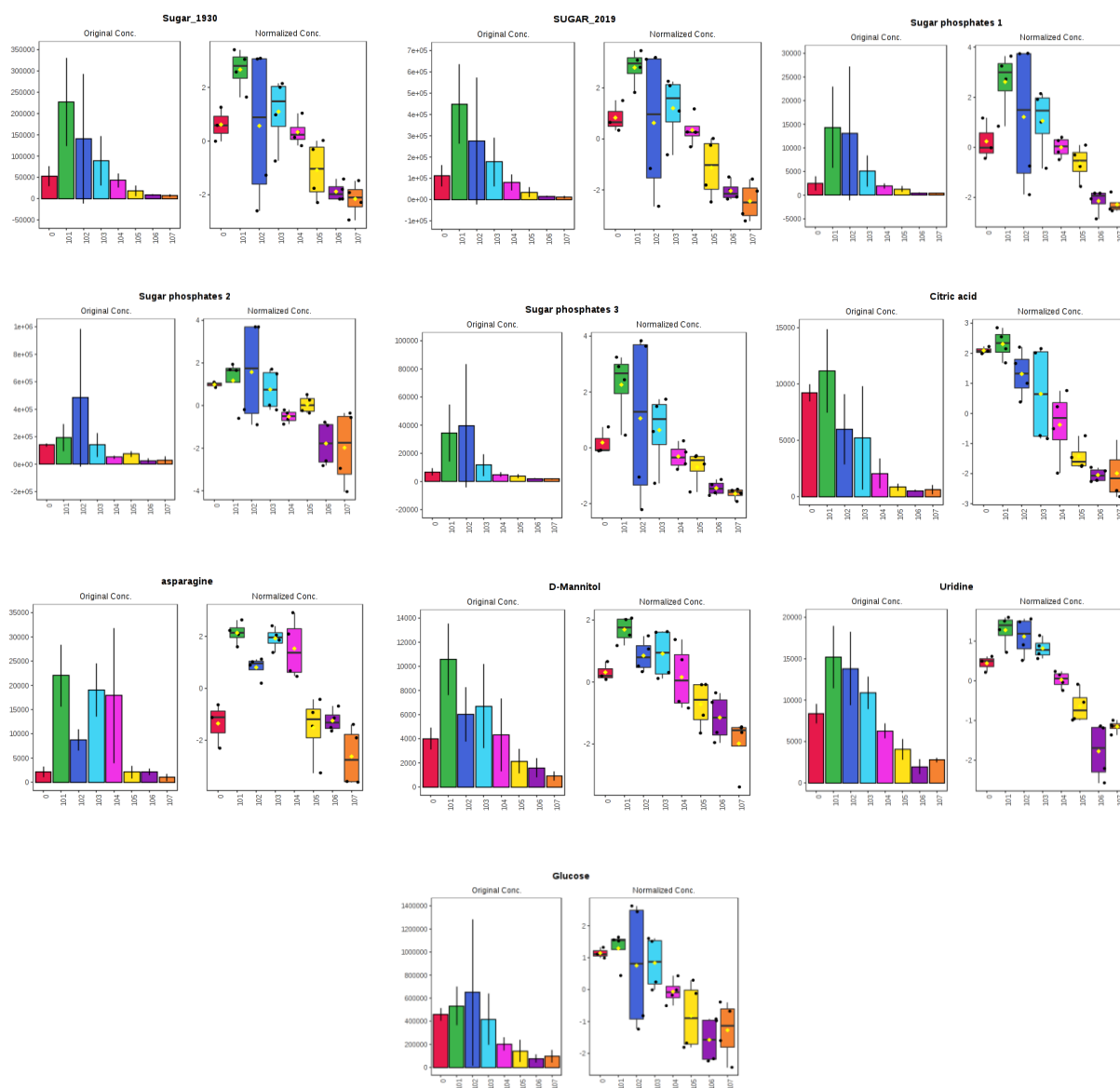
Π-6. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν μειούμενη τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του φιλέτου στήθους κοτόπουλου

0°C



5°C



10°C

15°C

