



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΠΜΣ: ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ (FOOD, NUTRITION & HEALTH)  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Παρακολούθηση της αλλοίωσης φιλέτου από μπούτι κοτόπουλου κατά την διάρκεια συντήρησης σε διάφορες θερμοκρασίες με χρήση μεταβολωμικής

**Βαΐα Β. Βούκατα**

Επιβλέπων Καθηγητής:  
Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Παρακολούθηση της αλλοίωσης φιλέτου από μπούτι κοτόπουλου κατά την διάρκεια συντήρησης σε διάφορες θερμοκρασίες με χρήση μεταβολομικής

Monitoring of chicken thigh fillet spoilage during storage at various temperatures using metabolomics.

**Βαΐα Β. Βούκατα**

Εξεταστική Επιτροπή:

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Χρυσσαυγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

## **Παρακολούθηση της αλλοίωσης φιλέτου από μπούτι κοτόπουλου κατά την διάρκεια συντήρησης σε διάφορες θερμοκρασίες με χρήση μεταβολωμικής**

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η εφαρμογή της μεταβολωμικής ως εργαλείο ελέγχου της ποιότητας σε μπούτι κοτόπουλο. Το αντικείμενο της μελέτης αποτέλεσε ο προσδιορισμός του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών σε μπούτι κοτόπουλου με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών κατά τη διάρκεια συντήρησής του σε διάφορες θερμοκρασίες στοχεύοντας στην εύρεση πιθανών χημικών δεικτών αλλοίωσης-φρεσκότητας και τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τον μηχανισμό αλλοίωσης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μπούτι κοτόπουλο τα οποία είχαν διατηρηθεί σε 3 θερμοκρασίες (0°C, 5°C, 10°C). Έπειτα ακολούθησε η προπαρασκευή των δειγμάτων για την απομόνωση του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών με εκχύλιση σύμφωνα με παραλλαγή της μεθόδου Bligh – Dyer, ακολούθησε λυοφιλίωση, παραγωγοποίηση (μεθοξυαμίνωση και σιλυλίωση) και προσδιορισμός των παραγώγων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC/MS). Ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με διάφορες μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης με τη χρήση της ηλεκτρονικής πλατφόρμας MetaboloAnalyst 4.0. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων (ANOVA, PCA, PLS-DA, HCA) ανιχνεύθηκαν 23 μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες όπως αμίνες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα, βιταμίνες και άλλες ενώσεις και οι οποίες ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες ανάλογα αν η συγκέντρωσή τους παρουσίαζε αυξητική ή φθίνουσα τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του μπουτιού κοτόπουλου. Καταλήγοντας οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες αλλοίωσης ή φρεσκότητας.

**Επιστημονική περιοχή:** Χημεία τροφίμων

**Λέξεις κλειδιά:** Μεταβολωμική ανάλυση, μπούτι κοτόπουλο, μεταβολίτες, αλλοίωση, φρεσκότητα

## **Monitoring of chicken thigh fillet spoilage during storage at various temperatures using metabolomics**

Department of Food Science & Human Nutrition

### **ABSTRACT**

In the present study, the application of GC-MS metabolomics as a quality control tool in chicken thigh was examined. The object of the study was to determine the polar fraction of metabolites in chicken thigh with gas chromatography-mass spectrometry during storage at various temperatures with the aim of finding possible chemical indicators of spoilage-freshness and collecting information about the mechanism of spoilage. For this purpose, experiments were performed on chicken thigh which were maintained at 3 temperatures (0, 5, 10°C). Sample preparation was followed for the isolation of the polar metabolites by extraction according to a modified Bligh-Dyer method, followed by lyophilization, derivatization (methoxyamination and silylation) and determination of the derivatives by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The data were then processed by various multivariate analysis methods using the electronic platform MetaboloAnalyst 4.0. According to the results of the statistical analyses (ANOVA, PCA, PLS-DA, HCA) 23 metabolites were detected which belong to different categories such as amines, organic acids, sugars, amino acids, vitamins and other compounds and which were classified into two categories depending on whether their concentration showed an increasing or decreasing trend during the maintenance of the chicken thigh. In conclusion, these metabolites could be characterized as biomarkers of spoilage or freshness.

**Scientific area:** Food Chemistry

**Key words:** Metabolomics, chicken thigh, metabolites, spoilage, freshness

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη και ανάθεση του Επ. Καθηγητή κ. Μαλλούχο Αθανάσιου . Το θέμα της παρούσας εργασίας αποτελεί η αξιολόγηση της μεταβολωμικής ως εργαλείο ελέγχου της ποιότητας του μπουτιού κοτόπουλου κατά τη συντήρησή του σε διάφορες θερμοκρασίες.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαλλούχο Αθανάσιο για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε κατά το χρονικό διάστημα της διεξαγωγής της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επ. Καθηγήτρια κ. Γαρδέλη Χρυσανγή και την κ. Παπαντώνη Άρτεμις, για τη στήριξη , συνεργασία και βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτορα Αναστασία Λύτου για την παροχή των δειγμάτων για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης, την υποψήφια διδάκτορα Μικρού Θεανώ και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γ.Π.Α για τη συνεργασία και καλή διάθεση για βοήθεια σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης. \

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου για τη συνεργασία του στην παρούσα μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου και τον αδερφό μου οι οποίοι με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Πίνακας περιεχομένων

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	8
1.1.1 Παραγωγή Πουλερικών.....	8
1.1.2 Παραγωγή πουλερικών στην Ελλάδα .....	9
1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ .....	11
1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ .....	12
1.3.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί – Μικροβιακή αλλοίωση .....	13
1.3.2 Χημική αλλοίωση.....	16
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΦΡΕΣΚΟΤΗΤΑΣ .....	18
1.4.1 Νουκλεοτίδια και Νουκλεοζίτες .....	20
1.4.2 Δείκτης K .....	21
1.4.3 Βιογενείς Αμίνες .....	21
1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ.....	23
1.5.1 Γενική εισαγωγή.....	23
1.5.2 Αναλυτικές τεχνικές στη μεταβολωμική μελέτη.....	25
1.5.3 Χημειομετρία .....	30
1.5.4 Η εφαρμογή της μεταβολωμικής στα τρόφιμα.....	31
1.5.5 Η συνεισφορά της μεταβολωμικής στη μελέτη των πουλερικών .....	34
1.6 Σκοπός της μελέτης .....	36
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	37
2.2 ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	37
2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ GC/MS.....	38
2.3.1 Προπαρασκευή Δειγμάτων – Πειραματική Πορεία.....	39
2.3.2 Πορεία Εκχύλισης .....	39
2.3.3 Ενοποιημένο Δείγμα Έλεγχου (Qc-Pooled Sample) .....	41
2.3.4 Παραγωγοποίηση (Derivatization).....	41
2.3.5 Προετοιμασία Εξωτερικών Προτύπων Αναφοράς.....	42
2.3.6 Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών.....	43
2.3.7 Στατιστική επεξεργασία .....	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	45
3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΠΡΟ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	45
3.2 ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΣΕΙΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ .	46
3.2.1 Μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 0 °C .....	46
3.2.2 Μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 5 °C .....	51

3.2.3 Μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 10 °C .....	56
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία .....	64
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	74
Διαδίκτυο .....	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	76
Π-1. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του μπουτιού κοτόπουλου.....	76
Π.2. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν μειωμένη τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του μπουτιού κοτόπουλου.....	80

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η κατανάλωση κοτόπουλου συγκαταλέγεται μεταξύ των τροφίμων ζωικής προέλευσης που καταναλώνεται ευρύτερα σε παγκόσμιο επίπεδο. Η κατανάλωση πουλερικών και ζωικής προέλευσης τροφίμων συνεχίζει να αυξάνεται (Eurostat, 2015), κυρίως λόγω της χαμηλότερης τιμής του, της ευκολίας μαγειρέματος και της επιθυμητής θρεπτικής αξίας. Το κοτόπουλο κυριαρχεί στην κατανάλωση κρέατος καθώς είναι ένα προϊόν γενικά προσιτό και χαμηλό σε λιπαρά. Το κρέας και τα αυγά πουλερικών συμβάλλουν στην ανθρώπινη διατροφή παρέχοντας υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες και χαμηλά επίπεδα λίπους, με ένα επιθυμητό προφίλ λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με το National Council Chicken στα 100 γραμμάρια ωμό μπούτι κοτόπουλο, περιέχονται 17,3 γραμμάρια πρωτεΐνης , 15,3 γραμμάρια λίπους εκ των οποίων τα 4,3 γραμμάρια είναι κορεσμένα και 9,6 είναι ακόρεστα. Το κοτόπουλο αποτελεί βασική πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, οι οποίες περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα στην αναλογία που τα χρειάζεται ο οργανισμός μας. Τα απαραίτητα αμινοξέα είναι αυτά τα οποία δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός και πρέπει να τα πάρει από τη διατροφή. Παρέχει επίσης βιταμίνες, σίδηρο, μαγνήσιο και ψευδάργυρο , ενώ σε σύγκριση με το κόκκινο κρέας περιέχει μικρότερα ποσότητα κορεσμένων λιπαρών οξέων. Τα αυγά αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεΐνης υψηλής βιολογικής αξίας. Επιπλέον, περιέχουν βιταμίνες (A, D, B12, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη) Οι κάτοικοι των πόλεων καταναλώνουν τα πουλερικά που εκτρέφονται σε εντατικά συστήματα, είτε τοπικά παραγόμενα είτε εισαγόμενα. Ωστόσο, υπάρχουν εξειδικευμένες αγορές για αυτόχθονα πουλερικά και προϊόντα πουλερικών. Στις αγροτικές περιοχές των αναπτυσσόμενων χωρών, τα περισσότερα νοικοκυριά καταναλώνουν κρέας και αυγά από δικά τους, συνήθως μικρά κοπάδια ιθαγενών κοτόπουλων (FAO) και άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως χολίνη (Εθνικός Διατροφικός Οδηγός για Ενήλικες).

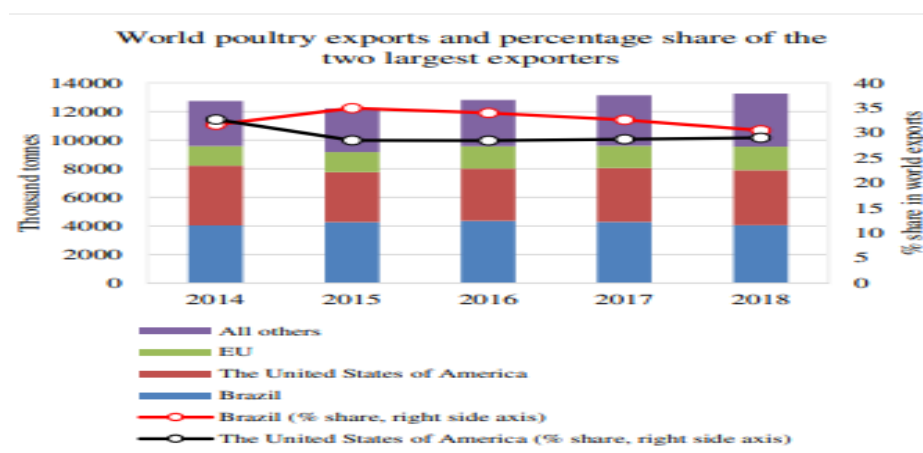
#### 1.1.1 Παραγωγή Πουλερικών

Ο αυξανόμενος πληθυσμός, η μεγαλύτερη αγοραστική δύναμη και η αστικοποίηση αποτελούν ισχυρούς μοχλούς ανάπτυξης. Αποτέλεσμα αυτής της ανάπτυξης είναι η συνεχής ανάπτυξη και εκβιομηχάνιση της παραγωγής πουλερικών. Τα παραδοσιακά συστήματα πουλερικών μικρής κλίμακας, αγροτικής και οικογενειακής οικογένειας συνεχίζουν να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση των μέσων διαβίωσης στις αναπτυσσόμενες χώρες, στην προμήθεια προϊόντων πουλερικών σε αγροτικές περιοχές και στην δημιουργία θέσεων εργασίας.

Η ΕΕ είναι από τους μεγαλύτερους παραγωγούς κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής σε παγκόσμιο επίπεδο (11,3 % της παγκόσμιας παραγωγής) με συνολική παραγωγή κρέατος 14,1 εκατ. τόνους το 2014. Σύμφωνα με τη μελέτη του 2017, η Βραζιλία, οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και η Κίνα, καθεμιά ξεχωριστά, έχουν μεγαλύτερη παραγωγή. Τα τρία τέταρτα της παραγωγής της ΕΕ προέρχονται από τα ακόλουθα επτά κράτη μέλη: Πολωνία, Ηνωμένο Βασίλειο, Γερμανία, Γαλλία, Ισπανία, Ιταλία και Κάτω Χώρες, κράτη στα οποία βρίσκονται επίσης και οι μεγαλύτερες εκμεταλλεύσεις.



Στη μελέτη του 2017 αναφέρεται ότι η παραγωγή κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής στην ΕΕ αυξήθηκε κατά 18,6 % από το 2009 έως το 2014 και σήμερα ανέρχεται σε 6,5 δισεκατομμύρια πτηνά ετησίως. Η παραγωγή και η κατανάλωση αυξάνονται σταθερά και το κοτόπουλο είναι το δεύτερο σε κατανάλωση, μετά το χοιρινό, κρέας στην ΕΕ. Η παραγωγή κρέατος πουλερικών στην ΕΕ αναμένεται να αυξηθεί κατά 3,8 % και η κατανάλωση κατά 3,4 % στη διάρκεια της περιόδου 2015-2025. Η ΕΕ είναι κατά 103,9 % αυτάρκης σε κρέας πουλερικών, ενώ οι εξαγωγές αντιστοιχούν στο 11 % της παραγωγής και οι εισαγωγές ισοδυναμούν με 6 %. Οι εισαγωγές, κυρίως υψηλότερης αξίας τεμαχίων κοτόπουλου από τη Βραζιλία και την Ταϊλάνδη, προορίζονται κατά πρώτο λόγο για τη Γαλλία, τη Γερμανία, τις Κάτω Χώρες και το Ηνωμένο Βασίλειο (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2018).



Σχήμα 1.1 Παγκόσμια παραγωγή κοτόπουλο από το 2014 – 2018 (FAO)

### 1.1.2 Παραγωγή πουλερικών στην Ελλάδα

Η ελληνική βιομηχανία πουλερικών είναι ένας από τους πυλώνες της γεωργίας στην Ελλάδα και κατέχει ένα μεγάλο μερίδιο της ζωικής παραγωγής. Κατά την περίοδο 1960-1980, η συνολική παραγωγή κρέατος πουλερικών αυξήθηκε πέντε φορές, ενώ τα τελευταία 30 χρόνια τα στοιχεία παραγωγής παραμένουν σταθερά με μεταβολές της τάξης του 5-10% (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2009). Την τελευταία δεκαετία, η παραγωγή αυγών ήταν σταθερή (αυγά για ανθρώπινη παραγωγή και αυγά επώασης). Η βιομηχανία πουλερικών απασχολεί μεγάλο αριθμό εργαζομένων που απασχολούνται σε όλα τα στάδια παραγωγής κρέατος και αυγών πουλερικών. Ταυτόχρονα, ένας σημαντικός αριθμός ελεύθερων επαγγελματιών συνδέει τη δραστηριότητά τους άμεσα ή έμμεσα με τη βιομηχανία πουλερικών, αυξάνοντας σημαντικά τον συνολικό αριθμό των εργαζομένων που συμμετέχουν στον κλάδο.

Η βιομηχανία πουλερικών βρίσκεται κυρίως στις περιοχές της Ηπείρου (Ιωάννινα και Άρτα), Εύβοια - Βοιωτία - Αττική και Μακεδονία. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία

(MRDF) που καταγράφηκαν μέχρι τα τέλη του 2009, το 66,2% των συνολικών εκμεταλλεύσεων κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής και το 45% των εκμεταλλεύσεων κρεατοπαραγωγής έχουν εντοπιστεί στα Ιωάννινα, ενώ το 50% των εκμεταλλεύσεων στρώματος έχουν εντοπιστεί στην Αττική. Ο συνολικός αριθμός κτηνοτρόφων, στρωμάτων και αγροκτημάτων κοτόπουλου στην Ελλάδα είναι 89, 355 και 1042 αντίστοιχα. Οι 89 κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις είχαν, μέχρι το τέλος του 2009, 358 σμήνη ορνίθων, εκ των οποίων 303/358 (84,6%) αποτελούνταν από κτηνοτρόφους, τα 38/358 (10,6%) ήταν κοπάδια μικτής παραγωγής και 17/358 (4,7%) ήταν σμήνη αναπαραγωγών στρώματος. Οι εκμεταλλεύσεις 355 επιπέδων είχαν συνολικά 652 σμήνη με συνολικά 8.369.800 πτηνά και οι κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις είχαν συνολικά 7.384 σμήνη με συνολικά 97.503.078 πουλιά κράτησαν το τέλος του 2009. Τέλος, στην Ελλάδα υπάρχουν 26 εκκολαπτήρια, εκ των οποίων 20 βρίσκονται σε περιοχές Ηπείρου, Εύβοιας - Βοιωτίας - Αττικής και Μακεδονίας.

Η βιομηχανία πουλερικών είναι το πιο οργανωμένο και πλήρως ενσωματωμένο τμήμα του ζωικού τομέα στην Ελλάδα με καλές προοπτικές ανάπτυξης και περαιτέρω ανάπτυξης. Οι επενδύσεις από τη βιομηχανία σε όλα τα στάδια της παραγωγής (μύλοι ζωοτροφών, πτηνοτροφεία, εκκολαπτήρια, σφαγεία) είναι συνεχείς, με στόχο την πλήρη συμμόρφωση με τη νομοθεσία της ΕΕ. Σύμφωνα με στοιχεία της Ένωσης Μεταποιητών Πουλερικών και Εμπορίου Πουλερικών στις χώρες της ΕΕ (Avec, 2011) κατά τη δεκαετία 2010-2020, η Ευρωπαϊκή Ένωση προβλέπει αύξηση των προϊόντων παραγωγής πουλερικών κατά 7%, για να εξισορροπήσει τις εισαγωγές και τις εξαγωγές κρέατος και αύξηση της εξαγωγής ζώντων ζώων χωρίς σχεδόν καθόλου εισαγωγές. Η ίδια έκθεση προβλέπει αύξηση 1,5 kg, έως 24,72 kg, στη μέση κατανάλωση κρέατος πουλερικών κατά κεφαλή.

Στην Ελλάδα, η μέση κατανάλωση κρέατος πουλερικών κατά κεφαλή είναι 20,7 κιλά, γεγονός που αφήνει περιθώρια για περαιτέρω ανάπτυξη σε σύγκριση με την κατά κεφαλή κατανάλωση στην ΕΕ. Η αυτάρκεια της ελληνικής βιομηχανίας πουλερικών είναι περίπου 75-80% (Watt, 2011) και επομένως επενδύει σημαντικά τα τελευταία χρόνια για τη βελτίωση της παραγωγής, τη μείωση του κόστους, τη βελτίωση των δεικτών παραγωγής και τη δημιουργία νέων, καινοτόμων και πλήρως συμβατών προϊόντων με ευρωπαϊκά νομοθεσία. Η βιομηχανία μπορεί να παράγει τις περισσότερες από τις ανάγκες της, αλλά και να μην έχει σημαντικές εισαγωγές (περίπου 20-25%) από την Ιταλία, τις Κάτω Χώρες και τη Βουλγαρία, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, αλλά χαμηλότερες εξαγωγές κυρίως στη Βουλγαρία. Τα τελευταία πέντε χρόνια, υπήρξε σταθερότητα στην παραγωγή κρέατος πουλερικών, συμπεριλαμβανομένης της γαλοπούλας και του κρέατος πάπιας. Ο όγκος παρέμεινε σταθερός στους 160.000 τόνους, με πολύ σημαντική μείωση των εισαγωγών για το 2008 και μικρή αύξηση των εξαγωγών τα τελευταία τρία χρόνια. Αυτό το γεγονός συμπίπτει με την κρίση της γρίπης των πτηνών που επηρέασε πολύ σοβαρά την επιχείρηση πουλερικών. Παρά την κρίση που επηρέασε την οικονομία της χώρας, οι προοπτικές παραγωγής και κατανάλωσης κρέατος και αυγών πουλερικών να παραμείνουν σταθερές, ενισχύεται από: α) την πεποίθηση των Ελλήνων καταναλωτών για ποιοτικό λευκό κρέας σε σύγκριση με το κόκκινο κρέας, β) προσιτές τιμές και γ) η αυξανόμενη ζήτηση για έτοιμα για μαγειρεμένα γεύματα με κρέας πουλερικών.

## 2. Gross domestic production of poultry meat in EU ('000 tons carcass weight)

	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Austria	121	122	122	129	133	134
Belgium / Luxembourg	389	433	453	461	463	470
Bulgaria	98	102	106	109	107	108
Croatia	68	68	83	81	80	82
Cyprus	22	22	24	20	25	25
Czech Republic	171	175	175	177	183	194
Denmark	168	173	147	156	156	157
Estonia	18	19	20	20	20	21
Finland	111	113	116	121	130	139
France	1.842	1.827	1.828	1.830	1.857	1.863
Germany	1.714	1.775	1.807	1.817	1.802	1.818
Greece	180	190	175	158	153	155
Hungary	515	543	577	620	602	644
Ireland	129	129	125	132	152	160
Italy	1.259	1.261	1.321	1.388	1.354	1.325
Latvia	26	29	30	30	33	35
Lithuania	93	100	111	112	118	120
Malta	4	4	4	4	4	4
Netherlands	848	941	1.057	1.097	1.118	1.119
Poland	1.798	2.022	2.161	2.425	2.511	2.630
Portugal	324	327	336	343	337	341
Romania	360	397	411	419	392	392
Slovakia	64	59	58	66	71	72
Slovenia	57	60	59	67	68	66
Spain	1.299	1.390	1.453	1.526	1.454	1.538
Sweden	128	137	145	156	157	155
United Kingdom	1.606	1.587	1.663	1.739	1.812	1.884
<b>EU</b>	<b>13.407</b>	<b>14.004</b>	<b>14.565</b>	<b>15.201</b>	<b>15.357</b>	<b>15.776</b>

**Note:** Partial provisional or estimated. For EU countries some significant differences between national and Eurostat data. Rows partly revised, as Eurostat does not continue supply balances. Now, the data are based more on other sources and own calculations.  
**Sources:** MEG according to EU Commission, national data, FAO and Eurostat

**Σχήμα 1.2** Παραγωγή πουλερικών (σε τόνους) στην Ελλάδα από το 2013-2018 (Πηγή στατιστικών δεδομένων, Aves)

## 1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ

Νωπό κρέας πουλερικών νοείται το κρέας των πουλερικών το οποίο δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία συντήρησης εκτός από την ψύξη, την κατάψυξη, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που είναι συσκευασμένο σε κενό αέρος ή σε ελεγχόμενη θερμοκρασία (Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 853/2004). Η θρεπτική αξία του κοτόπουλου σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα σε εύκολα αφομοιώσιμη πρωτεΐνη, τη χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ύλες και τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), σε σύγκριση με εκείνη του βοείου κρέατος και του χοιρινού κρέατος (Brenes et al., 2010). Το ανθρώπινο σώμα χρειάζεται 20 διαφορετικά αμινοξέα, εννέα από τα οποία καλούνται απαραίτητα επειδή το σώμα δεν μπορεί να τα παράξει και πρέπει να τα λάβει με τη διατροφή. Απαραίτητα αμινοξέα για ενήλικες είναι η ιστιδίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη και βαλίνη. Επιπλέον, τα παιδιά χρειάζονται αργινίνη. Οι πρωτεΐνες τροφίμων που παρέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα οξέα στις αναλογίες που απαιτούνται από το

σώμα ονομάζονται πλήρεις. Ζωικά τρόφιμα θεωρούνται ότι έχουν υψηλές πρωτεϊνικές ιδιότητες, αν και οι ποιότητα τους δεν πάντα παρόμοια λόγω των διαφορών στα απαραίτητα αμινοξέα. Τα σημαντικότερα αμινοξέα των μυϊκών πρωτεϊνών στο κοτόπουλο είναι το ασπαρτικό οξύ, το γλουταμικό οξύ, η λευκίνη, η αργινίνη, η λυσίνη, η φαινυλαλανίνη, η βαλίνη, η θρεονίνη, η ιστιδίνη και η ισολευκίνη (Belitz et al., 2009). Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ που περιέχεται στους ιστούς των πουλερικών είναι το ελαϊκό οξύ (C18:1). Το παλμιτικό (C16:0), ελαϊκό (C18:1), και λινελαϊκό (C18:2n-6) οξύ αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το 68% των συνολικών λιπαρών οξέων στους ιστούς των πτηνών. Η περιεκτικότητα των λιπιδίων στους ιστούς του κοτόπουλου αυξάνεται με την ηλικία. Σύμφωνα με το (Belitz, 2009) το μπούτι κοτόπουλο χωρίς το δέρμα περιέχει 73,3% υγρασία, 20% πρωτεΐνη, 5,5% λίπος και 1,2% τέφρα.

Οι μυϊκές πρωτεΐνες στο κρέας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες :

A) Τις μυοϊνώδεις πρωτεΐνες (του μηχανισμού συστολής), διαλυτές σε πυκνά διαλύματα άλατος. Περίπου 20 διαφορετικές μυοϊνιδικές πρωτεΐνες είναι γνωστές. Η μυοσίνη, η ακτίνη και η τιτίνη κυριαρχούν ποσοτικά αντιπροσωπεύοντας το 65-70% της ολικής πρωτεΐνης. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες είναι οι τροπομυοσίνη και τροπονίνη, οι οποίες είναι σημαντικές για τη συστολή και διάφορες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σταθεροποίηση του σαρκομερίου.

B) Τις σαρκοπλασμικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι διαλυτές σε νερό ή σε αραιά διαλύματα άλατος. Οι διαλυτές πρωτεΐνες αποτελούν το 25-30% του συνόλου της πρωτεΐνης στον μυϊκό ιστό. Αποτελούνται από 50 περίπου συστατικά, κυρίως ένζυμα και μυογλοβίνη. Το υψηλό ιξώδες του σαρκοπλάσματος προέρχεται από υψηλή συγκέντρωση διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να ανέρχονται στο 20-30%. Τα γλυκολυτικά ένζυμα δεσμεύονται στις πρωτεΐνες μυοϊνών *in vivo*.

Γ) Τις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού, οι οποίες είναι κυρίως το κολλαγόνο και η ελαστίνη.

### 1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ

Η παραγωγή πουλερικών αποτελεί χαρακτηριστικό της ανθρώπινης κοινωνίας εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η ποιότητα του κοτόπουλου μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου με αποτέλεσμα την υποβάθμισή του. Οι μεταβολές που υφίσταται το κοτόπουλο κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση του είναι φυσικές, χημικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές. Τα πουλερικά, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας επιμόλυνσής τους, είναι πάντα φορείς μικροβίων, καθιστώντας τα προϊόντα όπως το κοτόπουλο και τα παράγωγα του ιδιαίτερα ευαλλοίωτα. Προκειμένου να αυξηθεί ο χρόνος ζωής του είναι αναγκαίο να ελέγχεται ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών καθώς και ο ρυθμός υποβάθμισης άλλων ποιοτικών χαρακτηριστικών του. Ο ρυθμός υποβάθμισης των πουλερικών, ως ευαλλοίωτα τρόφιμα, επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία αποθήκευσης. Αυτό καθιστά αναγκαία την αποτελεσματική παρακολούθηση της ψυκτικής του αλυσίδας σε όλα τα στάδια. Μετά τη

σφαγή, το κρέας κοτόπουλο θα πρέπει να ψυχθεί, ώστε να μειωθεί και να διατηρηθεί η θερμοκρασία κρέατος κάτω από τους 4<sup>ο</sup>C για να εξασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα και ασφάλεια του κοτόπουλου (James et al., 2006).

Η κατανάλωση και ο χειρισμός μολυσμένων πουλερικών και προϊόντων αυτών μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου, οδηγώντας σε τροφική δηλητηρίαση. Στις αλυσίδες παραγωγής, εμπορίας και μεταποίησης πουλερικών, το κρέας πουλερικών και τα αυγά μπορούν να μολυνθούν από μολυσματικούς παράγοντες που είναι επιβλαβείς στους ανθρώπους. Τα προϊόντα πουλερικών μπορούν επίσης να μολυνθούν με αντιμικροβιακά και αντιπαρασιτικά φάρμακα ή φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται σε αγροκτήματα, οδηγώντας στην ανάπτυξη ανθεκτικών μικροοργανισμών. Οι λοιμώξεις από *Campylobacter* και *Salmonella* είναι από τους σημαντικότερους κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων. Αυτά τα βακτήρια αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 90% όλων των αναφερόμενων περιπτώσεων τροφών που σχετίζονται με δηλητηριάσεις από βακτήρια παγκοσμίως. Οι λοιμώξεις από *Campylobacter* και *Salmonella* πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν μόνο ένα κλάσμα του πραγματικού αριθμού περιπτώσεων. Η κατανάλωση ακατέργαστων ή άψητων πουλερικών ή προϊόντων πουλερικών είναι πιθανός παράγοντας κινδύνου για ανθρώπινες περιπτώσεις λοίμωξης από γρίπη H5N1. Το κρέας πουλερικών πρέπει να είναι καλά ψημένο, με τη θερμοκρασία του πυρήνα να φτάνει τους 70<sup>ο</sup>C για τουλάχιστον ένα δευτερόλεπτο κατά το μαγείρεμα (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

### 1.3.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί – Μικροβιακή αλλοίωση

Το φρέσκο κοτόπουλο αποτελεί εστία ανάπτυξης αλλοιογόνου μικροχλωρίδας όπως φάσμα βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων, ενώ το δέρμα του κρέατος παρέχει άριστες συνθήκες για την ανάπτυξη τους. Ο ρυθμός αλλοίωσης του κρέατος εξαρτάται από τους παρόντες μικροοργανισμούς και τις συνθήκες ανάπτυξής τους όπως πηγές θρεπτικών συστατικών, θερμοκρασία, pH, σύνθεση της ατμόσφαιρας, ενεργότητα νερού (ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods, 2005). Οι σημαντικότεροι από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν τα πουλερικά και τα προϊόντα αυτών είναι τα βακτήρια σαλμονέλλα (*Salmonella spp.*), καμπυλοβακτηρίδιο (*Campylobacter*), ο σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*), η σιγκέλλα (*Shigella spp.*), ο βάκιλλος (*Bacillus cereus*), το κλοστρίδιο (*Clostridium perfringens*) και η λιστέρια (*Listeria monocytogenes*) σε μικρότερο βαθμό (Mataragas et al., 2007). Το βακτηριακό είδος *Salmonella enterica* είναι μεταξύ των πιο μελετημένων ανθρώπινων παθογόνων με τον ορότυπο Enteritidis να είναι ο κύριος συνδεδεμένος ορότυπος με κρούσματα σε κρέας πουλερικών (Jackson et al., 2013). Η σαλμονέλλωση γνωστή και ως ζωνοσογόνος νόσος στον άνθρωπο έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, ωστόσο η σαλμονέλλα συνεχίζει να είναι η συχνότερα αναφερόμενη αιτία προσβολής (26,6%), ακολουθούμενη από βακτηριακές τοξίνες (12,9%) και το καμπυλοβακτηρίδιο *Campylobacter* (10,6%). Παρόλο που το *Campylobacter* είναι η πιο συχνά αναφερόμενη αιτία ζωνοσογόνων νόσος συνολικά, αναφέρεται λιγότερο

συχνά ως αιτία τροφιμογενών εστιών (EFSA, 2012). Η ανάπτυξη βακτηρίων αλλοίωσης οδηγεί σε υποβάθμιση της ποιότητας του κρέατος κοτόπουλου και συγκεκριμένα σε ανεπιθύμητη γεύση, χρώμα, οσμή, υφή ή όψη.

Τα πιο συνήθη βακτήρια που υπάρχουν στα πουλερικά είναι τα Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, Pseudomonas, Campylobacter, Arcobacter, Staphylococcus, Enterococcus και γαλακτικά βακτήρια. Στελέχη αυτών των βακτηρίων παράγουν κατά το μεταβολισμό τους βιογενείς αμίνες. Οι αμίνες αυτές αποτελούν δείκτη αλλοίωσης του κρέατος. Η παρουσία τους στο κρέας εξαρτάται από την παραγωγή αποκαρβοξυλάσης από τους μικροοργανισμούς. Επίσης, εξαρτάται από ενδογενείς και εξωγενείς παραμέτρους όπως θερμοκρασία και pH του περιβάλλοντος, αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, διαθεσιμότητα πηγών άνθρακα, αυξητικών παραγόντων, φάση ανάπτυξης των κυττάρων κ.λ.π. (Bunkova et al., 2010).

### **Μικροβιακή αλλοίωση**

Η μικροβιακή αλλοίωση προκύπτει ως συνέπεια της ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας των βακτηρίων αλλοίωσης. Η μικροβιακή αλλοίωση είναι ο σημαντικότερος παράγοντας επειδή επηρεάζει την ασφάλεια του προϊόντος. Η αλλοίωση του κρέατος οφείλεται κυρίως στη μικροβιακή χλωρίδα παρά στη δράση των ενζύμων (Tsigarida et al., 2001). Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι μύκητες, ζύμες και βακτήρια, με τα βακτήρια να είναι τα πιο σημαντικά από άποψη υγείας και ασφάλειας. Η μικροβιακή ανάπτυξη επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, την ενεργότητα του νερού, το pH και τη συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών (Q.T.Pham, 2014). Κατά την απόψυξη του κρέατος, οι συνθήκες για μικροβιακή ανάπτυξη είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές (υψηλή ενεργότητα νερού λόγω λιωμένου πάγου και / ή συμπύκνωσης νερού στην επιφάνεια, σχεδόν ουδέτερο pH, υψηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών) και είναι σημαντικό να ελέγχεται η ανάπτυξη περιορίζοντας την αύξηση της θερμοκρασίας (Q.T.Pham, 2014). Κατά τη μικροβιακή αλλοίωση παρατηρείται επίσης, αλλαγή στο pH, την οσμή και το μικροβιακό επίπεδο.

Χαρακτηριστικό των αλλοιωμένων πουλερικών, είναι η ήπια μυρωδιά, η οποία οφείλεται στην παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων, γαλακτικού οξέος και πτητικών οξέων τα οποία συμβάλλουν στην οσμή και τη γεύση (Κοτζεκίδου & Ρουκά, 1993). Έχει βρεθεί ότι όταν τα προϊόντα αυτά αλλοιώνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί αλλοίωσης ανήκουν στο γένος των Pseudomonas. Σε μια έρευνα στην οποία εξετάστηκαν 5.920 σφάγια κοτόπουλου, οι Pseudomonas αποτελούσαν το 30,5 %, τα Acinetobacter το 22,7 %, τα Flavobacterium το 13,9 %, τα Corynebacterium το 12,7 %, ενώ οι ζύμες και τα Enterobacteriaceae κατείχαν χαμηλότερα ποσοστά (Lahellec et al., 1975). Οι ζύμες/μύκητες έχουν πολύ μικρότερη σημασία για την αλλοίωση των πουλερικών, εκτός από την περίπτωση που χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά για να μειώσουν την μικροβιακή ανάπτυξη. Τα γένη Candida, Rhodotorula και Torula είναι από τις σημαντικότερες ζύμες που απαντούν στα πουλερικά (Jay, 1986). Επιπλέον, από διάφορους

μελετητές έχει αναφερθεί ότι η χλωρίδα αλλοίωσης του κοτόπουλου περιορίζεται στην επιφάνεια και το δέρμα και αυξάνεται με τον χειρισμό και την επεξεργασία.

Η επιφάνεια των φρέσκων πουλερικών, που είναι αποθηκευμένα σε περιβάλλον με υψηλή υγρασία, είναι ευαίσθητη στην ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων όπως είναι τα *Pseudomonas* spp. Έχει αποδειχθεί ότι το δέρμα των πουλερικών ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη των αερόβιων βακτηρίων απ' ό τι ο μυϊκός ιστός (May et al., 1961). Σε προχωρημένο στάδιο αλλοίωσης των πουλερικών, οι επιφάνειες συνήθως φθορίζουν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία εξαιτίας του υψηλού πληθυσμού *Pseudomonas*.

Οι δυσάρεστες οσμές εμφανίζονται πριν την παραγωγή βλέννας και γίνονται αισθητές όταν ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ανά  $\text{cm}^2$  επιφάνειας του κοτόπουλου φτάσει τους 7,2-8,0 log CFU/ g. Η βλέννα εμφανίζεται αμέσως μετά τη δημιουργία των δυσάρεστων οσμών, όταν ο λογάριθμος του αριθμού των αποικιών ανά  $\text{cm}^2$  επιφάνειας είναι 8. Στην αρχή η ανάπτυξη των μικροοργανισμών περιορίζεται στην επιφάνεια των πουλερικών, ενώ ο ιστός κάτω από την επιδερμίδα παραμένει για ένα χρονικό διάστημα ελεύθερος βακτηρίων. Βαθμιαία όμως τα βακτήρια διεισδύουν στο εσωτερικό των ιστών, επιφέροντας μεγάλη ενυδάτωση των πρωτεϊνών του μυός (Κοτζεκίδου & Ρουκά, 1993).

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που παράγουν δυσάρεστες οσμές στα πουλερικά είναι οι Ψευδομονάδες, τα βακτήρια των γενών *Acinetobacter* και *Moraxella* και το είδος *Shewanella putrefaciens*. Το βακτήριο *S. putrefaciens* αναπτύσσεται καλά σε θερμοκρασία 5 °C και παράγει δυσάρεστες οσμές, εντός 7 ημερών, οι οποίες αποδίδονται στην παραγωγή  $\text{H}_2\text{S}$ , μεθυλομερκαπτάνης και διμεθυλοσουλφιδίου (Κοτζεκίδου & Ρουκά, 1993). Όταν η επιφάνεια των πουλερικών είναι πλούσια σε βακτήρια, έχει σαν αποτέλεσμα να προστατεύεται ο ιστός κάτω από το δέρμα και να παραμένει ελεύθερος βακτηρίων για μικρό χρονικό διάστημα. Σταδιακά όμως τα βακτήρια εισχωρούν βαθιά στους ιστούς και μολύνεται και το εσωτερικό (Jay, 1986)

Σύμφωνα με τον κανονισμό της ΕΕ 2073/2005 ο οποίος ορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα, σε νωπό κρέας κοτόπουλου είναι ικανοποιητική η δοκιμή αν υποδεικνύεται απουσία του βακτηρίου *Salmonella* σε 25g όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 1.1

1.28 Νωπό κρέας πουλερικών <sup>(20)</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> <sup>(21)</sup> <i>Salmonella enteritidis</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 657(για την ανίχνευση) Σύστημα White-Kaufmann – Le Minor (για τον προσδιορισμό ορότυπου)	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
--	--	---	---	-----------------	--	--

**Πίνακας 1.1:** Μικροβιολογικά κριτήρια για την *Salmonella* spp. σε νωπό κρέας κοτόπουλο σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005

Κατά τη μικροβιακή αλλοίωση έχει γίνει αναφορά άοσμων βιογενών αμινών όπως διμεθυλαμίνη και τριμεθυλαμίνη μέσω μικροβιακής ενζυματικής αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων

(Lázaro et al., 2015), επίσης ανιχνεύτηκαν και πτητικές αμίνες όπως η διμεθυλαμίνη και η τριμεθυλαμίνη (Byrne et al., 2002; Morsy et al., 2016).

Η μεταβολή του χρώματος κατά την αποθήκευση αποδίδεται συνήθως σε αύξηση του pH του κρέατος και των βιοχημικών αντιδράσεων μεταξύ οξυγόνου, πτητικών μικροβιακών καταβολιτών και χρωστικών κρέατος (Mancini et al., 2005; Suman et al., 2013). Ωστόσο, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι παρόλο που η αλλοίωση του κρέατος οφείλεται σχεδόν πάντα στη μικροβιακή ανάπτυξη, είναι υπεύθυνοι και άλλοι μηχανισμοί όπως η οξειδωση των λιπιδίων και η αυτόλυση (Iulietto et al., 2015). Θα μπορούσαν επίσης να υπάρξουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροβιακής ανάπτυξης και ενζυματικών αντιδράσεων (Nychas et al., 2008).

### 1.3.2 Χημική αλλοίωση

Οι μεταβολές τις οποίες υφίστανται τα πουλερικά κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσής τους είναι βιοχημικές (ένζυμα), χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές και οι οποίες σε συνδυασμό επιδρούν στην ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων (James et al., 2006).

Μετά το θάνατο του ζώου, παρατηρείται νεκρική ακαμψία, η οποία είναι μία από τις πιο σημαντικές φυσικοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στους σκελετικούς μύες κατά τη σχετικά κοντινή μεταθανάτια περίοδο και διαρκεί για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα και η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σκληρότητας του κρέατος. Το στάδιο της ακαμψίας συνήθως περιλαμβάνει δύο διακριτές φάσεις: μία φάση υστέρησης και μία ταχεία φάση. Αφότου η ακαμψία φτάσει στο μέγιστο, ο μύς υποβάλλεται σε μία μεγαλύτερη περίοδο λύσης (Li et al., 2010). 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). Η μεταθανάτια γλυκόλυση, η οποία προκαλείται από τα ένζυμα που βρίσκονται στο κρέας παύει μετά το θάνατο του ζώου, καθώς το pH από 7 φθάνει την τιμή 5,4-5,5 (Nychas et al. 1998). Το γαλακτικό οξύ που σχηματίζεται κατά τη γλυκόλυση παραμένει στο μυ μειώνοντας έτσι το pH από 6,5 σε λιγότερο από 5,8. Η έναρξη της νεκρικής ακαμψίας παρατηρείται στο κοτόπουλο μέσα σε 2-4 h (Belitz et al., 2009). Ενώ τα ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) και AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη) αποδομούνται ταχέως, η συγκέντρωση του IMP (μονοφωσφορική ινοσίνη) αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό και παραμένει υψηλή. Η συγκέντρωση της ινοσίνης, της ριβόζης και της υποξανθίνης αυξάνονται σταδιακά μετά τη σφαγή, όμως η αρχική αύξηση της φωσφορικής ριβόζης, δεν διατηρείται. Η μεγαλύτερη ποσότητα της ριβόζης η οποία είναι παρούσα στο κρέας του κοτόπουλου και η οποία θεωρείται σημαντική για το σχηματισμό του αρώματος και της γεύσης, παραμένει η μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP).. Υπάρχουν ενδείξεις ότι επιπρόσθετα μονοπάτια αποδόμησης της ριβόζης και της φωσφορικής ριβόζης μπορούν να μειώσουν τις συγκεντρώσεις αυτών των πρόδρομων ενώσεων (Aliani et al., 2013)



Μία άλλη αλλαγή που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της συντήρησης είναι η μεταβολή του λίπους. Το λίπος δεν παρουσιάζει την ίδια σύνθεση στους διάφορους ιστούς του σώματος των ζώων και έχει βρεθεί ότι στους ιστούς που παρουσιάζουν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα αποτελείται περισσότερο από ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι αποθηκευμένα για μελλοντικές ανάγκες του οργανισμού. Τα ακόρεστα λίπη οξειδώνονται ευκολότερα από τα κορεσμένα και μεταβολίζονται γρηγορότερα (Ραμαντάνης,1999). Ιδιαίτερος, το κρέας των πουλερικών είναι πολύ ευαίσθητο στην οξείδωση, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η οξείδωση έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια απαραίτητων λιπαρών οξέων, όπως λινελαϊκό και λινολενικό, απώλεια των λιποδιαλυτών βιταμινών και γενικότερα μείωση της θρεπτικής αξίας των λιπαρών ουσιών.. Ο μηχανισμός της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών. Επειδή τα λιπίδια περιέχουν πολλούς διπλούς δεσμούς, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια, είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στην αυτοοξείδωση, η οποία έχει ως επακόλουθο το σχηματισμό ενώσεων όπως αλδεΐδες (π.χ. μηλονική δι(αλδεΐδη)), κετόνες και άλλες ενώσεις, οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για την ανάπτυξη ανεπιθύμητων αρωμάτων και οσμών και αποτελεί την κυριότερη αιτία υποβάθμισης των τροφίμων (Cortinas et al., 2005).

Τα προϊόντα κρέατος κοτόπουλου διατίθενται είτε ως φρέσκα είτε ως προμαγειρευμένα προϊόντα, τα οποία συνήθως αποθηκεύονται υπό ψύξη. Η ζήτηση για υψηλής ποιότητας προμαγειρευμένα ή έτοιμα για κατανάλωση προϊόντα αυξάνεται και σχετίζεται κυρίως με το γρήγορο και εύκολο μαγείρεμα (Ferreira et al., 2017). Ωστόσο, η θερμική επεξεργασία θα μπορούσε να επιταχύνει την ανάπτυξη της οξείδωσης των λιπιδίων μέσω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών και άμβλυνσης του ενδογενούς αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος (Serpen et al., 2012) Η οξείδωση των λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη δυσάρεστης οσμής και γεύσης, τον αποχρωματισμό, την απώλεια θρεπτικών συστατικών και τη μείωση της διάρκειας αποθήκευσης και δημιουργεί ενώσεις που μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία (Min et al., 2005, Cao et al., 2018) .

Παράλληλα, η οξείδωση των λιπιδίων στο κρέας εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε φυσικά αντιοξειδωτικά. Το κρέας περιέχει έναν συνδυασμό εκκινητών, καταλυτών και ενδιάμεσων. Ο σίδηρος είναι πιθανώς ο κύριος καταλύτης για την έναρξη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων από τη δημιουργία ριζών υδροξυλίου . Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η θέρμανση προκαλεί αύξηση του σιδήρου χωρίς αίμη (non heme iron) και μείωση του σιδήρου αίμης, και η απελευθέρωση σιδήρου από πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο μπορεί να παίζει ρόλο στην οξείδωση των λιπιδίων (Kristensen et al., 2001) Το κρέας περιέχει επίσης έναν αριθμό ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών ενζύμων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών, που λειτουργούν ως χηλικοποιητές ιόντων μετάλλων ή καθαριστές ελεύθερων ριζών (Zou et al., 2019). Ωστόσο, η θέρμανση θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά αυτά τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα και οι πληροφορίες σχετικά με τη δραστηριότητα αυτών των αντιοξειδωτικών στο κρέας είναι πολύ περιορισμένες. Η καταλάση (CAT), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GSHPx) είναι από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα κατά της οξείδωσης των λιπιδίων. Οι (Muhlisin

et al. 2016) ανέφεραν ότι η δραστηριότητα CAT απενεργοποιήθηκε και η δραστηριότητα GSHPx και SOD μειώθηκε μετά το μαγείρεμα. Οι μέθοδοι μαγειρέματος καθώς και η κατάσταση μαγειρέματος όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία μαγειρέματος θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αλλαγές αυτών των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών και τελικά σε διαφορετικό βαθμό οξείδωσης των λιπιδίων (Domínguez et al., 2014). Όταν συγκρίθηκαν διαφορετικές μέθοδοι μαγειρέματος, το ψήσιμο, το οποίο χρησιμοποιεί υψηλές θερμοκρασίες, παράγει αυξημένη οξείδωση λιπιδίων σε σύγκριση με άλλες μεθόδους (Hernández et al., 1999).

Το κρέας κοτόπουλου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε οξειδωτική βλάβη λόγω του υψηλού βαθμού κορεσμού των λιπιδίων και υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας θέρμανσης στην οξείδωση των λιπιδίων και τους παράγοντες που συμβάλλουν στην οξείδωση.

Τα κύτταρα των μυών περιλαμβάνουν υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν επίσης να επηρεαστούν από οξειδωτικές αντιδράσεις. Η οξείδωση έχει φανεί να επιφέρει αλλαγές στις πρωτεΐνες, όπως τροποποίηση των αλυσίδων αμινοξέων, σχηματισμό πρωτεϊνικών πολυμερών, απώλεια διαλυτότητας, αύξηση των καρβονυλικών ομάδων, αλλαγή στη σύνθεση των αμινοξέων και αύξηση στην πρωτεολυτική ευαισθησία. Οι χημικές αλλαγές οι οποίες προκαλούνται κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, είναι υπεύθυνες για πολλές βιολογικές τροποποιήσεις, όπως η διαλυτότητα των πρωτεϊνών, ο πρωτεϊνικός κατακερματισμός και η συσσωμάτωση πρωτεϊνών. Οι ελεύθερες ρίζες, αντιδρούν με τις πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών προς σχηματισμό πρωτεϊνικών ελευθέρων ριζών, οι οποίες αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσουν υπεροξειδικές ρίζες. Έπειτα, τα πρωτεϊνικά υδροϋπεροξειδία διασπώνται σε καρβονυλικά παράγωγα. Ταυτόχρονα η οξείδωση των σουλφιδικών ομάδων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό πρωτεϊνικών δισουλφιδικών σταυροδεσμών ή στο σχηματισμό ανάμικτων δισουλφιδικών συζεύξεων με γλουταθιόνη, κυστεΐνη ή άλλες χαμηλού μοριακού βάρους μερκαπτάνες (Soyer et al., 2010)

Οι Soyer et al., 2010 , διαπίστωσαν ότι στο μπούτι κοτόπουλο, η μέση τιμή υπεροξειδίου (PV) αυξήθηκε από 1,66 μέχρι 2,52 meq peroxide/kg λίπους μετά από 2 μήνες αποθήκευσης και μειώθηκε στην τιμή 0,51 μετά από 6 μήνες αποθήκευσης. Η αύξηση ενδεχομένως να οφειλόταν στον ταχύτερο ρυθμό σχηματισμού υπεροξειδίων κατά τη διάρκεια των τριών πρώτων μηνών αποθήκευσης από ότι στη διάσπαση των υπεροξειδίων σε δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης.

#### **1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΦΡΕΣΚΟΤΗΤΑΣ**

Οι απαιτήσεις των καταναλωτών συνεχώς αυξάνονται τα τελευταία χρόνια για φρέσκα και ασφαλή προϊόντα διατροφής. Γι'αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την αξιολόγηση της φρεσκότητας των τροφίμων. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις i) μικροβιολογικές αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένων του

συνολικού αριθμού των βακτηρίων, του συγκεκριμένου αριθμού βακτηρίων και των τεχνικών ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ii) στις φυσικοχημικές αναλύσεις συμπεριλαμβανομένων των μετρήσεων του pH και της οξύτητας και iii) στις βιομιμητικές (biomimetic) μεθόδους ανίχνευσης που μιμούνται την ανθρώπινη αίσθηση, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης χρώματος και οσμής. (Cho, Kim et al., 2004; Shin et al., 2006).

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις όπως η μέτρηση του αριθμού των μικροοργανισμών και οι φυσικοχημικές μέθοδοι ανάλυσης είναι πολύπλοκες, απαιτούν υψηλό λειτουργικό κόστος και μπορεί να παράγουν ασυνεπή αποτελέσματα ανάλογα με την ικανότητα του χειριστή. Ενώ οι φυσικοχημικές αναλύσεις είναι απλούστερες και περιλαμβάνουν τη χρήση οργάνων και την εργασία ενός χειριστή ( Kaeun et al., 2019).

Ένας άλλος δείκτης φρεσκότητας είναι ένα σύστημα συσκευασίας που παρακολουθεί τους μεταβολίτες, όπως διοξείδιο του άνθρακα, οξυγόνο, πτητικές ενώσεις αζώτου αμμωνία, διμεθυλαμίνη, τριμεθυλαμίνη και υδρόθειο, (Kuswandi et al., 2011; Mills, 2005; Norwinyuwong et al., 2010; Smolander et al., 2002).

Παράλληλα, ως δείκτης φρεσκότητας χρησιμοποιείται και ένας δείκτης χρωματομετρικής συστοιχίας με οκτώ διαφορετικές βαφές. Οι τιμές απόχρωσης και έντασης μετρώνται και υπολογίζονται κατά μέσο όρο σε πολλαπλά σημεία ανίχνευσης της ίδιας αναλυόμενης ουσίας (Kaeun et al., 2019). Τέτοια μοτίβα αλλαγής χρώματος από τη συστοιχία χρωμάτων παρέχουν ένα δακτυλικό αποτύπωμα για το δεδομένο δείγμα, επιτρέποντας σχετικά εύκολη αναγνώριση μιας ευρείας ποικιλίας τροφίμων, βακτηρίων και περιβάλλοντος. Επιπλέον, οι αλλαγές χρώματος μιας χρωματομετρικής συστοιχίας μπορούν να παρακολουθούνται μέσω του μοντέλου χρώματος RGB (κόκκινο, πράσινο και μπλε) από τις ψηφιακές εικόνες μιας χρωματομετρικής πίνακας. Το χρωματικό μοντέλο RGB χρησιμοποιείται ευρέως στις διαδικασίες χρωματομετρικής ανίχνευσης λόγω της απλής επεξεργασίας δεδομένων του (Sun et al., 2015; Wells et al., 2019; Yusufu et al., 2018).

Η αισθητηριακή αξιολόγηση είναι η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται για να κριθεί η φρεσκότητα του κρέατος κοτόπουλου. Οι αξιολογητές πραγματοποιούν απλές παρατηρήσεις για να αξιολογήσουν τη φρεσκότητα του κρέατος με βάση το χρώμα, το ιξώδες, την ελαστικότητα, την οσμή και άλλους δείκτες. Αυτή η βασική μέθοδος είναι γρήγορη, απλή και δεν απαιτεί όργανα και εργαστηριακό εξοπλισμό. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν έχουν ακρίβεια και είναι υποκειμενικά. Απαιτούν έμπειρο και καλά εκπαιδευμένο προσωπικό που είναι ικανό για δοκιμές. Οι χημικοί δείκτες του κρέατος περιλαμβάνουν αμμωνία, αμίνες, ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N), τριμεθυλαμίνη (TMA) και ινδόλη. Επιπλέον, ορισμένοι επιβλαβείς μεταβολίτες, όπως τα συμπλέγματα H<sub>2</sub>S, μερκαπτάνης, , διμεθυλαμμωνίας, τριμεθυλαμμωνίας και τυροσίνης, χρησιμοποιούνται επίσης για τον προσδιορισμό της φρεσκότητας του κρέατος. Οι χημικές μέθοδοι ανίχνευσης έχουν βελτιώσει σημαντικά την ακρίβεια των μεθόδων αισθητηριακής αξιολόγησης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήριο για τη διάκριση φρεσκάδας. Αυτές οι μέθοδοι έχουν κάποια μειονεκτήματα επειδή είναι χρονοβόρα και απαιτούν

πολύπλοκη λειτουργία . Αν και ορισμένοι ερευνητές έχουν καταβάλει προσπάθειες για να βελτιώσουν την ταχύτητα και την ακρίβεια αυτών των πρωτοκόλλων δοκιμών, υπάρχει ακόμη ένα κενό μεταξύ των στόχων της γρήγορης ανίχνευσης και της απλής λειτουργίας. Ωστόσο, οι ηλεκτροχημικές προσεγγίσεις έχουν δείξει κάποια πλεονεκτήματα, όπως γρήγορη απόκριση, χαμηλό κόστος και ευαισθησία. Μέχρι σήμερα, οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί ευρέως για πολλές εφαρμογές, όπως περιβαλλοντική παρακολούθηση , ανάλυση φαρμάκων και αξιολόγηση της υγείας .

Οι ιστοί κρέατος περιέχουν μεγάλο αριθμό ηλεκτροχημικά ενεργών ενώσεων, όπως αλκοόλες, κετόνες και καρβοξυλικά οξέα. Πολλά από αυτά μπορούν να οξειδωθούν για να παρέχουν συγκεκριμένα ηλεκτροχημικά δακτυλικά αποτυπώματα. Ο τύπος και το περιεχόμενο αυτών των ενώσεων αλλάζουν κατά τη διαδικασία αποσύνθεσης του κρέατος. Μια ηλεκτροχημική μέθοδος δεν είναι ικανή για προσδιορισμό μιας ένωσης σε ένα πολύ περίπλοκο σύστημα, όπως ένα εκχύλισμα κρέατος. Ωστόσο, ολόκληρο το προφίλ ηλεκτροχημικής απόκρισης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της κατάστασης του κρέατος κατά τη διαδικασία αποσύνθεσης. Στη μελέτη των (Li Fu et al., 2019) προτάθηκε μια ηλεκτροχημική προσέγγιση για την αξιολόγηση της φρεσκάδας του κρέατος στήθους κοτόπουλου. Το γραφένιο εισήχθη κατά τη διαδικασία εκχύλισης δείγματος κρέατος για την ενίσχυση των σημάτων ηλεκτροχημικής απόκρισης. Παράλληλα, διερευνήθηκε η συνοχή των ηλεκτροχημικών προφίλ του κρέατος στήθους κοτόπουλου. Επίσης, παρακολούθηθηκαν τα ηλεκτροχημικά προφίλ του κρέατος στήθους κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποσύνθεσης και καθιερώθηκε μια κορυφαία μέθοδος αξιολόγησης με βάση την τρέχουσα ένδειξη για τη φρεσκότητα του κρέατος στήθους κοτόπουλου (Li Fu et al., 2019).

#### 1.4.1 Νουκλεοτίδια και Νουκλεοζίτες

Τα νουκλεοτίδια και οι νουκλεοζίτες έχουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της άμεσης συμμετοχής στο μεταβολισμό άλλων ουσιών μέσω διαφορετικών βιοχημικών διεργασιών. Οι αλλαγές στα αμινοξέα και άλλες ενώσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησης μπορούν να επηρεάσουν τη φρεσκότητα και τη γεύση του κρέατος (Ryu et al., 2009). Τα νουκλεοτίδια συμβάλλουν επίσης στη φρεσκότητα , ιδιαίτερα η 5-τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) (Dannert et al., 1967). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, το ATP στο κρέας μπορεί να αποδομηθεί από διάφορα ένζυμα σε μια σειρά σχετικών προϊόντων που υποβαθμίζουν τη γεύση και το χρώμα του κρέατος (Li et al., 2017).

Τα προϊόντα που σχετίζονται με το ATP περιλαμβάνουν τη 5-μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) και τους προδρόμους της ATP, 5-διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), καθώς και τα προϊόντα αποικοδόμησης ινοσίνη (HxR), υποξανθίνη (Hx), αδενοσίνη, ξανθίνη (Xt) και αδενίνη (Howgate, 2006, Ye et al., 2015). Το IMP είναι το κύριο συστατικό γεύσης στο κρέας και τα ψάρια. Ωστόσο, είναι ασταθές στους μύες και μπορεί να υποβαθμιστεί περαιτέρω σε H x R και Hx. Μεταξύ των

προϊόντων αποδόμησης του IMP, η ινοσίνη και το Hx έχουν πικρή γεύση και παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλαγές γεύσης του κρέατος κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Hong et al., 2017, Li et al., 2017, Qiu et al., 2015). Ως εκ τούτου, το IMP έχει γίνει ένας σημαντικός δείκτης για τη μέτρηση της φρεσκότητας του κρέατος (Lee et al., 2011, Masic et al., 2014)

#### 1.4.2 Δείκτης K

Συστήματα βιοαισθητήρων έχουν αναπτυχθεί για τη μέτρηση των δεικτών φρεσκότητας χρησιμοποιώντας τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδομητική οδό ATP. Ο δείκτης K ορίζεται ως ο λόγος του αθροίσματος των συγκεντρώσεων της υποξανθίνης και της ινοσίνης και της συνολικής συγκέντρωσης των σχετικών με ATP ενώσεων και θεωρείται δείκτης φρεσκότητας. Όπως έγινε αναφορά και παραπάνω, μετά το θάνατο του ζώου η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) αποδομείται και μετατρέπεται σε μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP). Η IMP αποδομείται περαιτέρω σε ινοσίνη (INO) και υποξανθίνη (Hx) με πιο αργούς ρυθμούς με την δράση ενδογενών ενζύμων. Παρ'όλα αυτά η αποδόμηση της ATP δεν αποτελεί αιτία απώλειας της φρεσκότητας (Bergann et al,1994).

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

#### 1.4.3 Βιογενείς Αμίνες

Οι βιογενείς αμίνες είναι αζωτούχες οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, με αλειφατικές (πουτρεσκίνη,καδαβερίνη,σπερμίνη,σπερμιδίνη), αρωματικές (τυραμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη) ή ετεροκυκλικές (ισταμίνη, τρυπταμίνη) δομές.

Εμφανίζονται σε φυτά, καθώς επίσης και σε ζώα και μικροοργανισμούς, όπου σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν ουσιαστικό ρόλο στις φυσικές μεταβολικές και φυσιολογικές λειτουργίες (Suzzi et al., 2015) και είναι κοινά ενεργά συστατικά, πρόδρομα για τη σύνθεση ορμονών, αλκαλοειδών, νουκλεοτιδίων, πρωτεϊνών και αρωματικών ενώσεων (ZhangYu-jia et al.,2019). Επίσης, βρίσκονται σε ψάρια, γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος και στη μύρα (Halász et al., 1994; Papageorgiou et al., 2018).

Γενικά, μπορούν να βρεθούν σε όλα τα τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες και / ή ελεύθερα αμινοξέα τα οποία προέρχονται από την αποκαρβοξυλίωση των ελεύθερων αμινοξέων από μικροοργανισμούς (Santos, 1996; Onal, 2007).


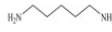
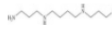

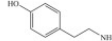
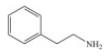
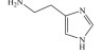
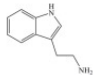
Η παραγωγή βιογενών αμινών σε ένα προϊόν διατροφής επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως, i) φυσικοχημικές παραμέτρους (π.χ. aw, pH), ii) συνθήκες αποθήκευσης και διανομής (π.χ. θερμοκρασία, χρόνος), iii) διαδικασίες και πρακτικές

παρασκευής (π.χ. ζύμωση, ωρίμανση ή μετά τη μόλυνση από μικροοργανισμούς), iv) παρουσία θετικών στην αποκαρβοξυλάση μικροοργανισμών, v )ποιότητα πρώτης ύλης και vi) διαθεσιμότητα ελεύθερων αμινοξέων (Linares et al., 2012).

Η παρουσία βιογενών αμινών στα τρόφιμα προκαλεί ανησυχία τόσο για την ποιότητα όσο και για την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς η μικροβιακή αλλοίωση της τροφής μπορεί να συνοδεύεται από την αυξημένη παραγωγή αποκαρβοξυλάσης. Η παρουσία βιογενών αμινών μπορεί να χρησιμεύσει ως χρήσιμος δείκτης αλλοίωσης των τροφίμων (Halász et al., 1994). Επιπλέον, είναι αποδεδειγμένο ότι η υπερβολική έκθεση ή / και η ανεπαρκής ικανότητα αποτοξίνωσης των βιογενών αμινών μπορεί να οδηγήσει σε οξεία τοξική επίδραση στο ανθρώπινο σώμα (Colombo et al., 2018)

Στα προϊόντα κρέατος, βρέθηκαν καλές συσχετίσεις μεταξύ των μετρήσεων των μικροοργανισμών και των συγκεντρώσεων βιογενών αμινών στο τέλος της αποθήκευσης (Dabade et al.,2020), άποψη η οποία συμφωνεί και με τη μελέτη των (Balamatsia et al.,2006) οι οποίοι βρήκαν καλή συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων μικροβιακών φορτίων και των βιογενών αμινών στο νωπό κρέας κοτόπουλου κατά την αποθήκευση. Έχουν επίσης τεκμηριωθεί σημαντικοί συσχετισμοί μεταξύ της συγκέντρωσης διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών που σχετίζονται με το τυρί που παρασκευάζεται σε πολλές γαλακτοκομικές εκμεταλλεύσεις και εκείνων των βιογενών αμινών που εντοπίστηκαν σε δείγματα τυριών (Pintado et al., 2008)

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η αύξηση των συγκεντρώσεων βιογενών αμινών είναι σημαντικά υψηλότερη στα ζωικά προϊόντα από ό, τι στα φυτικά τρόφιμα. Κατά την ημέρα της αγοράς, τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση περιέχουν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση βιογενών αμινών από τα μη ζυμωμένα προϊόντα. Οι αναλύσεις συσχέτισης δείχνουν ότι, εκτός από την τρυπταμίνη, υπάρχουν σημαντικοί θετικοί συσχετισμοί μεταξύ των συγκεντρώσεων βιογενών αμινών που εντοπίστηκαν κατά την ημερομηνία λήξης και των ελεύθερων αμινοξέων που μετρήθηκαν την ημέρα 0 (ημέρα αγοράς). Όσον αφορά τις μικροβιακές μετρήσεις, μπορούν να βρεθούν μόνο περιορισμένοι συσχετισμοί μεταξύ διαφόρων ομάδων βακτηρίων και συγκεντρώσεων βιογενών αμινών . Οι συσχετίσεις μεταξύ των μικροβιακών μετρήσεων και των συγκεντρώσεων των βιογενών αμινών είναι ισχυρότερες στην ομάδα προϊόντων με βάση το κρέας (Dabade et al., 2021).

Name	Abbr.	Structure	Molecular formula	Molecular weight	Classification
putrescine	PUT		C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	88.15	aliphatic amine
cadaverine	CAD		C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	102.18	aliphatic amine
spermine	SPM		C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	202.34	aliphatic amine
spermidine	SPD		C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub>	145.25	aliphatic amine
tyramine	TYR		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	137.18	aromatic amine
phenylethylamine	PEA		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	121.18	aromatic amine
histamine	HIS		C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	111.15	heterocyclic amine
tryptamine	TRP		C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	160.21	heterocyclic amine

**Εικόνα 1:** Βασικές πληροφορίες για τις 8 κοινές βιογενή αμίνες (ZhangYu-jia et al., 2019)

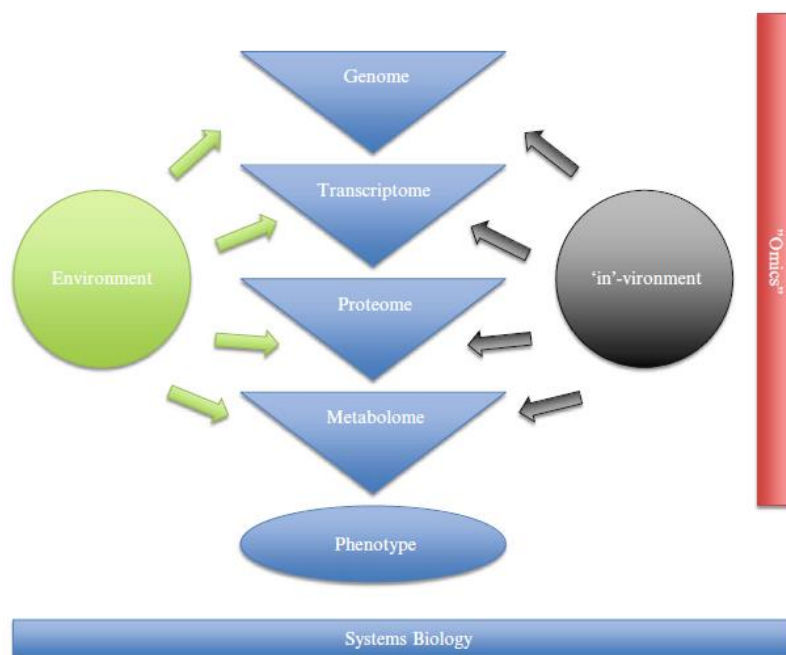
## 1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ

### 1.5.1 Γενική εισαγωγή

Η μεταβολωμική (metabolomics) αποτελεί ένα πεδίο έρευνας των βιοεπιστημών που χρησιμοποιεί τεχνολογίες υψηλής απόδοσης για τον εντοπισμό ή και τον χαρακτηρισμό όλων των μικρών μορίων ή μεταβολιτών σε ένα δεδομένο κύτταρο, ιστό ή οργανισμό.

Αποτελεί ένα σχετικά νέο και εξελισσόμενο πεδίο που είναι χρήσιμο στην πρόβλεψη πολλών βιοδεικτών της πρόσληψης τροφής, των ασθενειών και της τοξικότητας στα φάρμακα σε κυτταρικό επίπεδο. Εφαρμόστηκε για χρόνια μελέτη σε καταστάσεις υγείας όπως υπέρταση, καρκίνος, οξειδωτικό στρες, καρδιαγγειακές παθήσεις, μεταβολικό σύνδρομο, παχυσαρκία και διαβήτη καθώς και σύνθεση τροφίμων, διατροφική αξιολόγηση και ποιότητα τροφίμων. Επίσης έχουν αναφερθεί μελέτες σχετικά με την εφαρμογή του προφίλ μεταβολισμού των φυσιολογικών επιδράσεων των τροφίμων σε βιοδραστικά πεπτίδια και σε προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών (Onuh et al., 2019).

Η μεταβολωμική είναι ένας από τους κύριους κλάδους στον τομέα των τεχνικών «-omics» και έχει ως σκοπό την ολοκληρωμένη κατανόηση των πεδίων της επιστήμης μαζί με την πρωτεωμική, γονιδιωματική και μεταγραφωμική. Η πρωτεωμική (proteomics) η οποία σχετίζεται με την ανάλυση πρωτεϊνών και πεπτιδίων και παρακολουθεί τις αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση, η γονιδιωματική (genomics) μελετάει τα γονίδια και ακολουθεί τις αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης και η μεταγραφωμική (transcriptomics) η οποία μελετά το σύνολο των mRNA που παράγονται σε ένα κύτταρο.



**Εικόνα 2 :** Απεικόνιση των ολιστικών αναλυτικών τεχνικών «-omics» (Bjerrum, 2015)

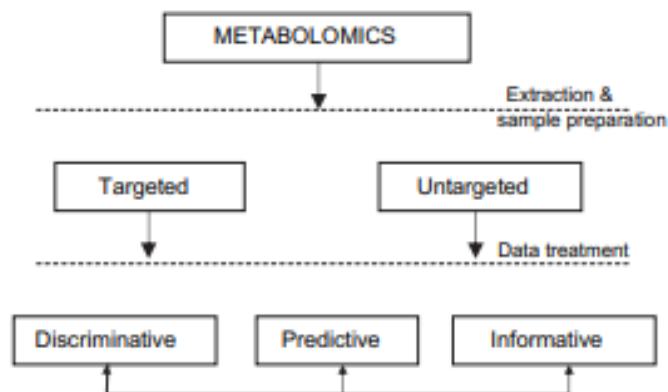
Η στοιχειακή μεταβολωμική είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός του στοιχειακού περιεχομένου σε βιολογικά δείγματα κατά την παρακολούθηση των αλλαγών τους (Zhang et al., 2017).

Οι μεταβολίτες είναι οργανικά μόρια με μοριακό βάρος < 1500 Da και περιλαμβάνουν πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια, νουκλεοζίτες, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, λιπίδια, στεροειδή, αλκαλοειδή, αμίνες, κετόνες, αλδεΰδες, τοξίνες, καροτενοειδή, επιμολυντές, φάρμακα και μεταβολίτες φαρμάκων και συστατικά τροφίμων (Castro-Puyana et al., 2017). Οι μεταβολίτες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τους πρωτογενείς και τους δευτερογενείς. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για τις λειτουργίες του οργανισμού, ενώ οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και σχετίζονται με τις επιδράσεις του οργανισμού με τον περιβάλλοντα χώρο.

Οι αναλυτικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται συνήθως στη μεταβολωμική μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες. Στη στοχευμένη μεταβολωμική (targeted ή fingerprinting) και μη στοχευμένη μεταβολωμική (untargeted ή profiling). Οι στοχευμένες αναλύσεις επικεντρώνονται σε μια συγκεκριμένη ομάδα μεταβολιτών με τις περισσότερες περιπτώσεις να απαιτούν ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση όσων περισσότερων μεταβολιτών εντός της ομάδας (Ramautar et al., 2006). Οι στοχευμένες αναλύσεις είναι σημαντικές για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς μιας συγκεκριμένης ομάδας ενώσεων στο δείγμα υπό καθορισμένες συνθήκες. Η στοχευμένη μεταβολωμική απαιτεί συνήθως υψηλότερο επίπεδο καθαρότητας και επιλεκτικής εκχύλισης μεταβολιτών. Αντίθετα, η μη



στοχευμένη μεταβολωμική επικεντρώνεται στην ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων ομάδων μεταβολιτών για να αποκτήσουν μοτίβα ή δακτυλικά αποτυπώματα χωρίς απαραίτητα αναγνώριση ή ποσοτικοποίηση συγκεκριμένης ένωσης (Monton et al., 2007). Μη στοχευμένες αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση πιθανόν δακτυλικών αποτυπωμάτων σε βιολογικά φαινόμενα όπως οι ασθένειες φυτών (Cevallos-Cevallos et al., 2009)(Εικόνα 3).



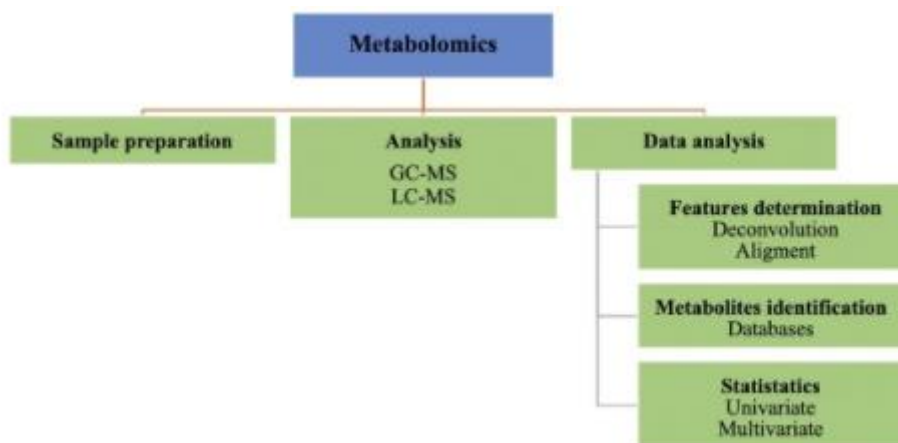
Εικόνα 3: Γενική ταξινόμηση της μεταβολωμικής(Cevallos-Cevallos, 2009)

### 1.5.2 Αναλυτικές τεχνικές στη μεταβολωμική μελέτη

Η μεταβολωμική ανάλυση αποτελείται από μια ακολουθία βημάτων όπως i) προετοιμασία δείγματος, ii) εκχύλιση μεταβολιτών, iii) παραγωγοποίηση, iv) διαχωρισμός μεταβολίτη, v) ανίχνευση και επεξεργασία δεδομένων. Ωστόσο, δεν χρειάζονται πάντα όλα τα βήματα. Μονάχα η ανίχνευση και η ανάλυση δεδομένων είναι τα βασικά βήματα σε όλες τις αναφερόμενες μελέτες μεταβολωμικής. Η επιλογή των βημάτων εξαρτάται από τον τύπο της μελέτης (untargeted έναντι targeted), το είδος δείγματος (στερεά έναντι υγρών), τα όργανα που θα χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό (π.χ. GC έναντι LC) και η μέθοδος ανίχνευσης (π.χ. MS έναντι NMR) (εικόνα 4) (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Η προετοιμασία κάθε δείγματος εξαρτάται από το ίδιο το δείγμα. Πιο συγκεκριμένα στο κοτόπουλο, μεταβολίτες οι οποίοι φέρουν στο μόριο τους πολικές ομάδες, όπως υδροξυλομάδες, αμινομάδες και καρβοξυλομάδες, ταξινομούνται σε αμινοξέα, λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες και οργανικά οξέα, καθιστώντας όμως ακατάλληλο το διαχωρισμό με την αέρια χρωματογραφία λόγω της αύξησης του σημείου βρασμού (Fiehn, 2013). Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, οι πολικές λειτουργικές ομάδες πρέπει να παραγωγοποιούνται για την απομάκρυνση των δεσμών υδρογόνου και την αύξηση της πτητικότητας. Η παραγωγοποίηση πραγματοποιείται μετά την εκχύλιση και πριν το διαχωρισμό των ουσιών.

Με την παραγωγοποίηση μειώνεται η αλληλεπίδραση με τη στήλη η οποία μπορεί να προκαλέσει κακό χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η παραγωγοποίηση είναι μια διαδικασία δυο βημάτων. Το πρώτο βήμα είναι η μεθοξυαμίνωση (methoxyamination) (μετατροπή

αλδεϋδών και κετονών σε οξίμες) και το δεύτερο η σιλυλίωση (MSTFA αντιδραστήριο) για την παραγωγή τριμεθυλοσιλυλιωμένων προϊόντων (προϊόντα TMS). Με την μεθοξυαμίνωση προστίθενται μεθοξυλαμίνη για το σχηματισμό οξιμών έτσι ώστε να αποτρέπεται η κυκλοποίηση των αναγόντων σακχάρων, να παρεμποδίζεται η ταυτομέρεια ειδικά στους μονοσακχαρίτες και να προστατεύονται τα α-κετοξέα από την αποκαρβοξυλίωση, ενώ με τη σιλυλίωση αυξάνεται η πτητικότητα μειώνοντας την υδροφιλικότητα των ομάδων OH, SH ή NH. Κατά τη σιλυλίωση εισάγεται στο μόριο μια σιλυλομάδα (πυρίτιο με 3 μεθύλια) και η οποία αντικαθιστά τα ενεργά υδρογόνα των υδρόφιλων χαρακτηριστικών ομάδων (Gullberg et al., 2004, Fiehn, 2013).



**Εικόνα 4:** Στάδια μεταβολομικής ανάλυσης (Zeki, 2020)

Στη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιούνται πολλές αναλυτικές τεχνικές για ανάλυση με τις κυριότερες αυτών να είναι η υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών (LC-MS), αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC-MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), (πίνακας 1).

Το LC-MS χρησιμοποιεί υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για το διαχωρισμό των ενώσεων και το MS για την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες μαζών. Η LC/MS είναι μία τεχνική κατάλληλη για την ανάλυση ασταθών, θερμοευαίσθητων, μη πτητικών (χρωματογραφία αντίστροφης φάσης) ή υδρόφιλων ενώσεων (χρωματογραφία κανονικής φάσης). Το GC-MS χρησιμοποιεί την αέρια χρωματογραφία GC για το διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος και τη φασματομετρία μάζας (MS) για την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών. Στην αέρια χρωματογραφία οι ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές προκειμένου να γίνει η ανάλυση και δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης μέχρι και 400 ουσιών σε κάθε ανάλυση, κάποιες από τις οποίες είναι οι αμίνες, τα σάκχαρα, τα λιπαρά και οργανικά οξέα, οι στερόλες και τα αμινοξέα (Hill and Roessner, 2013).

Τέλος, το NMR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών, οι οποίοι περιέχουν στο μόριο τους τουλάχιστον ένα άτομο υδρογόνου. Ενώσεις όπως τα αμινοξέα, οι βιταμίνες, τα νουκλεοτίδια έχουν προσδιοριστεί με NMR .

**Πίνακας 2** : Σύγκριση των κυριότερων μεθόδων που χρησιμοποιούνται στη μεταβολωμική ανάλυση(Chin et al., 2013)

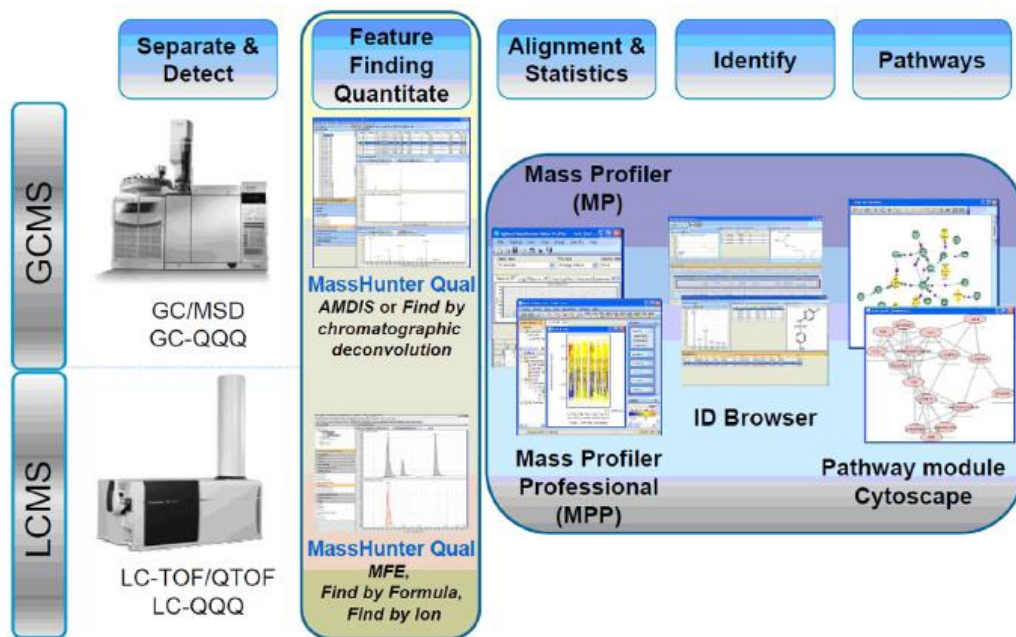
	<b>Πλεονεκτήματα</b>	<b>Μειονεκτήματα</b>
G C - M S	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Υψηλή Διαχωριστική Ικανότητα</li> <li>➤ Ανίχνευση – Μέτρηση χαμηλής συγκέντρωσης</li> <li>➤ Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Απαίτηση παραγωγοποίησης για θερμικά ασταθή μόρια</li> <li>➤ Μικρό δυναμικό Εύρος</li> <li>➤ Αργή μέθοδος σε σχέση με την NMR</li> <li>➤ Μη δυνατότητα ανάκτησης δειγμάτων</li> </ul>
N M R	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Υψηλή αναπαραγωγιμότητα</li> <li>➤ Μεγάλο δυναμικό εύρος</li> <li>➤ NMR χαμηλής ανάλυσης (LR-NMR),είναι μικρό, εύκολο στη χρήση και σχετικά φθηνό</li> <li>➤ Γρήγορη μέθοδος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Το NMR υψηλής ανάλυσης (HR-NMR) είναι ακριβό</li> <li>➤ Χαμηλή ευαισθησία (νανογραμμομόρια)σε σύγκριση με τις τεχνολογίες που βασίζονται σε MS (picomoles έως femtomoles)</li> <li>➤ Το LR-NMR μπορεί να περιοριστεί κατά απαίτηση για ακριβή μέθοδος αναφοράς για την εκτέλεση ποσοτικών ανάλυσεων</li> </ul>
L C - M S	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Κατάλληλο για εκτίμηση λιπιδίων, πεπτιδίων και μακρομορίων</li> <li>➤ Υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση του τρόπου ανάλυσης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Δύσκολος μεταβολικός χαρακτηρισμός λόγω χρωματογραφικής απόκλισης</li> <li>➤ Έλλειψη βιβλιοθηκών για το LC-MS</li> <li>➤ Δυσκολία στο standarization</li> </ul>

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε σαν τεχνική μεταβολωμικής ανάλυσης η GC-MS. Η αέρια χρωματογραφία είναι μία ενόργανη αναλυτική μέθοδος με την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος καθώς διέρχονται μέσα από μία στήλη χρωματογραφίας. Η στατική φάση είναι υγρή ενώ η κινητή φάση είναι αέρια. Τα συστατικά εισάγονται στη χρωματογραφική στήλη, συμπαρασύρονται από ένα αδρανές αέριο (φέρων αέριο - κινητή φάση) και κινούνται μέσα στη στήλη, η οποία θερμοστατείται.

Τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ της αέριας κινητής και της υγρής στατικής φάσης. Η κατανομή εξαρτάται από τη χημική συγγένεια του αναλύτη με τη στατική φάση και την τάση ατμών του. Καθώς οι αναλύτες αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με τη στήλη, μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και έτσι έχουν διαφορετικούς χρόνους έκλουσης. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται ο διαχωρισμός των ουσιών. Μετά τον διαχωρισμό λαμβάνεται το χρωματογράφημα, όπου συνήθως κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει και ένα διαφορετικό συστατικό του αρχικού μίγματος. Ο χρόνος που εμφανίζεται η κάθε κορυφή χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της ουσίας, ενώ το μέγεθος της κορυφής (εμβαδό ή ύψος) χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της.

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρία μαζών, η οποία περιλαμβάνει τον ιονισμό ατόμων ή μορίων και παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων και έπειτα γίνεται διαχωρισμός των παραγόμενων φορτισμένων σωματιδίων με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Σαν κύρια μέθοδο ιονισμού χρησιμοποιείται ο ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων. Αφού σχηματιστούν τα ιόντα στη πηγή ιονισμού, εισέρχονται στον αναλυτή μαζών για να διαχωρισθούν βάση του λόγου  $m/z$ . Ο συνηθέστερος αναλυτής μαζών είναι το τετράπολο. Το τετράπολο αποτελείται από 4 ράβδους ανάμεσα από τις οποίες πρέπει να περάσουν τα ιόντα για να φτάσουν στον ανιχνευτή. Ανά δύο οι απέναντι ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά σχηματίζοντας δύο ζεύγη ηλεκτροδίων. Σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται μία εναλλασσόμενη (RF) και μία συνεχής διαφορά δυναμικού (DC). Μεταβάλλοντας τα δυναμικά DC & RF και διατηρώντας τον λόγο RF/DC σταθερό, συλλέγεται το φάσμα μάζας. Για κάθε τιμή της έντασης του πεδίου μόνο ιόντα με συγκεκριμένη τιμή  $m/z$  μπορούν να διέλθουν από το τετράπολο. Όλα τα υπόλοιπα παρεκκλίνουν από την πορεία τους και πέφτουν πάνω στις ράβδους.

Τελικά, συλλέγεται το φάσμα μαζών της κάθε ουσίας, το οποίο αναπαριστά την αφθονία του θραύσματος σε σχέση με το λόγο  $m/z$ , το οποίο αποτελεί και το δακτυλικό αποτύπωμα της κάθε ουσίας.



Εικόνα 5 : Σχηματική απεικόνιση της μεταβολομικής ανάλυσης δείγματος (Onuh, 2019)

### 1.5.3 Χημειομετρία

Η χημειομετρία νοείται ως ο επιστημονικός κλάδος ο οποίος εφαρμόζει στατιστικές μεθόδους σε χημικά συστήματα με σκοπό την εξαγωγή σημαντικών πληροφοριών. Η χημειομετρία, αποτελεί ένα ουσιαστικό και ολοκληρωμένο κομμάτι της μεταβολομικής, καθώς κατά τη μεταβολομική ανάλυση παράγεται μία τεράστια ποσότητα σύνθετων δεδομένων. Για να γίνει εξαγωγή πληροφοριών, τα μη επεξεργασμένα δεδομένα θα πρέπει να προεπεξεργαστούν σε όρους φιλτραρίσματος θορύβου, διόρθωσης γραμμής βάσης, ευθυγράμμισης κορυφής, binning, κανονικοποίησης και κλιμάκωσης (scaling) (Wishart, 2008).

Στόχος των πολυμεταβλητών αναλύσεων (multivariate analysis) είναι η μείωση της πολυπλοκότητας και της διάστασης (dimensionality) των δεδομένων. Στη μεταβολομική οι πιο εκτενώς χρησιμοποιούμενες μέθοδοι βασίζονται σε δυο κατηγορίες την επιβλεπόμενη (supervised) και τη μη επιβλεπόμενη (unsupervised). Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι περιλαμβάνουν την PCA (principal component analysis) ανάλυση κύριων συνιστωσών, στις οποίες στο μοντέλο δεν περιλαμβάνει καμία πληροφορία για την κατηγορία ή τάξη στην οποία ανήκουν τα δεδομένα, εξάγοντας κυρίαρχες πηγές διακύμανσης (dominant sources of variation). Η PCA είναι εξαιρετικά χρήσιμη στην ανίχνευση ακραίων τιμών, όπως και στην ομαδοποίηση (intrinsic) εσωτερικών δειγμάτων, πράγμα το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την επακόλουθη αναγνώριση παρόμοιων βιολογικών χαρακτηριστικών εντός ομαδοποιημένων δειγμάτων.

Σε αντίθεση με την PLS-DA (partial least squares-discriminant analysis, ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων –διακριτική ανάλυση) η οποία ανήκει στις επιβλεπόμενες

μεθόδους και στην οποία περιλαμβάνεται εκ των προτέρων η κλάση στην οποία ανήκει το κάθε δείγμα.

Η PCA όπως και η PLS-DA συμπιέζουν τα δεδομένα έτσι ώστε να είναι ευκολότερο να εξεταστούν γραφικά και με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να ομαδοποιηθούν τα μοτίβα (Kemsley et al., 2007). Και οι δυο δεν επιτρέπουν την άμεση ταυτοποίηση ή την ποσοτικοποίηση των ενώσεων, όμως επιτρέπουν μια αμερόληπτη (ή μη στοχευμένη), χημικά περιεκτική σύγκριση μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων (Wishart, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, η PCA είναι μία μη επιβλεπόμενη μέθοδος, η οποία ομαδοποιεί – ταξινομεί μία ομάδα συσχετιζόμενων μεταβλητών, περιγράφει δεδομένα που αρχικά εκφράστηκαν από μεγάλο αριθμό εκδηλωμένων μεταβλητών και ο στόχος της είναι να δημιουργηθεί ένα νέο σύνολο μεταβλητών οι οποίοι είναι απλοί γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών δεδομένων (Kemsley et al., 2007). Συγκεντρώνει συσχετιζόμενες μεταβλητές, δηλαδή μεταβλητές που ποικίλλουν με παρόμοιο τρόπο σε όλα τα σύνολα δεδομένων, σε μία νέα μεταβλητή η οποία είναι η PC (κύρια συνιστώσα) και είναι ένας γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) επεξηγεί τη μέγιστη δυνατή διακύμανση των αρχικών μεταβλητών, ενώ η δεύτερη συνιστώσα (PC2) επεξηγεί ένα μικρότερο μέρος της διακύμανσης σε σχέση με την πρώτη συνιστώσα. Τυπικά, η PCA είναι μια τεχνική μείωσης διαστάσεων όπου επιτρέπεται η σχεδίαση, η απεικόνιση και η συσσώρευση πολλαπλών συνόλων μεταβολικών δεδομένων με βάση γραμμικούς συνδυασμούς (γνωστοί ως κύριοι άξονες) (Worley, 2013). Ως τεχνική ομαδοποίησης, η PCA χρησιμοποιείται πιο συχνά για να προσδιορίσει πώς ένα δείγμα είναι διαφορετικό από ένα άλλο, ποιες μεταβλητές συμβάλλουν περισσότερο στην εν λόγω διαφορά και αν αυτές οι μεταβλητές συνεισφέρουν με τον ίδιο τρόπο (δηλαδή συσχετίζονται) ή ανεξάρτητα (δηλαδή μη συσχετισμένες) μεταξύ τους (Wishart, 2008).

Αντίθετα, η PLS-DA είναι μία επιβλεπόμενη μέθοδος ομαδοποίησης η οποία έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την ανάλυση δεδομένων τόσο με μεγάλο αριθμό συσχετισμένων μεταβλητών όσο και με περιορισμένο αριθμό παρατηρήσεων. Η κύρια διαφορά με το PCA είναι ότι εκμεταλλεύεται τη  $Y$  απόκριση για να εκτιμήσει –υπολογίσει ένα μοντέλο το οποίο μεγιστοποιεί τη διακύμανση μεταξύ  $X$  και  $Y$  και έτσι επιτρέπει την  $Y$  σχετιζόμενη παραλλαγή (variation) με το  $X$  να περιγραφεί αποτελεσματικά. Επομένως ένα PLS μοντέλο έχει τη δυνατότητα να συνοψίζει τη μήτρα δεδομένων  $X$  αλλά και να προβλέπει τη  $Y$  μήτρα απόκρισης. Η DA (διαχωριστική ικανότητα) χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη ή την τάξη που ανήκει σύνολο δειγμάτων μέσω μεταβλητών διαχωρισμού. Ο στόχος της PLS-DA είναι συνεπώς η εξαγωγή μοτίβων στο  $X$  που να μεγιστοποιούν τον διαχωρισμό μεταξύ ομάδων παρατηρήσεων που ορίζονται από το  $Y$  (Boccard et al., 2019).

#### 1.5.4 Η εφαρμογή της μεταβολωμικής στα τρόφιμα

Η επιστήμη των τροφίμων είναι ένα πεδίο που περιλαμβάνει πολλούς τομείς της επιστήμης, που κυμαίνονται από τη βιολογία και τη χημεία, τη μηχανική και την

ψυχολογία. Παρά το μικρό τους μέγεθος, οι μεταβολίτες έχουν σημαντική επίδραση στα οργανοληπτικά και διατροφικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Η κατανόηση του μεταβολώματος ενός τροφίμου μπορεί να αποσαφηνίσει τη σχέση μεταξύ της σύνθεσής της και των οργανοληπτικών, διατροφικών και υγιεινών χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, η μεταβολωμική είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς προσδιορίζει μεταβολίτες που σχετίζονται με επιθυμητά χαρακτηριστικά τροφίμων, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για το πώς μπορούν να κατευθυνθούν και να βελτιωθούν.

Παρέχει τη δυνατότητα βελτίωσης των τρεχουσών μεθόδων για την καλλιέργεια και τη συγκομιδή καλλιεργειών, επίσης για τη μεταφορά και επεξεργασία προϊόντων, και μπορεί να είναι το εργαλείο για απάντηση σε ανησυχίες και επιθυμίες των καταναλωτών σχετικά με την ασφάλεια, την αυθεντικότητα και τη διατροφική ποιότητα των προϊόντων (Beleggia et al., 2011).

Η μεταβολωμική έχει ένα μεγάλο φάσμα χρήσεων σε πολλούς τομείς της επιστήμης τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της ταυτοποίησης συστατικών, της οργανοληπτικής επιστήμης, της ασφάλειας και της επεξεργασίας. Τα τρόφιμα έχουν παραδοσιακά αξιολογηθεί με βάση βασικά συστατικά όπως η πρωτεΐνη, περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, υγρασία, λιπίδια και τέφρα. Ωστόσο με την ανοδική τάση της μεταβολωμικής έχει παρουσιαστεί ένας τρόπος ανάλυσης των τροφίμων με περισσότερες λεπτομέρειες και ταυτοποίησης μορίων και χημικών ουσιών που περιέχονται σε αυτά. Γνωρίζοντας ποια μόρια είναι μοναδικά σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο, καθώς και την ποσότητα αυτών, αποτελεί πολύτιμη πληροφορία.

Ανίχνευση ενώσεων ειδικά για τα τρόφιμα μπορεί να βοηθήσει στη δημιουργία «καρτών αναγνώρισης» στα φαγητά. Επιπρόσθετα, προσδίδοντας μεγαλύτερη κατανόηση της σύνθεσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επικύρωση, αυθεντικότητα, αποδοχή και ποιότητα των τροφίμων. Επιπλέον, αυτό εξηγεί πώς το περιβάλλον επηρεάζει αυτά που καταναλώνουμε. Αυτό σχετίζεται ιδιαίτερα με τρόφιμα, χυμούς, κρασί, όπου η ποιότητα και οι οργανοληπτικές ιδιότητες είναι συνάρτηση του περιβάλλοντος της καλλιέργειας και των βημάτων της επεξεργασίας (Chin et al., 2013). Πολλοί τύποι τροφίμων και ποτών συμπεριλαμβανομένων του καφέ (Choi et al., 2010), σάκε (Sugimoto et al., 2012), πορτοκαλιών (Slisz et al., 2012), ροδάκινων (Lombardo et al., 2011), γλυκών πιπεριών (Eggink et al., 2012), φραουλών (Zhang et al., 2011), μελιού (Consonni et al., 2012, Ramanauskienė et al., 2012, Schievano et al., 2011, Skogerson et al., 2009), τυριού (Mazzei et al., 2012), πεπονιών (Moing et al., 2011), μήλων (Aprèa et al., 2011), κρασιού (Louw et al., 2009, Al;I et al., 2011, Imparato et al., 2011), ντοματών (Thissen et al., 2011, Malmendal et al., 2011) έχουν αξιολογηθεί με τη μεταβολωμική.

Ένας τομέας της επιστήμης τροφίμων όπου η μεταβολωμική έχει αντίκτυπο είναι και η αυθεντικότητα του μελιού.

Η NMR και η HPLC είναι και οι δυο κατάλληλες σαν μέθοδοι για την καθιέρωση προφίλ μεταβολιτών. Η NMR χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της συνολικής



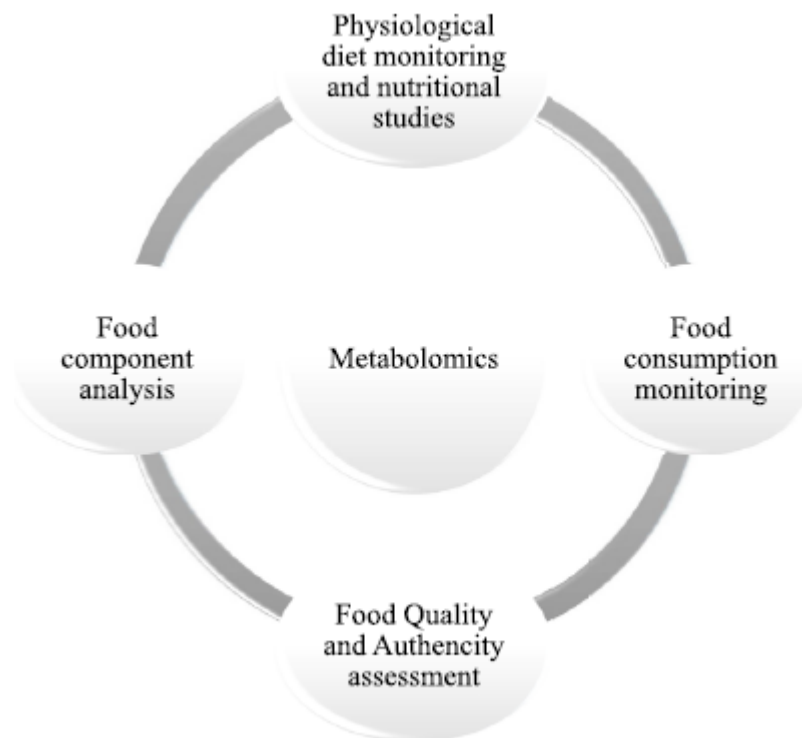
περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες μεταξύ μελιών που προέρχονται από διαφορετικά βοτανικά είδη, και η HPLC χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών.

Παράλληλα και το κρασί έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό από τη μεταβολωμική, αποσαφηνίζοντας τους μεταβολίτες του κρασιού, κάνοντας καλύτερη εκτίμηση για την πολυπλοκότητα του κρασιού και δίνοντας πληροφορίες για καλύτερη παραγωγή κρασιού (Ali et al., 2011). Η μεταβολική, επίσης, παρουσιάζει μια επιτυχημένη εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές οργανοληπτικές πρακτικές. Γνωρίζοντας τα ειδικά μόρια που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του τι θεωρείται αποδεκτό ή μη για τους καταναλωτές.

Ένα παράδειγμα της χρήσης της μεταβολωμικής στην πρόβλεψη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών περιλαμβάνει τη συσχέτιση μεταβολιτών σε κονσέρβες ντοματών από NMR με ποιοτική ανάλυση περιγραφής (QDA). Αυτή η έρευνα έδειξε ότι τα αποτελέσματα των NMR και QDA συμπίπτουν και υπάρχει συσχετισμός μεταξύ τους. Βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της ξινή γεύσης του μηλικού και του κιτρικού οξέος (Thissen et al., 2011).

Παράλληλα, η μεταβολωμική, συνεισφέρει στην ασφάλεια των τροφίμων σε ότι αφορά την καταπολέμηση φυσικών, χημικών και βιολογικών κινδύνων, ενισχύοντας και με αυτό τον τρόπο προγράμματα διαχείρισης τροφίμων. Οι μεταβολωμικές πλατφόρμες βοηθούν στην ελαχιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης. Επίσης, η ασφάλεια των τροφίμων επιδιώκει τη χρήση μεταβολωμικής για την αξιολόγηση της ασφάλειας των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων ή νέων μεθόδων επεξεργασίας πέραν των συμβατικών βιολογικών, φυσικών και χημικών προγραμμάτων ανάλυσης κινδύνων (Chin et al., 2013).

Η μεταβολωμική εισάγει τεχνικές για την εξέταση του αντίκτυπου που έχει η επεξεργασία στα θρεπτικά στοιχεία και στις οργανοληπτικές ιδιότητες (Chin et al., 2013). Εξετάζοντας δηλαδή την αλλαγή που η παστερίωση προκαλεί στο μεταβόλωμα των τροφίμων, παρέχει στους επεξεργαστές τις πληροφορίες που απαιτούνται για τη βελτίωση των μεθόδων παστερίωσης έτσι ώστε να μπορούν να μεγιστοποιηθούν τα οφέλη για την ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Sugimoto et al., 2012). Στην επιστήμη των τροφίμων, η μεταβολική έχει τη δυνατότητα επίλυσης σημαντικών προβλημάτων παγκοσμίως καθώς εφαρμόζεται στα τρόφιμα ερευνητικά προγράμματα όπως το Metabolomics for Plants, πρωτοβουλία Health and OutReach (METHA-PHOR) (Hall, 2007). Επιπλέον, η μεταβολική θεωρείται αποτελεσματικό εργαλείο για την αντιμετώπιση μελλοντικών αναγκών στη γεωργία (Green et al., 2007) και στην ανθρώπινη διατροφή (Green et al., 2007; Hall et al., 2008).



**Εικόνα 6:** Η σημασία της μεταβολωμικής στα τρόφιμα

### 1.5.5 Η συνεισφορά της μεταβολωμικής στη μελέτη των πουλερικών

Οι μελέτες μεταβολωμικής που έχουν γίνει στα πουλερικά και πιο συγκεκριμένα στο μπούτι κοτόπουλο, είναι ελάχιστες.

Η ταχέως αναπτυσσόμενη φύση των εμπορικών κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής έχει ωθήσει στην διερεύνηση - εξέταση διαφορετικών μεταβολικών οδών μετά από θερμό-υγρό ή ξηρό στρες στα κοτόπουλα. Έγινε υπόθεση ότι τα προφίλ των μεταβολιτών σχετίζονται με παθοφυσιολογικές διεργασίες που προκαλούνται από θερμό-υγρό ή ξηρό κλίμα. Η εξέταση για την ανίχνευση των χαρακτηριστικών μεταβολιτών έγινε σε δείγματα κοπράνων με μη στοχευμένη μεταβολωμική βασισμένη σε εξαιρετικά υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τετραπολική φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης (UHPLC-Q-TOF / MS) (Plumb et al., 2005; Van der Greef et al., 2013). Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η μελέτη των ευπροσάρμοστων επιδράσεων του θερμού-υγρού ή του ξηρού κλίματος σε διαφορετικές μεταβολικές οδούς σε δείγματα κοπράνων και η παροχή περισσότερων λεπτομερειών σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης μετά από θερμό-υγρό ή ξηρό στρες.

Σε μία άλλη μελέτη των (Wen et al., 2020) μέσω της μεταβολωμικής προσέγγισης εξετάστηκε η ποιότητα κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι μεταβολικές και ποιοτικές αλλαγές στο κρέας κοτόπουλου είναι πολύ περίπλοκες διαδικασίες. Η τρέχουσα έρευνα σε αυτό το θέμα επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με το μεταβολισμό (π.χ., συνολικό πτητικό άζωτο, pH). Μέχρι στιγμής, λίγες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μεταβολική του κρύου, νωπού κρέατος. Έτσι, οι δυναμικές αλλαγές στα μεταβολικά συστατικά και οι μηχανισμοί που διέπουν τη αλλοίωση

του κρέατος κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης παραμένουν ασαφείς. Το κρέας υποβλήθηκε σε μη στοχευμένη, μεταβολωμική μελέτη χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας. Οι βασικοί μεταβολίτες και οι μεταβολικές οδοί που σχετίζονται με αλλαγές στην ποιότητα του κρέατος εξετάστηκαν και εντοπίστηκαν μέσω ανάλυσης δεδομένων. Η βιολογική σημασία αυτών των μεταβολιτών ερμηνεύτηκε συστηματικά για να εξηγήσει τις μεταβολικές αλλαγές που προκαλούνται από μικροοργανισμούς και ενδογενείς πρωτεάσες στο κρέας κοτόπουλου. Μέσω αυτής της μελέτης δόθηκε δηλαδή μια επιστημονική βάση για καλύτερο ποιοτικό έλεγχο και αποτελεσματικότητα αποθήκευσης των προϊόντων κρέατος. Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερα αμινοξέα μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ενώ οι αμίνες όπως η ισταμίνη, η τυραμίνη και η τρυπταμίνη αυξήθηκαν. Τα οργανικά οξέα και σάκχαρα παρουσίασαν ανοδική ή πτωτική τάση καθώς οι ημέρες αποθήκευσης αυξάνονταν και συνδέθηκαν με αλλαγές στην ποιότητα του κρέατος

Οι Michaldi et al., 2020 μελέτησαν το μεταβολωμικό προφίλ του ginger που έχει υποστεί ζύμωση στην παράταση διάρκειας διατήρησης του κοτόπουλου. Σε αυτή τη μελέτη ταυτοποιήθηκαν 25 μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων αρκετών με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η εφαρμογή ζυμωμένου ginger σε πάστα ενισχύει την ασφάλεια των προϊόντων κρέατος κοτόπουλου. Συνιστάται βέβαια μελλοντική μελέτη για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων της ζύμωσης πάστα τζίντζερ στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κοτόπουλου και της αποδοχής του από τον καταναλωτή.

Καταλήγοντας, η μελέτη των Lytou et al., 2017 έδειξε ότι οι επιλεγμένες μαρινάδες ήταν αποτελεσματικές σε γηγενή μικροβιοτικούς οργανισμούς σε φιλέτα στήθους κοτόπουλου. Ο συνδυασμός παραδοσιακού λεμονιού και μαρινάδων ξιδιού με χυμό ροδιού οδήγησαν σε ικανοποιητικά οργανοληπτικά και μικροβιολογικά αποτελέσματα. Η θερμοκρασία μαρινάρισματος δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στις περισσότερες από τις δοκιμασμένες περιπτώσεις. Όσον αφορά τον χρόνο, παρατηρήθηκε ότι το μαρινάρισμα για τρεις ώρες δεν ήταν μόνο αποτελεσματικό για τα μικρόβια αλλά είχαν επίσης επιθυμητά οργανοληπτικά αποτελέσματα. Ο συνδυασμός μικροβιολογικής, οργανοληπτικής και χημικής ανάλυσης επέτρεψαν την απόκτηση μιας πληρέστερης εικόνας της επίδρασης διαφορετικών μαρινάδων και χρόνων μαρινάρισματος. Η μεταβολωμική μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα των προϊόντων κρέατος, ενώ η χρήση τους μπορεί να επεκταθεί σε νέες περιοχές σε σχέση με την ποιότητα των τροφίμων.

## 1.6 Σκοπός της μελέτης

Η μεταβολωμική αποτελεί ένα νέο αναδυόμενο πεδίο στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών. Η μεταβολωμική θα αντικαταστήσει τις οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις. Αν και κοστοβόρα (προς το παρόν) σε σχέση με τις παραπάνω αναλύσεις, η μεταβολωμική έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της σύνθεσης των τροφίμων, της αξιολόγησης της ποιότητας, της αυθεντικότητας και της προέλευσης του προϊόντος.

Δεδομένου ότι στην επιστημονική βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την αλλοίωση και την εκτίμηση της φρεσκότητας σε μπούτι κοτόπουλο, η παρούσα μελέτη, στοχεύει στην εφαρμογή της μεταβολωμικής για τον προσδιορισμό του πολικού κλάσματος μεταβολιτών σε μπούτι κοτόπουλο χρησιμοποιώντας ως αναλυτική τεχνική τη GC-MS για τη απόκτηση γνώσης σχετικά με την αλλοίωση και την ποιότητα του μπουτιού κοτόπουλου, ανευρίσκοντας βιοδείκτες, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων για την εκτίμηση της ασφάλειας, του μικροβιακού φορτίου, και της φρεσκότητας στα πουλερικά.

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε μπούτι κοτόπουλου που προμηθεύτηκαν από την εταιρεία ΚΟΤΙΝΟ ΑΕΒΕ από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, τα οποία είχαν συντηρηθεί σε 3 θερμοκρασίες στους 0°C, 5°C, και 10°C, όπως φαίνεται και στον πίνακα 2.1.

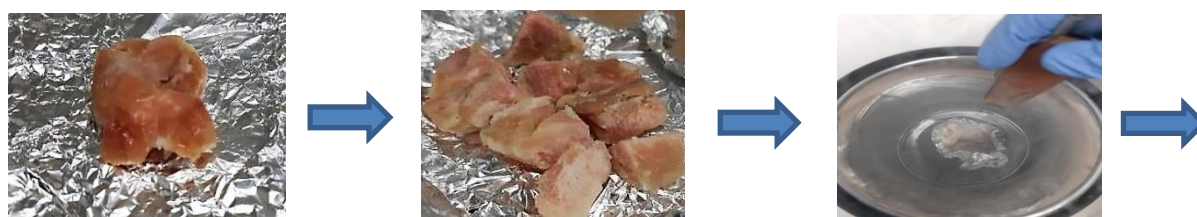
**Πίνακας 2.1** Σημεία δειγματοληψίας ιστού από μπούτι κοτόπουλου συντηρημένο στους 0°C, 5°C, και 10°C

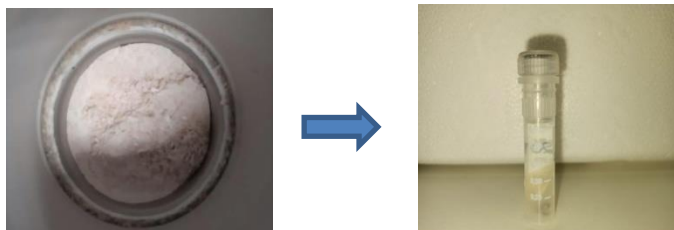
Θερμοκρασία / ώρες συντήρησης	0°C	10°C	15°C
Σημείο 1	0	0	0
Σημείο 2	48	24	24
Σημείο 3	120	48	72
Σημείο 4	168	96	120
Σημείο 5	384	120	168
Σημείο 6	432	168	
Σημείο 7		384	

### 2.2 ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα από μπούτι κοτόπουλο αφού αφαιρέθηκαν από την κατάψυξη, κόπηκαν σε μικρότερα κομμάτια, εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο και αλέστηκαν σε μύλο ξηρής άλεσης. Έπειτα, ζυγίστηκε ποσότητα περίπου 100 mg ( $\pm 0,1$ mg) σε φιαλίδια Eppendorf των 2 mL με βιδωτό πόμα στα οποία είχαν προστεθεί δύο ανοξείδωτα σφαιρίδια (διαμέτρου 2,5mm) και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20°C μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

*Σχηματική περιγραφή της ομογενοποίησης ιστού κοτόπουλου*





### 2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ GC/MS

#### Υλικά – Σκεύη

- Φιαλίδια Eppendorf (2 mL) με βιδωτό πώμα και o-ring
- Σφαιρίδια από ανοξείδωτο ατσάλι, διαμέτρου 2,5 mm
- Δοχείο με ξηρό πάγο
- Μηχανικές πιπέτες (1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 20 $\mu$ 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 δευτεριωμένης γλυκίνης (Glycine-d5), 98 atom % D , SIGMA-ALDRICH) συγκέντρωσης 3 mg/mL, ως εσωτερικό πρότυπο
- Μεθανόλη, CH<sub>3</sub>OH  $\geq$  99,8%, Honeywell
- Απεσταγμένο νερό
- Χλωροφόρμιο, CHCl<sub>3</sub> 99,0-99,4% (GC), SIGMA-ALDRICH
- Πυριδίνη, άνυδρη 99,5%, ACROS ORGANICS
- Υδροχλωρική μεθοξυαμίνη, 98+ %, ACROS ORGANICS

- N-Μεθυλο-N-(τριμεθυλοσιλυλο)-τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA), 97%, ALFA AESAR

### 2.3.1 Προπαρασκευή Δειγμάτων – Πειραματική Πορεία

Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα Χλωροφόρμιο/Μεθανόλη ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH 1:1 v/v), το οποίο τοποθετήθηκε σε γυάλινη φιάλη Duran. Το μίγμα απαερώθηκε για 5 λεπτά με αέριο  $\text{N}_2$  και ψύχθηκε στους  $-18^\circ\text{C}$ . Έπειτα, έγινε προετοιμασία εσωτερικού προτύπου Glycine – d5 (IS). Για το διάλυμα παρακαταθήκης δευτεριωμένης γλυκίνης (3 mg/mL) ζυγίστηκαν 0,03 g Glycine – d5 σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, έγινε προσθήκη ποσότητας νερού και ανακίνηση για διαλυτοποίηση και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με νερό.

### 2.3.2 Πορεία Εκχύλισης

Σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια παραμονής, τα δείγματα τοποθετούνται σε παγόλουτρο ( $<0^\circ\text{C}$ ) με προσθήκη NaCl)

Σε φιαλίδιο Eppendorf (2 mL) με βιδωτό πώμα που περιέχει περίπου 100 mg δείγματος και 2 μεταλλικά σφαιρίδια 2,5 mm, γίνεται προσθήκη 800  $\mu\text{L}$  μίγματος  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1 v/v) και 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος εργασίας IS (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Το παραπάνω βήμα εκτελείται και σε ένα άδειο Eppendorf (χωρίς δείγμα) κάθε ημέρα προετοιμασίας δειγμάτων, το οποίο χρησιμεύει ως δείγμα λευκού προσδιορισμού της μεθόδου (Method Blank). Για κάθε αλληλουχία δειγμάτων, προετοιμάζονται και δείγματα ελέγχου QC. Έπειτα ακολούθησε τοποθέτηση των φιαλιδίων ανά 8-άδες στον υποδοχέα του ομογενοποιητή Beat Beater και έγινε ομογενοποίηση για 2 min σε ένταση 3. Τα ομογενοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν στο παγόλουτρο και έγινε επανάληψη της διαδικασίας για την επόμενη 8-άδα δειγμάτων, μέχρι ολοκλήρωσης όλων των δειγμάτων (περίπου 40 ανά ημέρα εργασίας). Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε φιαλίδιο 400  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , ανάδευση στον κυκλοαναμεικτη για 10 s και σε περιστροφικό αναδευτήρα για 5 min. Τα δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια είναι τοποθετημένα σε παγόλουτρο. Έπειτα έγινε φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 10.000 rpm επί 5 min για διαχωρισμό των δυο φάσεων (υδατική-χλωροφορμική) και έγινε παραλαβή 100  $\mu\text{L}$  από την υπερκείμενη φάση (πολική φάση – μίγμα μεθανόλης/νερού) με πιπέττα, με προσοχή ώστε να μην ληφθεί η κατώτερη στιβάδα (χλωροφορμική και ιστός). Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο eppendorf. Επίσης, γίνεται παραλαβή άλλων 100  $\mu\text{L}$  από την υπερκείμενη φάση σε σωλήνα Falcon (15 mL) προκειμένου να παρασκευαστεί το ενοποιημένο δείγμα ελέγχου (QC). Σε αυτόν τον σωλήνα προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  από κάθε εκχύλισμα δείγματος. Τα φιαλίδια που περιέχουν τις δυο φάσεις φυλάσσονται στην κατάψυξη. Τα φιαλίδια του περιέχουν τα 100  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος παραμένουν στην κατάψυξη για 15-20 min. Κατόπιν, αντικαθίσταται το πώμα με άλλο που φέρει οπή και τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλίωσης για 18 h προς εκδίωξη των διαλυτών. Τέλος, αφού παραληφθούν τα φιαλίδια από τη λυοφιλίωση γίνεται







### 2.3.3 Ενοποιημένο Δείγμα Έλεγχου (Qc-Pooled Sample)

Πριν την παραγωγοποίηση και αφού ολοκληρωθεί η εκχύλιση όλων των δειγμάτων λαμβάνονται 100  $\mu\text{L}$  από το κάθε εκχύλισμα πολικών μεταβολιτών και μεταφέρονται σε ένα φιαλίδιο Falcon. Το Falcon αυτό περιέχει εκχύλισμα από το κάθε δείγμα που μελετήθηκε. Από το συγκεκριμένο Falcon λαμβάνονται 100  $\mu\text{L}$  και μεταφέρονται σε καθαρά Eppendorf τα οποία αποθηκεύονται στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και υφίστανται την πορεία της λυοφιλίωσης και παραγωγοποίησης παράλληλα με κάθε παρτίδα δειγμάτων.

Σύμφωνα με τους Dunn et al. (2011), τα δείγματα QC είναι αντιπροσωπευτικά των δειγμάτων που αναλύονται και χρησιμοποιούνται σε όλα τα βήματα της αναλυτικής διαδικασίας ώστε να γίνεται έλεγχος της ποιότητας της. Τα δείγματα QC παρέχουν ένα μέτρο της επαναληψιμότητας εντός μιας αναλυτικής παρτίδας και επιτρέπουν την ανίχνευση και αφαίρεση μεταβολιτών με  $\text{RSD}\% > 30\%$ .

### 2.3.4 Παραγωγοποίηση (Derivatization)

#### Προετοιμασία δ/τος δεικτών κατακράτησης

- Διάλυμα παρακαταθήκης δεικτών κατακράτησης – RI (κανονικά αλκάνια C8-C40): 3  $\text{mg}/\text{mL}$  in Hexane
- Διάλυμα εργασίας RI: αραιώση 1  $\text{mL}$  από το δ/μα παρακαταθήκης RI σε ογκομετρική φιάλη των 10  $\text{mL}$ . Συμπλήρωση μέχρι την χαραγή με πυριδίνη. Η τελική συγκέντρωση είναι 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### Πορεία παραγωγοποίησης

Τα λυοφιλωμένα δείγματα αφαιρούνται από την κατάψυξη ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου τουλάχιστον για 15 min πριν αφαιρεθεί το πάωμα. Σε διαφορετική περίπτωση, θα συμπυκνωθεί νερό στο εσωτερικό των φιαλιδίων και θα αδρανοποιηθούν τα

αντιδραστήρια παραγωγοποίησης. Έπειτα προστίθενται 30  $\mu\text{L}$  δ/τος MeOX (υδροχλωρικής μεθοξυαμίνης 20 mg/mL σε πυριδίνη) σε κάθε δείγμα (QC, sample, method blank), και αμέσως κλείνεται το πώμα και ακολουθούν τα επόμενα δείγματα. Ετοιμάζεται επίσης και ένα λευκό δείγμα παραγωγοποίησης (derivatization reagent blank) χρησιμοποιώντας ένα κενό φιαλίδιο. Τα δείγματα τοποθετούνται στον περιστροφικό αναδευτήρα για 90 min στους 30<sup>ο</sup> C (σε θερμοθάλαμο με ήπια ανάδευση). Γίνεται φυγοκέντρηση στα δείγματα για 15 s στις 12.000 rpm. Προστίθενται 70  $\mu\text{L}$  MSTFA (αντιδραστήριο σιλυλίωσης) σε κάθε δείγμα, και αμέσως κλείνεται το πώμα μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου. Τα δείγματα τοποθετούνται στον περιστροφικό αναδευτήρα για 30 min στους 37<sup>ο</sup>C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 s στις 12.000 rpm και αφού αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (5 min), προστίθενται σε κάθε φιαλίδιο 20  $\mu\text{L}$  δ/τος εργασίας RI (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), πωματίζονται και αναδεύονται σε κυκλοαναμείκτη. Έπειτα γίνεται μεταφορά 100  $\mu\text{L}$  από το περιεχόμενο σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη που φέρουν κωνικά micro-inserts (των 200  $\mu\text{L}$ ) και πώμα με ελαστικό παρέμβυσμα από τεφλόν. Τέλος, πριν την 1η ένεση στο GC-MS τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 2 ώρες.

### 2.3.5 Προετοιμασία Εξωτερικών Προτύπων Αναφοράς

#### Υλικά

H<sub>2</sub>O GC-MS  
Μεθανόλη GC-MS  
Ισοπροπανόλη GC-MS  
Χλωροφόρμιο GC-MS  
Εξωτερικά πρότυπα αναφοράς (Πίνακας 2.2)  
Γραμμή αερίου αζώτου  
25 και 250 ml ογκομετρικές φιάλες  
Προετοιμασία εξωτερικού προτύπου αναφοράς

#### Δ/μα Παρακαταθήκης

1. Προετοιμασία 500 mL διαλύματος A, με σύσταση νερό/μεθανόλη/ισοπροπανόλη 2:5:2 (v/v/v). Πριν την χρησιμοποίησή του, το δ/μα απαερώνεται με διαβίβαση αερίου αζώτου για 5 λεπτά.
2. Ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό η απαραίτητη ποσότητα από κάθε πρότυπη ουσία σε ξεχωριστά γυάλινα φιαλίδια των 2 mL. Προστίθεται ο κατάλληλος διαλύτης (1-1,5 mL), σύμφωνα με τον Πίνακα 2.2.
3. Το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με διάλυμα A.

**Για το ασπαρτικό οξύ**

προστίθενται 20 ml από το διάλυμα Α και ακολουθεί προσθήκη ανά 5  $\mu\text{L}$  δ/τος 2M NaOH μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή του (απουσία κρυστάλλων).

**Για το γλουταμινικό οξύ:** Γίνεται προσθήκη 10 ml από το διάλυμα Α (τελική συγκέντρωση 1 mg/ml)

Για τις υπόλοιπες ουσίες: Γίνεται προσθήκη 1-1,5 ml από τα διαλύματα όπως φαίνονται στον **πίνακα 2.2** τελικής συγκέντρωσης (**6.7-10 mg/ml**)

**Πίνακας 2.2** Ουσίες για παρασκευή εξωτερικών προτύπων

Ουσία	Διαλύτης	Μάζα ουσίας (mg)
Sucrose	Water	10
Citric Acid	Water	10
Alanine	Water	10
Valine	Water	10
Serine	Water	10
Methionine	Water	20
Aspartic Acid	Solution A	25 σε 25 ml
Salicylic Acid	Solution A	10
Glutamic Acid	Solution A	10 σε 10ml
Lysine	Water	10
D-(+)-Glucose	Water	10
Chlorogenic Acid	Methanol	10
Fructose	Water	10
Succinic Acid	Water	10
Oxalic Acid	Water	10
Xylose	Water	10
Gallic Acid	Solution A	10
Tartaric	Water	10
D- glucuronic	Water	10 σε 1ml

### 2.3.6 Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών

Ο προσδιορισμός των παραγώγων των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών Shimadzu GCMS QP-2010 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  $\mu\text{L}$ . Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη διαχωρισμού MEGA-5HT (30 x 0,25 mm, df 0,25  $\mu\text{m}$ ). Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με σταθερή γραμμική ταχύτητα 36 cm/s. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου παρουσιάζεται παρακάτω.

Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων και της γραμμής μεταφοράς ήταν 250°C 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 με το πρόγραμμα AMDIS χρησιμοποιώντας ως βιβλιοθήκη το NIST όπως περιγράφεται παρακάτω στον πίνακα 3.1.

### **2.3.7 Στατιστική επεξεργασία**

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 4.0 και περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΠΡΟ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα δεδομένα που προέκυψαν από το GC/MS επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος MS-Dial (Tsugawa et.al., 2015). Το λογισμικό αυτό δίνει τη δυνατότητα να μετατραπούν τα αρχικά μη επεξεργασμένα αρχεία (raw data) σε δεδομένα που μπορούν να επεξεργαστούν στατιστικά. Αυτό πραγματοποιείται μέσω του διαγράμματος ροής για μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση που παρέχει το συγκεκριμένο πρόγραμμα.

Το πρώτο βήμα στο MS-DIAL είναι η μετατροπή των αρχείων του προγράμματος Shimadzu σε αρχεία (\*.ABF) που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα MS-Dial. Μετά την επεξεργασία των δεδομένων που περιλαμβάνει α) την επιλογή κορυφών, β) την αποσυνέλιξη των φασμάτων (deconvolution) η οποία πραγματοποιείται με σκοπό να διαχωριστούν οι κορυφές που συνεκλούνται και εμφανίζονται ως μία κορυφή, γ) την αναγνώριση ουσιών, δ) την ταυτοποίηση των κορυφών χρησιμοποιώντας τους δείκτες κατακράτησης (RI) και της ομοιότητας των φασμάτων μάζας μέσω βιβλιοθηκών, ε) την ευθυγράμμιση των κορυφών (Peak alignment).

Από την παραπάνω επεξεργασία προκύπτει ένας πίνακας όπου οι οριζόντιες γραμμές αντιστοιχούν στα δείγματα και οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στα ύψη των κορυφών κάθε μεταβολίτη που ανιχνεύτηκε σε κάθε δείγμα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dunn et al.,(2011) είναι απαραίτητη μια προ επεξεργασία των δεδομένων του πίνακα ώστε να ακολουθήσει η κυρίως στατιστική επεξεργασία με τη βοήθεια της online πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0 .

Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο:

- Αρχικά γίνεται αφαίρεση των μεταβολιτών που εμφανίστηκαν σε λιγότερο από 50% των QC δειγμάτων.
- Έπειτα γίνεται αφαίρεση ουσιών οι οποίες προέρχονται από τα αντιδραστήρια και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ουσίες που έχουν προκύψει από την παραγωγοποίηση (artifacts). Καθώς επίσης και ουσίες των οποίων το ύψος τους (σήμα) ήταν χαμηλό.
- Παράλληλα, αθροίζονται τα ύψη των πολλαπλών παραγώγων συγκεκριμένων ουσιών (π.χ. σάκχαρα, αμινοξέα).
- Επόμενο βήμα είναι η κανονικοποίηση (normalization). Το ύψος των κορυφών των μεταβολιτών διαιρέθηκε με την αντίστοιχη μάζα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκχύλιση του ιστού. Επίσης έγινε κανονικοποίηση ως προς τα δείγματα QC με χρήση του λογισμικού LOWESS.
- Καταλήγοντας υπολογίζεται η σχετική τυπική απόκλιση όλων των μεταβολιτών τα δείγματα QC και αφαιρούνται οι μεταβολίτες που έχουν RSD% > 30%.

Από τα παραπάνω προέκυψε ένας πίνακας 70 γραμμών (μεταβολίτες) και 83 στηλών (δείγματα). Οι ουσίες αυτές περιλαμβάνουν υδατάνθρακες, αμινοξέα, οργανικά και λιπαρά οξέα και άλλους μεταβολίτες.

### 3.2 ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΣΕΙΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Τα παραπάνω δεδομένα που συλλέχθηκαν, επεξεργάστηκαν έπειτα με τη βοήθεια της online πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0. Στη συγκεκριμένη πλατφόρμα αρχικά έγινε επιλογή των δειγμάτων προς ανάλυση, αφαίρεση του εσωτερικού προτύπου για να μην συμπεριληφθεί στην ανάλυση και ακολούθησαν λογαρίθμηση και μετασχηματισμός pareto scaling. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση τη θερμοκρασία συντήρησης τους (0°C, 5°C, 10°C). Το σημείο 0 αφορά το αρχικό δείγμα που παραλήφθηκε από τη βιομηχανία.

#### 3.2.1 Μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 0 °C

Τα δείγματα από το μπούτι κοτόπουλο στους 0°C συλλέχθηκαν σε διαφορετικό χρονικό διάστημα και ταξινομήθηκαν σε κλάσεις όπως προκύπτει και από τον πίνακα 3.1:

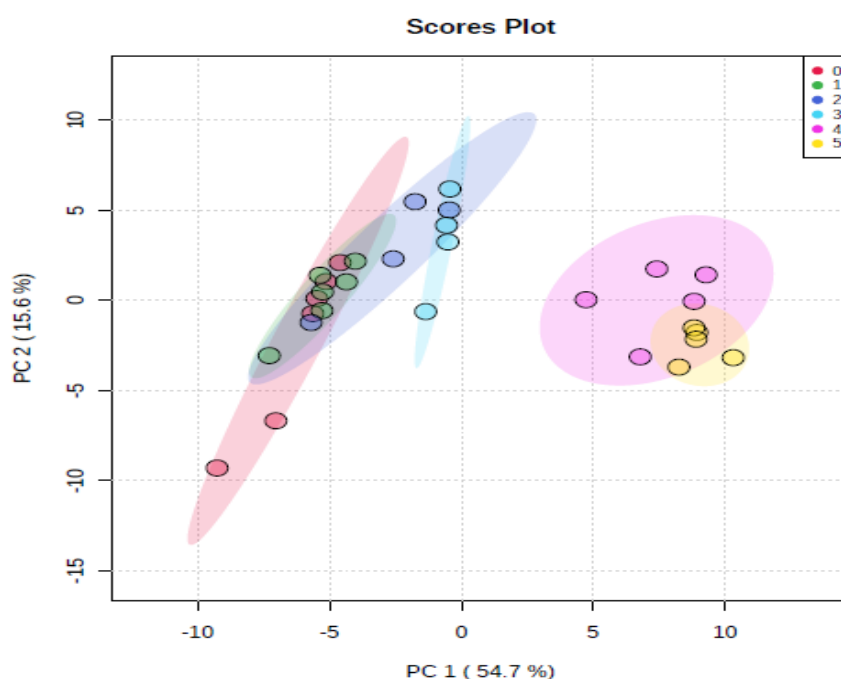
**Πίνακας 3.1:** Κλάσεις σε μπούτι κοτόπουλο σε σχέση με τις ώρες συντήρησης στους 0°C

Κλάσεις	Σημεία δειγματοληψίας (ώρες συντήρησης)
0	0
1	24
2	48
3	120
4	168
5	240
6	288
7	384
8	432

Στα δεδομένα αρχικά έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3.1. Από τη συγκεκριμένη ανάλυση προκύπτει ότι η 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα επεξηγεί το 54,7% της διασποράς συναρτήσει της δεύτερης συνιστώσας η οποία εξηγεί το 15,6%. Οι δυο πρώτες συνιστώσες από τη συγκεκριμένη ανάλυση επεξηγούν το 70,3% της συνολικής διακύμανσης των αρχικών δεδομένων (X), χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατηγορία-κλάση (Y) στην οποία ανήκουν. Η πρώτη συνιστώσα που αντιπροσωπεύει το 54,7% της μεταβλητότητας δίνει την καλύτερη ομαδοποίηση όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.1.

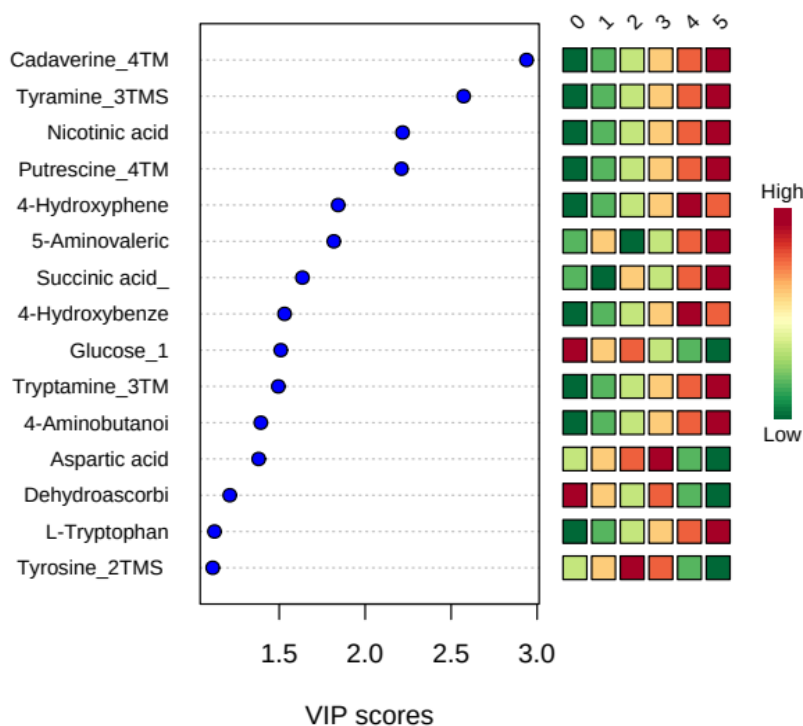
Παρατηρείται ότι σχηματίζονται κυρίως δυο περιοχές. Η μία περιοχή περιλαμβάνει τα δείγματα που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης: 0, 48, 120 έως 168 ώρες

συντήρησης που αντιστοιχούν στις κλάσεις 0-1-2-3 (κόκκινο, πράσινο, μπλε, γαλάζιο) που έχουν έναν κύριο διαχωρισμό με βάση τους μεταβολίτες τους και η δεύτερη περιοχή : 384 και 432 ώρες συντήρησης που αντιστοιχούν στις κλάσεις 4 και 5 (ροζ, κίτρινο) περιλαμβάνει τα δείγματα που ήταν πάρα πολύ αλλοιωμένα, ο βαθμός αλλοίωσης των δειγμάτων προήλθε από μικροβιολογικά δεδομένα που προήλθαν από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης, φαίνεται ότι η συνιστώσα PC1 (οριζόντιος άξονας) περιγράφει το χρόνο συντήρησης και πιο συγκεκριμένα την αλλοίωση η οποία επέρχεται καθώς προχωράμε από αριστερά προς τα δεξιά στον άξονα. Η PCA είναι εξαιρετικά χρήσιμη στην ομαδοποίηση (intrinsic) εσωτερικών δειγμάτων, πράγμα το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την αναγνώριση παρόμοιων βιολογικών χαρακτηριστικών εντός ομαδοποιημένων δειγμάτων (Kemsley et al., 2007)



**Διάγραμμα 3.1** Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (Scoresplot) για τη συντήρηση του μπουτιού κοτόπουλου στους 0°C. Οι κλάσεις 0,1,2,3,4,5 περιγράφονται στον Πίνακα 3.1. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

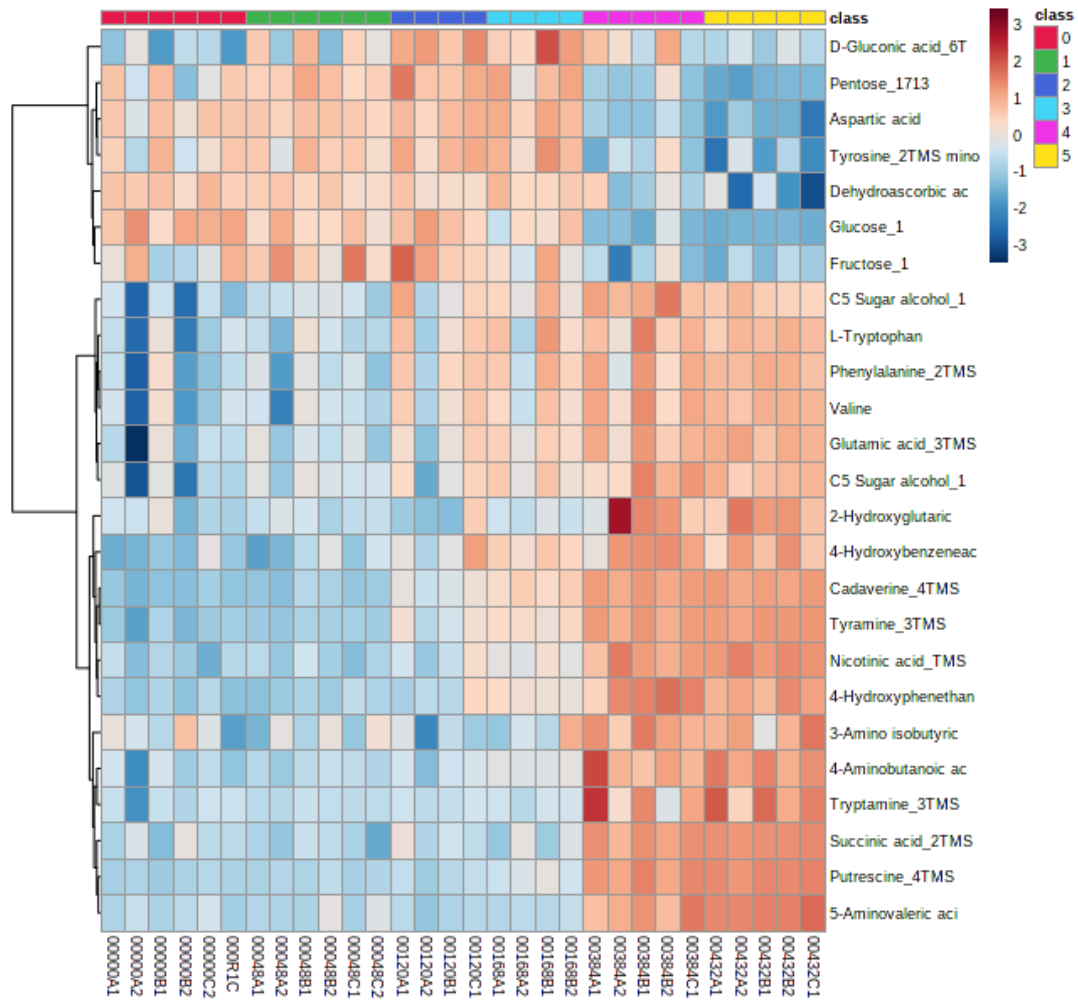
Έπειτα, στο διάγραμμα 3.2 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι 15 σημαντικότεροι μεταβολίτες, αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA, χρησιμοποιώντας τα VIP Scores (Variable Importance for Prediction). Στη συγκεκριμένη περίπτωση όσο πιο μεγάλο είναι το VIP Score τόσο πιο πολύ συνεισφέρει η ουσία στο μοντέλο. Για παράδειγμα, η καδαβερίνη, η οποία από πράσινη γίνεται κόκκινη (αυξάνεται η συγκέντρωσή της), από το σημείο 0 στο σημείο 5, παρατήρηση η οποία επιβεβαιώνεται και από την PCA.



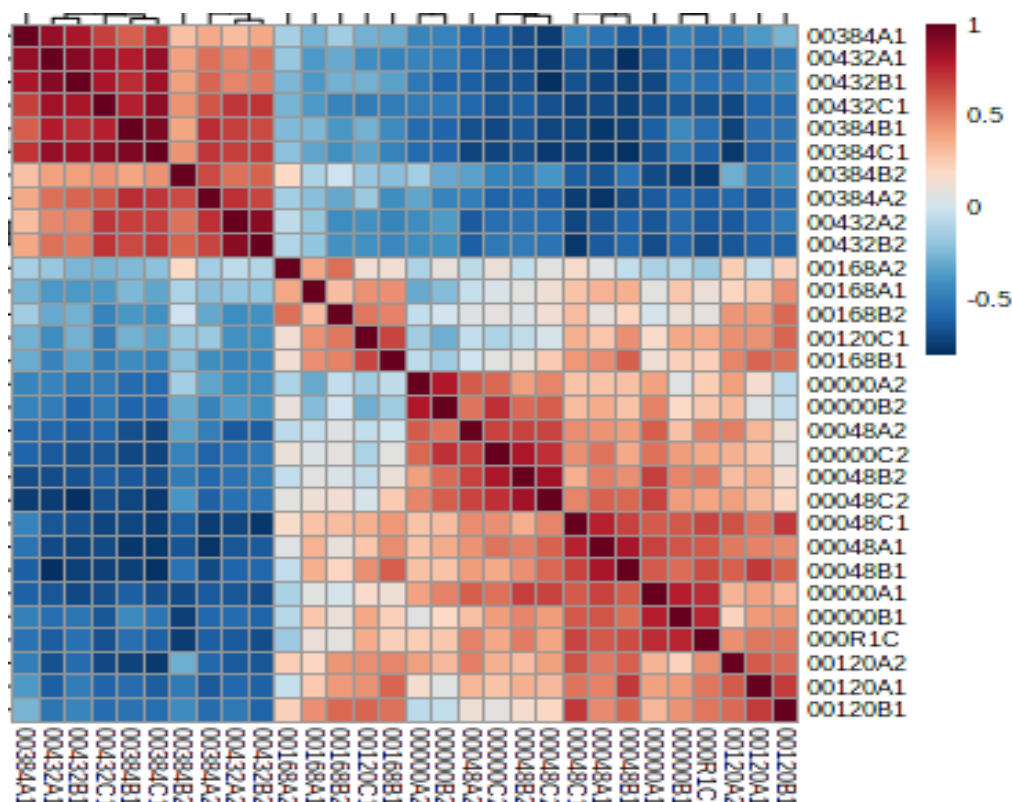
**Διάγραμμα 3.2:** Απεικόνιση των 15 σημαντικότερων μεταβολιτών στους 0°C όπως προκύπτουν από το μοντέλο PLS-DA . Τα έγχρωμα κελιά στη δεξιά στήλη δείχνουν τη σχετική συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κλάση. Οι κλάσεις (0, 1, 2, 3, 4, 5) υποδηλώνουν τις ώρες συντήρησης όπως περιγράφονται στον πίνακα 3.1.

Σημαντικό εργαλείο για την εύκολη απεικόνιση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων αποτελεί η χρήση των θερμικών χαρτών «Heatmaps» της ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Clustering Analysis) διάγραμμα 3.3. Μέσω των Heatmaps δημιουργούνται συστάδες δειγμάτων και μεταβολιτών. Παρατηρείται μια αλλαγή στο χρώμα από κόκκινο σε γαλάζιο και αντίστροφα. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η υψηλότερη συγκέντρωση και με γαλάζιο χρώμα η χαμηλότερη συγκέντρωση του μεταβολίτη. Στο Διάγραμμα 3.3 απεικονίζεται η μεταβολή των κυριότερων μεταβολιτών όπως προέκυψαν από τα VIP Scores με βάση τις ώρες συντήρησης των δειγμάτων. Οι πρώτες 7 ενώσεις (D-Gluconicacid\_6T έως Fructose\_1) που περιλαμβάνουν σάκχαρα και αμινοξέα προχωρώντας από την κλάση 0 στην κλάση 5 εμφανίζουν αυξανόμενη ένταση καθώς προχωράει η αλλοίωση. Διαπιστώνεται ότι το ασπαρτικό οξύ μειώνεται καθώς περνάει η συντήρηση, όπως και κάποια σάκχαρα όπως η πεντόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Αντίθετα, κάποια αμινοξέα όπως η βαλίνη και κάποιες βιογενείς αμίνες όπως η καδαβερίνη αυξάνονται με την αύξηση του χρόνου συντήρησης.





**Διάγραμμα 3.3:** Θερμικός χάρτης (Heatmap) αποτελεσμάτων της HCA όπως προέκυψε από τα VIP Scores όπου απεικονίζονται οι μεταβολές των σημαντικότερων μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων των δειγμάτων (0-5), όπως περιγράφονται στον πίνακα 3.1. Τα δυο πρώτα ψηφία του κωδικού κάθε δείγματος περιγράφουν τη θερμοκρασία συντήρησης, τα επόμενα τρία ψηφία περιγράφουν τις ώρες συντήρησης και τα γράμματα περιγράφουν τις βιολογικές επαναλήψεις. 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.



**Διάγραμμα 3.4:** Θερμικός χάρτης (Heatmap) απεικόνισης της συσχέτισης μεταξύ των δειγμάτων Η κλίμακα χρώματος αντιπροσωπεύει τους συντελεστές συσχέτισης όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson  $r$ . Τα δυο πρώτα ψηφία του κωδικού κάθε δείγματος περιγράφουν τη θερμοκρασία συντήρησης, τα επόμενα τρία ψηφία περιγράφουν τις ώρες συντήρησης και τα γράμματα περιγράφουν τις βιολογικές επαναλήψεις. Τα έγχρωμα κελιά του χάρτη αντιστοιχούν στην σχετική αφθονία κάθε μεταβολίτη. Με κόκκινο και μπλε απεικονίζεται η θετική και η αρνητική συσχέτιση, αντίστοιχα.

Η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων απεικονίζεται στο διάγραμμα 3.4. Δείγματα με θετική συσχέτιση απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ δείγματα με αρνητική συσχέτιση απεικονίζονται με μπλε χρώμα. Θετική συσχέτιση σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η μία ουσία αυξάνεται και η άλλη ουσία και αντίστοιχα αρνητική συσχέτιση σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η μία ουσία μειώνεται η άλλη ουσία. Πιο συγκεκριμένα, στον άξονα των  $y$  συσχετίζονται θετικά από 0 ώρες έως 120 με 168 ώρες και από 384 έως 432 ώρες συσχετίζονται αρνητικά. Αυτό σημαίνει ότι οι μεγάλες ώρες συντήρησης 384 έως 432 συσχετίζονται μεταξύ τους και αντίθετα από τα υπόλοιπα σημεία. Στις ώρες από 0 έως 168 έχουν πιο κοντινή χημική σύσταση τα σημεία μεταξύ τους.

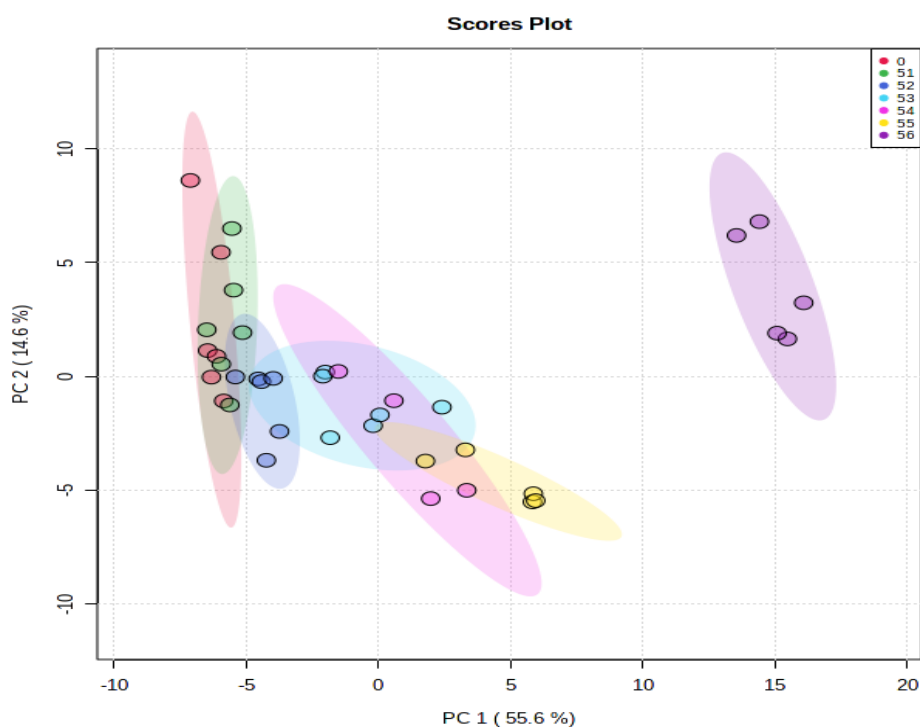
### 3.2.2 Μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 5 °C

Τα δείγματα από το μπούτι κοτόπουλο στους 5°C συλλέχθηκαν σε διαφορετικό χρονικό διάστημα και ταξινομήθηκαν σε κλάσεις όπως προκύπτει και από τον πίνακα 3.2

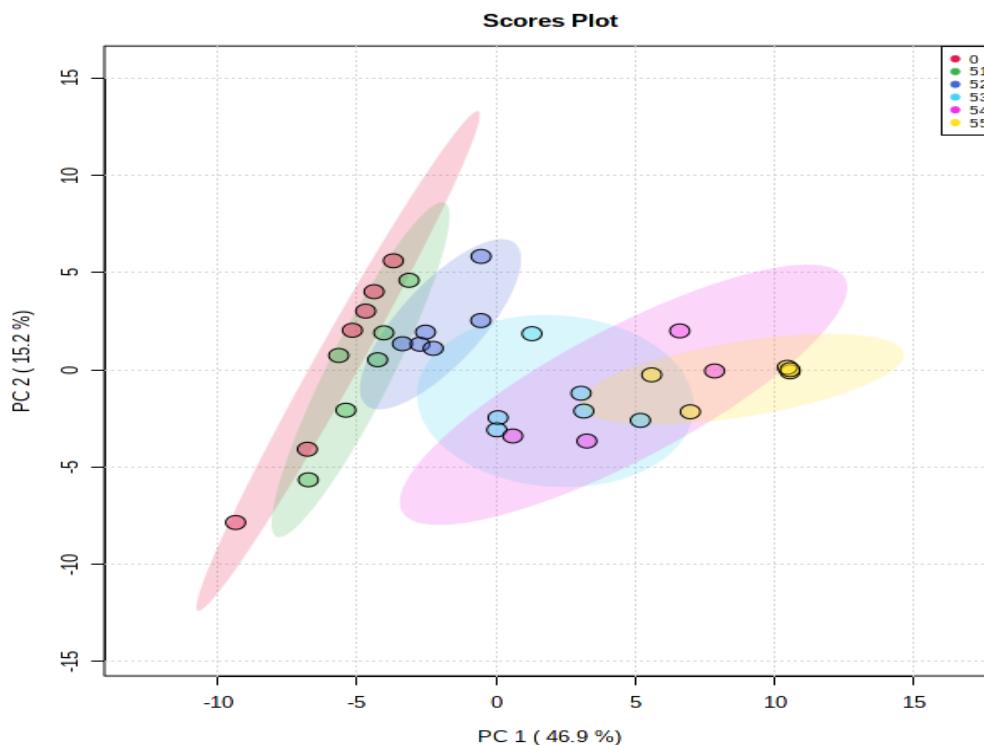
**Πίνακας 3.2 :**Κλάσεις σε μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 5°C

Κλάσεις	Σημεία δειγματοληψίας (ώρες συντήρησης)
0	0
51	24
52	48
53	96
54	120
55	168
56	384

Στα δεδομένα αρχικά έγινε ανάλυση με τη χρήση των κύριων συνιστωσών (PCA) όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3.5. Από τη συγκεκριμένη επεξεργασία προκύπτει ότι η 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα εξηγεί το 55,6% της διασποράς συναρτήσει της 2<sup>ης</sup> συνιστώσας η οποία εξηγεί το 14,6 %. Παρατηρείται ότι δημιουργούνται 2 περιοχές, οι πρώτες 6 κλάσεις (0,51,52,53,54,55) είναι ομαδοποιημένες και διαχωρίζονται σημαντικά από την 7<sup>η</sup> κλάση (56). Δεδομένου ότι τα δείγματα που ανήκουν στην 7<sup>η</sup> κλάση είναι πολύ αλλοιωμένα, η συγκεκριμένη κλάση εξαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε εκ νέου ανάλυση PCA. Ο βαθμός αλλοίωσης των δειγμάτων προήλθε από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.



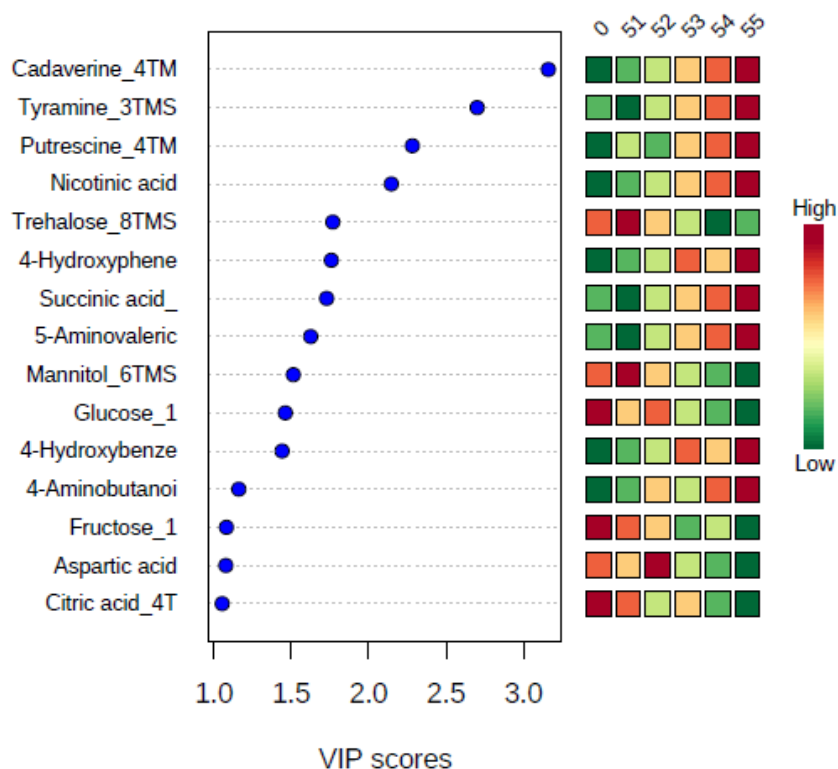
**Διάγραμμα 3.5:**Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (Scoresplot) για τη διατήρηση του μπουτιού κοτόπουλου στους 5°C. Οι κλάσεις (0,51,52,53,54,55,56) περιγράφονται στον πίνακα 3.2. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης



**Διάγραμμα 3.6:**Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (Scoresplot) για τη διατήρηση του μπουτιού κοτόπουλου στους 5°C. Οι κλάσεις (0,51,52,53,54,55) περιγράφονται στον πίνακα 3.2. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

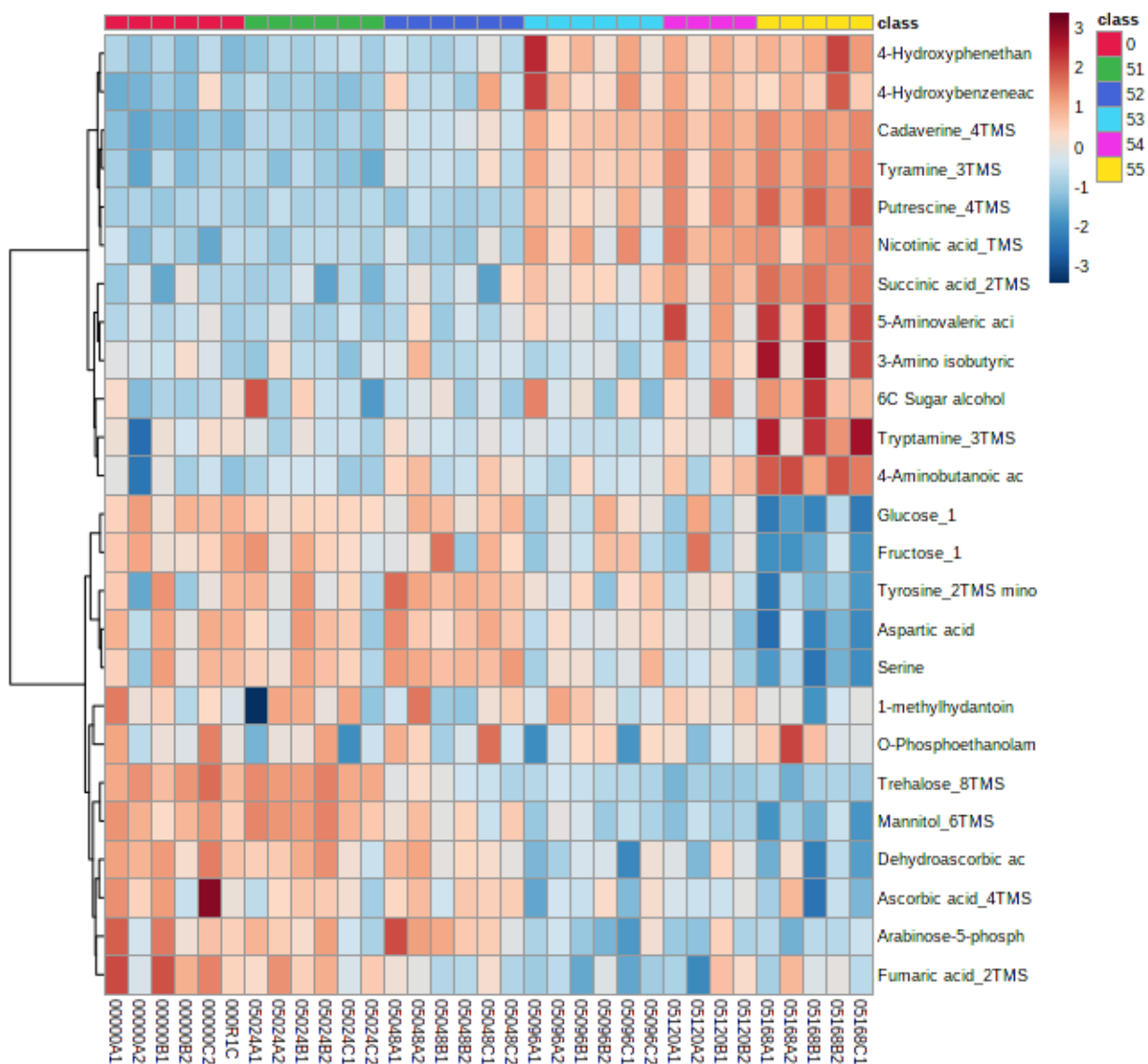
Με την αφαίρεση της κλάσης 56, προκύπτει ότι η 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα εξηγεί το 46,9% της διασποράς συναρτήσει της δεύτερης συνιστώσας η οποία εξηγεί το 15,2% (Διάγραμμα 3.6). Παρατηρείται ότι τα σημεία δειγματοληψίας έχουν ομαδοποιηθεί ικανοποιητικά σε 6 περιοχές. Επίσης, φαίνεται ότι η συνιστώσα PC1 (οριζόντιος άξονας) περιγράφει το χρόνο συντήρησης και πιο συγκεκριμένα την αλλοίωση η οποία επέρχεται καθώς προχωράμε από αριστερά προς τα δεξιά στον άξονα, επηρεάζοντας τη φρεσκότητα στο μπουτί κοτόπουλο, ο βαθμός αλλοίωσης των δειγμάτων προήλθε από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο διάγραμμα 3.7 παρουσιάζονται οι 15 σημαντικότεροι μεταβολίτες, αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA, χρησιμοποιώντας τα VIP Scores για να γίνει ο διαχωρισμός των ουσιών. Όπως και στους 0°C έτσι και στους 5 °C η ουσία η οποία συνεισφέρει περισσότερο είναι η καδαβερίνη. Σημαντικοί μεταβολίτες, είναι επίσης η τυραμίνη και η πουτρεσκίνη οι οποίες όπως και η καδαβερίνη παρουσιάζουν μία αυξητική τάση,

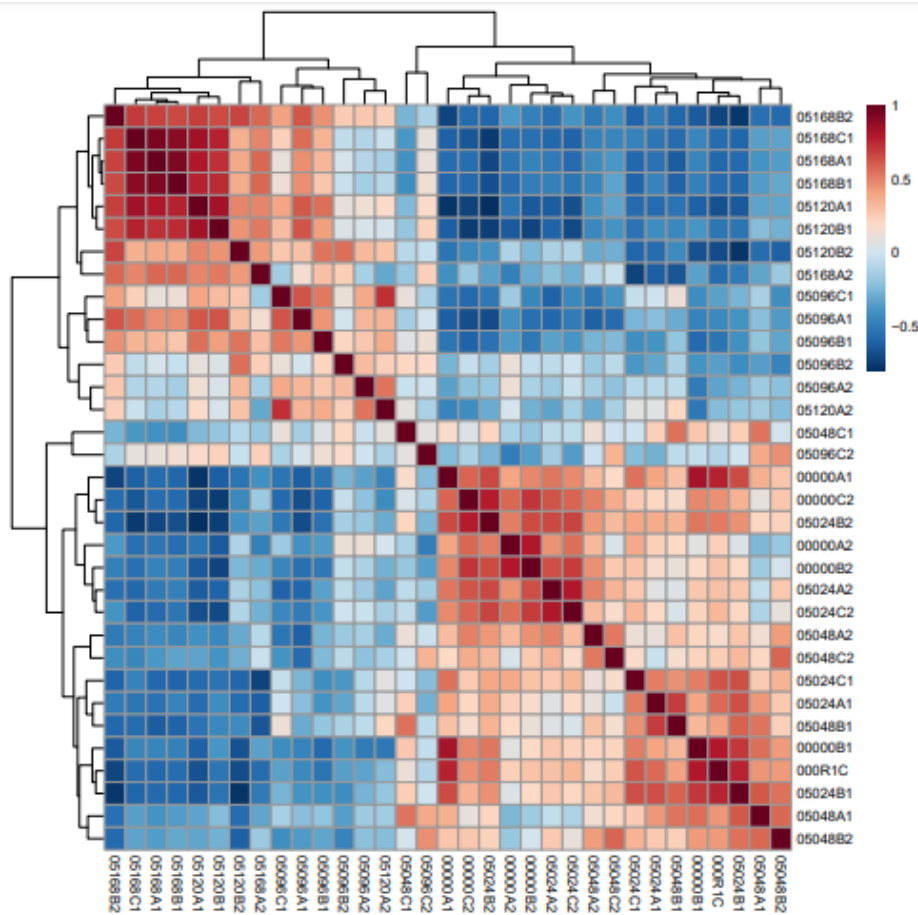


**Διάγραμμα 3.7:** Απεικόνιση των 15 σημαντικότερων μεταβολιτών στους 5°C όπως προκύπτουν από το μοντέλο PLS-DA. Οι μπάρες στη δεξιά στήλη δείχνουν τη σχετική συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κλάση. Οι κλάσεις (0,51,52,53,54,55) υποδηλώνουν τις ώρες συντήρησης όπως περιγράφονται στον πίνακα 3.2.

Σημαντικό εργαλείο για την εύκολη απεικόνιση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων αποτελεί η χρήση των θερμικών χαρτών «Heatmaps» της ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Clustering Analysis) διάγραμμα 3.8. Μέσω των Heatmaps δημιουργούνται συστάδες δειγμάτων και μεταβολιτών. Παρατηρείται μια αλλαγή στο χρώμα από κόκκινο σε γαλάζιο και αντίστροφα. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η υψηλότερη συγκέντρωση και με γαλάζιο χρώμα η χαμηλότερη συγκέντρωση του μεταβολίτη. Στο Διάγραμμα 3.8 απεικονίζεται η μεταβολή των κυριότερων μεταβολιτών όπως προέκυψαν από τα VIP Scores με βάση τις ώρες συντήρησης των δειγμάτων. Από το διάγραμμα 3.8 γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οι πρώτες 12 ενώσεις (οργανικά οξέα και βιογενείς αμίνες) καδαβερίνη, ηλεκτρικό οξύ, 4-αμινοβουτυρικό οξύ, 5-αμινοβαλερικό οξύ, τυραμίνη αυξάνονται με το χρόνο συντήρησης, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες (σάκχαρα, αμινοξέα, παράγωγα σακχάρων) γλυκόζη, φρουκτόζη, τυροσίνη, ασπαρτικό οξύ, σερίνη, μανιτόλη, φουμαρικό οξύ μειώνονται.



**Διάγραμμα 3.8 :**Θερμικός χάρτης ( Heatmap) αποτελεσμάτων της HCA όπως προέκυψε από τα VIPScores όπου απεικονίζονται οι μεταβολές των σημαντικότερων μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων των δειγμάτων (0-55), όπως παρουσιάζοντα στον πίνακα 3.2. Τα δυο πρώτα ψηφία του κωδικού κάθε δείγματος περιγράφουν τη θερμοκρασία συντήρησης, τα επόμενα τρία ψηφία περιγράφουν τις ώρες συντήρησης και τα γράμματα περιγράφουν τις βιολογικές επαναλήψεις. 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.



**Διάγραμμα 3.9:**Θερμικός χάρτης (Heatmap) απεικόνισης της συσχέτισης μεταξύ των δειγμάτων όπως προέκυψε από την ανάλυση συσχέτισης Pearson  $r$ . Τα δυο πρώτα ψηφία του κωδικού κάθε δείγματος περιγράφουν τη θερμοκρασία συντήρησης, τα επόμενα τρία ψηφία περιγράφουν τις ώρες συντήρησης και τα γράμματα περιγράφουν τις βιολογικές επαναλήψεις. Με κόκκινο και μπλε απεικονίζεται η θετική και η αρνητική συσχέτιση, αντίστοιχα.

Η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων απεικονίζεται στο διάγραμμα 3.9. Δείγματα με αρνητική συσχέτιση απεικονίζονται με γαλάζιο- μπλε χρώμα, ενώ δείγματα με θετική συσχέτιση απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα τα οποία συντηρήθηκαν από 0 – 48 ώρες (κάτω ήμισυ του κάθετου άξονα και δεξιά κάτω στον οριζόντιο άξονα) έχουν θετική συσχέτιση σε σχέση με αυτά που συντηρήθηκαν από 96 μέχρι 168 ώρες (πάνω μέρος του κάθετου ήμισυ άξονα και αριστερά του οριζόντιου) . Αντίθετα, τα δείγματα που συντηρήθηκαν από 96 – 168 ώρες (κάτω ήμισυ του κάθετου άξονα και αριστερά του οριζόντιου ) έχουν αρνητική συσχέτιση με αυτά που συντηρήθηκαν από 96- 168 ώρες (πάνω ήμισυ κάθετου άξονα και δεξιά του οριζόντιου)

### 3.2.3 Μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 10 °C

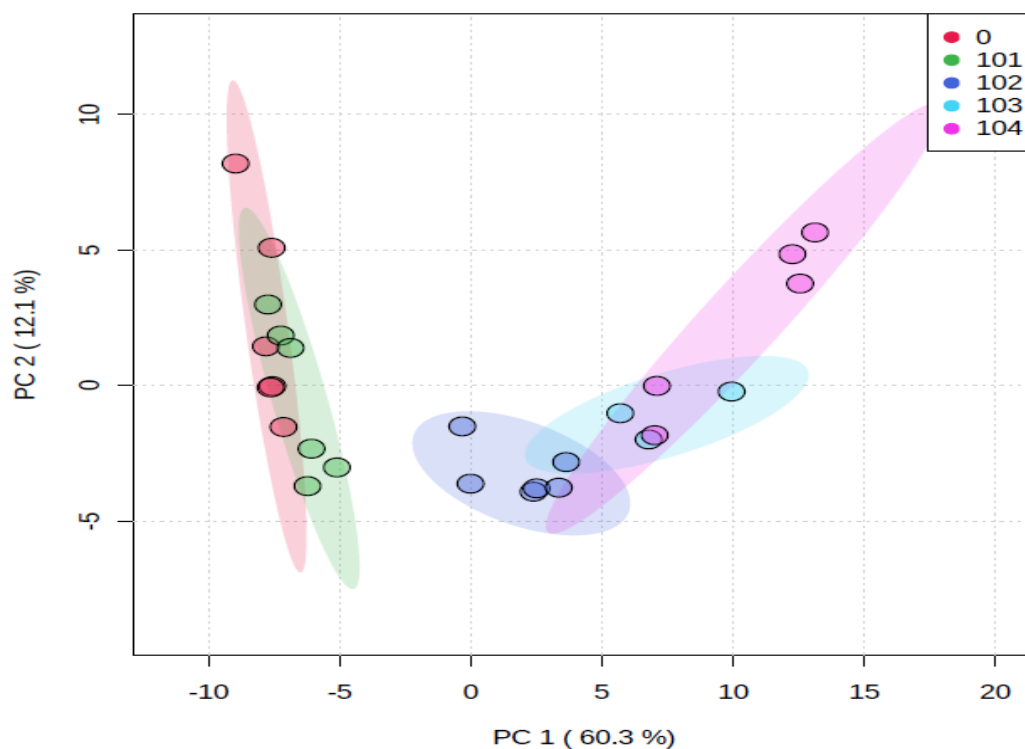
Τα δείγματα από το μπούτι κοτόπουλο στους 10°C συλλέχθηκαν σε διαφορετικό χρονικό διάστημα και ταξινομήθηκαν σε κλάσεις όπως προκύπτει στον πίνακα 3.4

**Πίνακας 3.3:** Κλάσεις σε μπούτι κοτόπουλο συντηρημένο στους 10°C

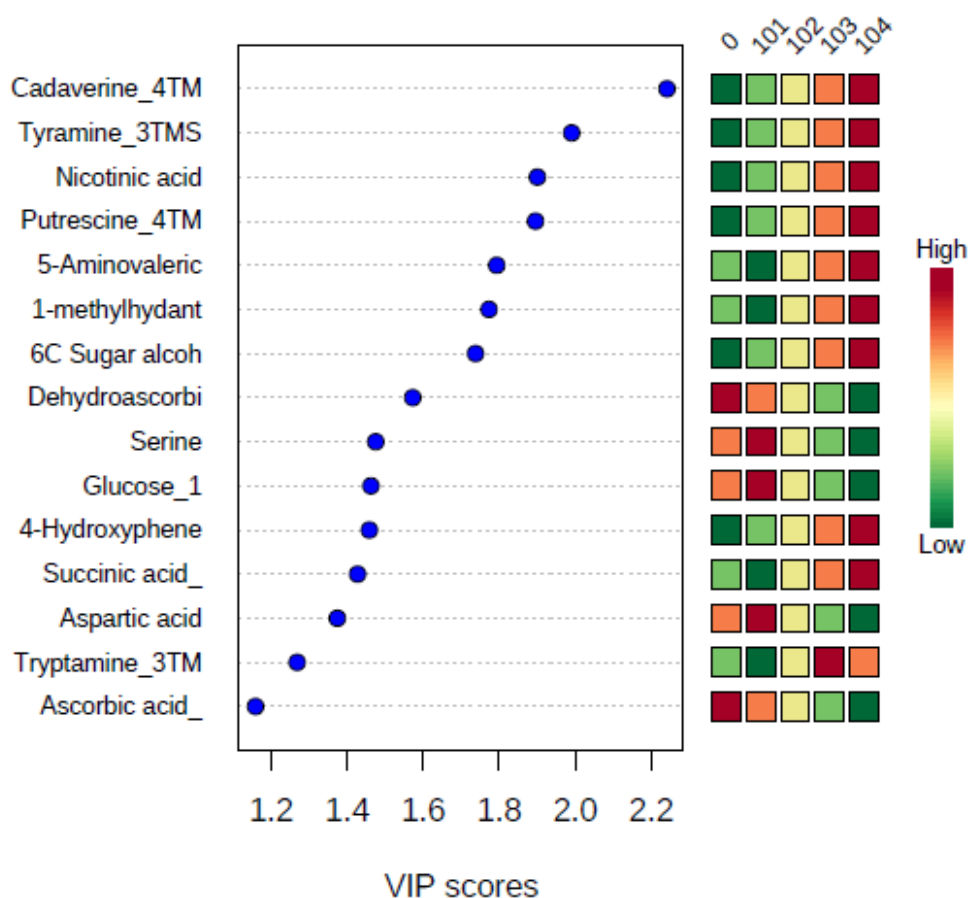
Κλάσεις	Σημεία δειγματοληψίας (ώρες συντήρησης)
0	0
101	24
102	72
103	120
104	168

Στα δεδομένα αρχικά έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.9, προκύπτει ότι η 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα επεξηγεί το 60,3% της διασποράς συναρτήσει της δεύτερης συνιστώσας η οποία επεξηγεί το 12,1%. Παρατηρείται ότι τα σημεία δειγματοληψίας έχουν ομαδοποιηθεί ικανοποιητικά σε 2 περιοχές. Η μία περιοχή είναι τα δείγματα που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης: 0 και 24 ώρες συντήρησης που αντιστοιχούν στις κλάσεις (0-101/κόκκινο, πράσινο) που έχουν έναν κύριο διαχωρισμό με βάση τους μεταβολίτες τους και η δεύτερη περιοχή: 72, 120 και 168 ώρες συντήρησης που αντιστοιχούν στις κλάσεις (102, 103 και 104/μπλε, γαλάζιο, ροζ) που περιλαμβάνει τα δείγματα που ήταν πάρα πολύ αλλοιωμένα. Η συνιστώσα PC1 (οριζόντιος άξονας) περιγράφει το χρόνο συντήρησης και πιο συγκεκριμένα την αλλοίωση η οποία επέρχεται καθώς προχωράμε από αριστερά προς τα δεξιά στον άξονα, επηρεάζοντας κυρίως τα ποιοτικά χαρακτηριστικά στο μπούτι κοτόπουλο. Ο βαθμός αλλοίωσης των δειγμάτων προήλθε από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.





**Διάγραμμα 3.9:** Γράφημα PCA (scoresplot) κύριων συνιστωσών για τη συντήρηση του μπουτιού κοτόπουλου στους 10°C. Οι κλάσεις (0,101,102,103,104) περιγράφονται στον πίνακα 3.3.Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

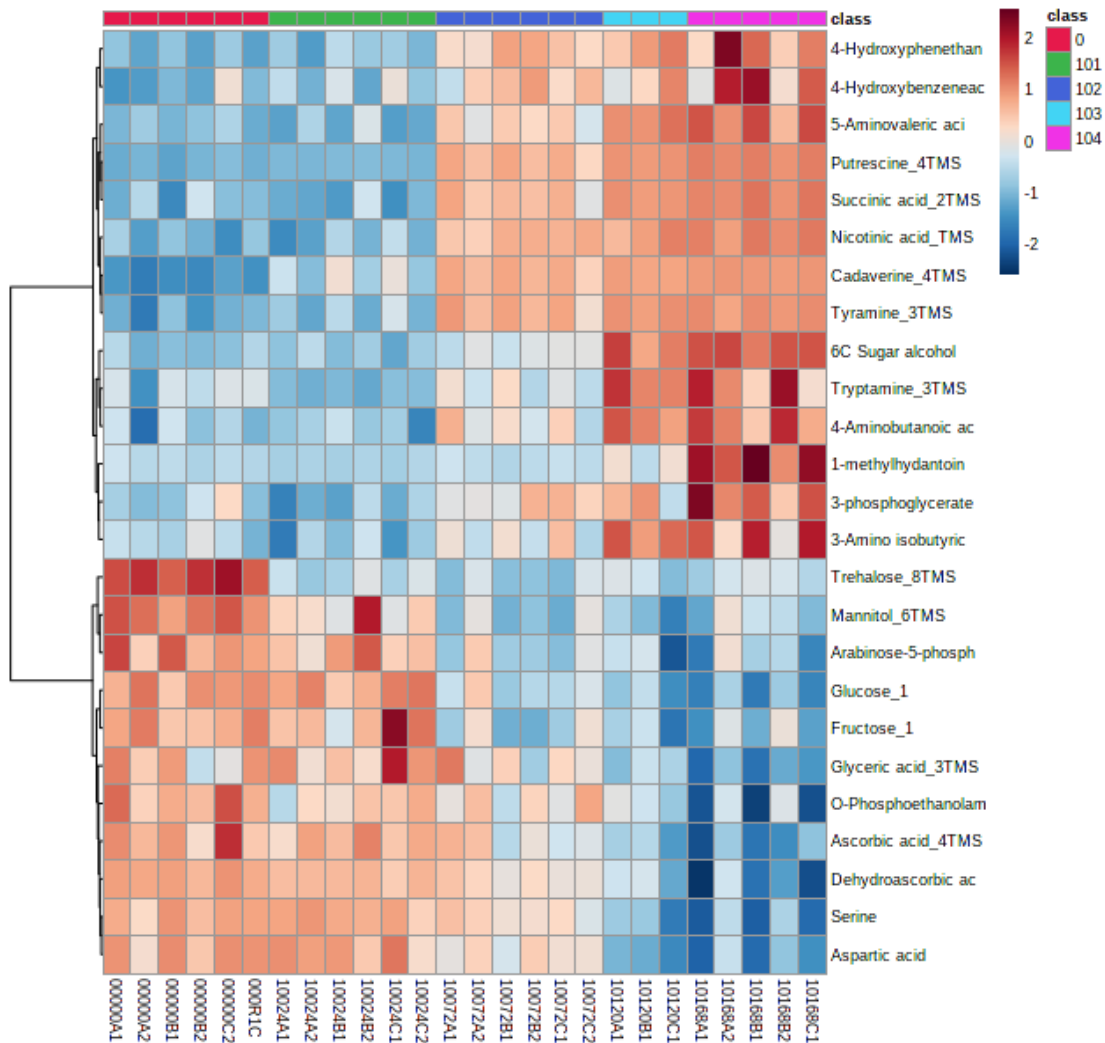


**Διάγραμμα 3.10:** Οι 15 σημαντικότεροι μεταβολίτες της θερμοκρασίας 10°C όπως προκύπτουν από το μοντέλο PLS-DA. Οι μπάρες στη δεξιά στήλη δείχνουν τη σχετική συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κλάση. Οι κλάσεις (0,101,102,103,104) υποδηλώνουν τις ώρες συντήρησης όπως περιγράφονται στον πίνακα 3.3.

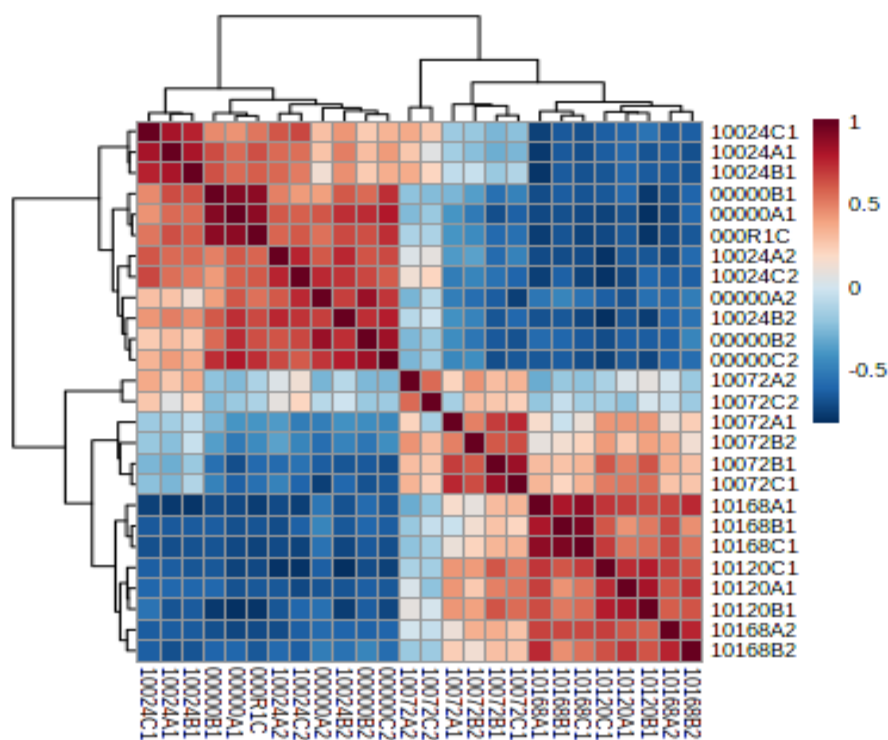
Στο διάγραμμα 3.10 παρουσιάζονται οι 15 σημαντικότεροι μεταβολίτες, αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο όσο προχωράει η αλλοίωση στο μπούτι κοτόπουλο όπως προκύπτουν από το μοντέλο PLS-DA με τη χρήση των VIP scores. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η ουσία που συνεισφέρει περισσότερο είναι η καδαβερίνη και ακολουθεί η τυραμίνη.

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων σημαντικό εργαλείο είναι η δημιουργία των θερμικών χαρτών «Heatmaps» της ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Clustering Analysis) διάγραμμα 3.12. Μέσω αυτών των χαρτών απεικονίζονται τα μοτίβα των μεταβολιτών στα δείγματα. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η υψηλή συγκέντρωση ενός μεταβολίτη, ενώ με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η χαμηλή συγκέντρωση ενός μεταβολίτη. Επίσης, στο διάγραμμα 3.12 απεικονίζεται η μεταβολή των κυριότερων μεταβολιτών όπως προέκυψαν από τα VIP Scores με βάση τις ώρες συντήρησης των δειγμάτων και γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες ανάλογα με τις ώρες συντήρησης των δειγμάτων παρουσιάζουν μία μεταβολή. Η συγκέντρωση των 14 ενώσεων στο άνω δεξιό τεταρτημόριο του διαγράμματος (βιογενείς αμίνες και οργανικά

οξέα) εκ των οποίων είναι το ηλεκτρικό οξύ, η τυραμίνη, η καδαβερίνη, η τρυπταμίνη, το αμινοισοβουτυρικό οξύ αυξάνεται με το χρόνο συντήρησης, ενώ η συγκέντρωση των υπόλοιπων ενώσεων (σάκχαρα, αμινοξέα και παράγωγα σακχάρων) όπως η μαννιτόλη, η τρεχαλόζη, η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σερίνη και το ασπαρτικό οξύ μειώνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος συντήρησης των δειγμάτων.



**Διάγραμμα 3.12:** Θερμικός χάρτης ( Heatmap) αποτελεσμάτων της HCA όπως προέκυψε από τα VIPScores όπου απεικονίζονται οι μεταβολές των σημαντικότερων μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων των δειγμάτων (0-104) όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.3. Τα δυο πρώτα ψηφία του κωδικού κάθε δείγματος περιγράφουν τη θερμοκρασία συντήρησης, τα επόμενα τρία ψηφία περιγράφουν τις ώρες συντήρησης και τα γράμματα περιγράφουν τις βιολογικές επαναλήψεις. Η κόκκινη περιοχή απεικονίζει την υψηλή σχετική αφθονία ενός μεταβολίτη ενώ η μπλε περιοχή απεικονίζει την χαμηλή σχετική αφθονία ενός μεταβολίτη.



**Διάγραμμα 3.13:** Θερμικός χάρτης (Heatmap) απεικόνισης της συσχέτισης μεταξύ των δειγμάτων. Η κλίμακα χρώματος αντιπροσωπεύει τους συντελεστές συσχέτισης όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r. Τα δυο πρώτα ψηφία του κωδικού κάθε δείγματος περιγράφουν τη θερμοκρασία συντήρησης, τα επόμενα τρία ψηφία περιγράφουν τις ώρες συντήρησης και τα γράμματα περιγράφουν τις βιολογικές επαναλήψεις. Τα έγχρωμα κελιά του χάρτη αντιστοιχούν στην σχετική αφθονία κάθε μεταβολίτη. Με κόκκινο και μπλε απεικονίζεται η θετική και η αρνητική συσχέτιση, αντίστοιχα.

Στο διάγραμμα 3.13 απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων στους 10°C. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται δείγματα με αρνητική συσχέτιση ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται δείγματα με θετική συσχέτιση. Τα δείγματα που βρίσκονται στο κάτω ήμισυ μέρος του κάθετου άξονα και δεξιά στον οριζόντιο που ανήκουν στις κλάσεις 102-104 και αντιστοιχούν σε χρόνους συντήρησης από 72-168h παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τα δείγματα που βρίσκονται στο πάνω μέρος του κάθετου άξονα και αριστερά στον οριζόντιο και αντιστοιχούν στις κλάσεις 0-101 σε 0 – 24h χρόνους συντήρησης.

### 3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ

Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση ANOVA, PCA και PLS-DA, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.5. Περιλαμβάνονται αμίνες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα, βιταμίνες και άλλες ενώσεις. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία συντήρησης:

α) στους μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση τους παρουσιάζει αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης

β) στους μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση μειώνεται κατά τη διάρκεια της συντήρησης

Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η καδαβερίνη, η τυραμίνη και η πουτρεσκίνη οι οποίες ανήκουν στις βιογενείς αμίνες και σχηματίζονται από τη μικροβιακή αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων κατά την αλλοίωση του ζωϊκού ιστού. Έπειτα συμπεριλαμβάνονται το νικοτινικό οξύ ή νιασίνη (B3) το οποίο αποτελεί σύμπλοκο της βιταμίνης B, το 5-αμινοβαλερικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ που αποτελεί ενδιάμεσο του κύκλου Krebs, η τρυπτοφάνη η οποία είναι ένα από τα 9 απαραίτητα αμινοξέα για τη σύνθεση πρωτεϊνών, η τρυπταμίνη η οποία ανήκει στα αλκαλοειδή, 1-μεθυλοϋδαντοΐνη (διοξυ-κρεατινίνη), 4-υδροξυφαινυλοαιθανόλη, 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ και το αμινοβουτανοϊκό οξύ. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν σάκχαρα όπως η γλυκόζη, ημανιτόλη, η τρεχαλόζη και η φρουκτόζη, τα αμινοξέα όπως η σερίνη, η τυροσίνη και το ασπαρτικό οξύ. Επιπλέον, συμπεριλαμβάνονται το δεϋδροασκορβικό οξύ, το κιτρικό οξύ το οποίο παράγεται με υγρή χώνευση σακχάρων (μελάσα, διαλυτά προϊόντα αμύλου) από *Aspergillus niger* ή *Candida sp.* και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).

**Πίνακας 3.5:**Σημαντικοί μεταβολίτες \* που είτε αυξάνονται (↑) είτε μειώνονται(↓) κατά τη διάρκεια συντήρησης του μπουτιού κοτόπουλου σε διάφορες θερμοκρασίες.

Σημαντικοί μεταβολίτες	0°C	5°C	10°C
Καδαβερίνη	↑	↑	↑
Τυραμίνη	↑	↑	↑
Νικοτινικό οξύ	↑	↑	↑
Πουτρεσκίνη	↑	↑	↑
4-Υδροξυφαινυλοαιθανόλη	↑	↑	↑
5-Αμινοβαλερικό οξύ	↑	↑	↑
Ηλεκτρικό οξύ	↑	↑	↑
4-Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	↑	↑	
Γλυκόζη_1	↓	↓	↓
Τρυπταμίνη_3TMS	↑		↑
4- Αμινοβουτανοϊκό οξύ	↑	↑	
Ασπαρτικό οξύ	↓	↓	↓
Δεϋδροασκορβικό οξύ	↓		↓
L-τρυπτοφάνη	↑		
Τυροσίνη	↓		
Τρεχαλόζη		↓	
Μανιτόλη		↓	
Φρουκτόζη_1		↓	
Κιτρικό οξύ		↓	
Ασκορβικό οξύ			↓
Σερίνη			↓
6C Sugar alcohol			↑
1-Μεθυλοϋδαντοΐνη			↑

\*Προκύπτουν από τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων ANOVA,PCA, PLS-DA(vip scores) και Heatmap

Είναι γνωστό, με αναφορά σε προηγούμενο κεφάλαιο, ότι οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το μπουτι κοτόπουλο, χρησιμοποιώντας τη μεταβολωμική ανάλυση

είναι ελάχιστες και πως αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο ποιοτικής αξιολόγησης και αλλοίωσης στα πουλερικά και συγκεκριμένα στο μπούτι κοτόπουλο.

Όπως, επιβεβαιώνεται και από τον πίνακα 3.5, διακρίνονται μεταβολές στους κυριότερους μεταβολίτες. Πιο συγκεκριμένα, η καδαβερίνη, η τυραμίνη και η πουτρεσκίνη οι οποίες ανήκουν στις βιογενείς αμίνες, παρουσιάζουν μία αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του μπουτιού κοτόπουλου, το οποίο οφείλεται στην ανάπτυξη βακτηρίων όπως τα είδη *Pseudomonas*, *Proteus* και *Lactobacillus* στο κατεψυγμένο κρέας έχουν ισχυρή αποκαρβοξυλιωτική ικανότητα για μετατροπή των αμινοξέων σε βιοαμίνες (Santos, 1996; Wen et al., 2018). Επιπλέον, τα είδη *Aeromonas salmonicida* 35, *Pseudomonas fluorescens* H5 και *Pseudomonas fragi* H8 τα οποία απομονώθηκαν από παγωμένο κρέας κοτόπουλου μπορούν να υδρολύσουν την πρωτεΐνη από το κρύο κρέας κοτόπουλο, αυξάνοντας το συνολικό πτητικό άζωτο και παράγοντας αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και θείο κατά την αποθήκευση (Wang et al., 2017).

Οι (Suzzi et al., 2003; Lazaro et al., 2015), υποστηρίζουν ότι επειδή η περιεκτικότητα σε βιοαμίνη μπορεί εμμέσως να αντικατοπτρίσει τις αλλαγές στο βακτηριακό περιεχόμενο, οι αμίνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μέτρησης της υποβάθμισης των τροφίμων και της διάρκειας ζωής τους (shelf life). Η συγκέντρωση της τυραμίνης και της καδαβερίνης αυξάνονται καθώς αυξάνονται οι μέρες συντήρησης (Wen et al., 2020), πιο αναλυτικά από την πρώτη μέχρι τη δεύτερη μέρα συντήρησης τα επίπεδα της τυραμίνης και της καδαβερίνης ήταν χαμηλά, στην 4<sup>η</sup> μέρα συντήρησης αυξήθηκαν σημαντικά.

Κατά τη διάρκεια της ψύξης, οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποσυνθέσουν τις πρωτεϊνών στο κρέας κοτόπουλου σε διάφορα ενδιάμεσα προϊόντα, όπως μικρά μοριακά πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα (Wang et al., 2017). Τα ελεύθερα αμινοξέα είναι σημαντικά συστατικά του μη πρωτεϊνικού αζώτου και αποτελούν μια σημαντική πρόδρομη ουσία γεύσης στο κρέας κοτόπουλου. Μικροβιακά και ενδογενή ένζυμα αποικοδομούν και αποκαρβοξυλιώνουν ελεύθερα αμινοξέα για να σχηματίσουν βιοαμίνες ή άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες (Bover-Cid et al., 2000; Martuscelli et al., 2009). Πολλά ελεύθερα αμινοξέα σχετίζονται στενά με τη γεύση του κρέατος και μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ποιότητας και φρεσκάδας (Leggio et al., 2012). Κάποια από τα ελεύθερα αμινοξέα που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η τρυπτοφάνη, η σερίνη, η τυροσίνη και το ασπαρτικό οξύ. Όσο αυξάνεται η διάρκεια της συντήρησης, η ποιότητα του κρέατος κοτόπουλου σταδιακά αλλάζει και από φρέσκο μετατρέπεται σε ελαφρώς αλλοιωμένο και τελικά σε ακατάλληλο για κατανάλωση. Η τυροσίνη και η σερίνη στην παρούσα μελέτη μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης, παρατήρηση η οποία επιβεβαιώθηκε και στο πείραμα των (Wen et al., 2020).

Τα οργανικά οξέα, που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι το νικοτινικό και το ηλεκτρικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα τρόφιμα (E363) και συμμετέχει ως ενδιάμεσο προϊόν στο κύκλο του Krebs. Και τα δύο οξέα περιλαμβάνονται στους μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση έχει μία αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης στο μπούτι κοτόπουλο.

Επιπρόσθετα, τα σάκχαρα που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα μελέτη όπως η μανιτόλη, η τρεχαλόζη και η φρουκτόζη παρέμειναν στα ίδια επίπεδα κατά τη διάρκεια της συντήρησης, παρατήρηση η οποία διαπιστώθηκε και στη μελέτη των van Hoof (1979), όπου η συγκέντρωση των σακχάρων παρέμεινε σε ίδια επίπεδα από τη σφαγή του ζώου μέχρι την αποθήκευση και τη ψύξη. Σε μία άλλη μελέτη του (Koustidis et al., 2008) η οποία βέβαια πραγματοποιήθηκε σε βοδινό κρέας μετρήσιμες ποσότητες μαννόζης και φρουκτόζης δεν ανιχνεύθηκαν.

Συσχετίζοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα της παρούσας μελέτης από τη μεταβολωμική ανάλυση σε μπούτι κοτόπουλο θα μπορούσαν να προταθούν μεταβολίτες οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση της φρεσκότητας και της αξιολόγησης της ποιότητας στα πουλερικά.. Καταλήγοντας, η μεταβολωμική έχει τη δυνατότητα να βρει νέες αντιμικροβιακές ενώσεις όπως επίσης και να προσδιορίσει τους αναλύτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τα αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά σε ορισμένα φυτά και τρόφιμα. (Zhi et al., 2008).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, η πολυπαραγοντική ανάλυση του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών του μπουτιού κοτόπουλου με χρήση GC-MS αποδείχθηκε ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση των μεταβολών που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο κατά τη διάρκεια της συντήρησης τους σε διάφορες θερμοκρασίες. Συνολικά ανιχνεύθηκαν 23 μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν στις αμίνες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα, βιταμίνες και άλλες ενώσεις, οι οποίοι παρουσίασαν είτε αυξητική είτε φθίνουσα τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι μεταβολίτες αυτοί θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες φρεσκότητας και αξιολόγησης της ποιότητας.

Από τις αμίνες, η καδαβερίνη, η τυραμίνη και η πουτρεσκίνη παρουσίασαν μία αυξητική τάση η οποία συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη των ψευδομονάδων (*Pseudomonas*), πρωτεοβακτηρίων (*Proteus*) και του λακτοβάκιλλου (*Lactobacillus*).

Επίσης, τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, σερίνη και τυροσίνη μπορούν να θεωρηθούν ως δείκτες φρεσκάδας και ποιότητας, καθώς επηρεάζουν τη γεύση στο κοτόπουλο καθώς προχωράει η συντήρηση.

Συνοψίζοντας, σε αυτή τη μελέτη ανιχνεύτηκαν κάποιοι μεταβολίτες οι οποίοι σχετίζονται με την ποιότητα και τη φρεσκάδα στο μπούτι κοτόπουλο. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, καθώς δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες για μεταβολίτες οι οποίοι αναπτύσσονται κατά την αλλοίωση στο μπούτι κοτόπουλο. Η μεταβολωμική είναι μία σύγχρονη μέθοδος η οποία έχει σαν στόχο τη δημιουργία βιοδεικτών οι οποίοι θα δίνουν πιο γρήγορα αποτελέσματα σε ότι αφορά την αλλοίωση στα τρόφιμα σε σχέση με τις παραδοσιακές οργανοληπτικές και μικροβιολογικές μεθόδους.

## 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Ali, K., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y., & Verpoorte, R. (2011). Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *Journal of Biomolecular*, 49 , 255–266. <https://doi:10.1007/s10858-011-9487-3>.

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. *Meat Science*, 94, 55–62. <https://doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.032>.

Aprea, E., Gika, H., Carlin, S., Theodoridis, G., & Vrhovsek, U., (2011). Metabolite profiling on apple volatile content based on solid phase microextraction and gas-chromatography time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A*, 1218, 4517–4524, <https://doi:10.1016/j.chroma.2011.05.019>.

Balamatsia, C.C. , Paleologos, E. K., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2006). Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4°C: possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(1), 9-17

Beleggia, R., Platani, C., Papa, R., Chio, A., & Barros, E. (2011).Metabolomics and Food Processing: From Semolina to Pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,59, 9366–9377, <https://doi:10.1021/jf2022836>.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. <https://doi:10.1007/978-3-540-69934-7>.

Benton, H. P., Ivanisevic, J., Mahieu, N. G., Kurczy, M. E., Johnson, C. H., Franco, L., Rinehart, D., Valentine, E., Gowda, H., Ubhi, B. K, Tautenhahn, R., Gieschen, A., Fields, M.W., & Siuzdak, G. J. (2015).Autonomous metabolomics for rapid metabolite identification in global profiling. *Analytical Chemistry*, 87 , 884-891

Brenes, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* 158(1), 1-14

Bonoli, M., Caboni, M. F., Rodriguez-Estrada, M. T., & Lercker, G. (2007).Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. *Food Chemistry*, 101, 1327-1337

Boccard, J., & Rudaz, S. (2019). Analysis of Metabolomics Data—A Chemometrics Perspective. Reference Module in *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. <https://doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.14593-7>.



- Booth, S. C., Workentine, M. L., Weljie, A. M., & Turner, R. J. (2011). Metabolomics and its application to studying metal toxicity. *Metallomics*, 3(11), 1142-1152
- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid, *Radiation Research*, 145, 532-541
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2000). Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 63, 1544-1550
- Bunková, L., Bunka, F., Mantlová, G., Cablová, A., Sedláček, I., Švec, P., Pachlová, V., & Krácmar, S. (2010). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*, 27, 880-888
- Byrne, L., Byrne, Lau, K. T., & Diamond, D. (2002). Monitoring of headspace total volatile basic nitrogen from selected fish species using reflectance spectroscopic measurements of pH sensitive films. *Analyst*, 127 (10), 1338-1341
- Castro – Puyana, M., Perez- Miguez, R., Montero, L., & Herrero, M. (2017). Reprint of application of mass spectrometry based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. *Trends in Analytical Chemistry*, 96, 62-78
- Cao, J., Zhou, C., Wang, Y., Sun, Y., & Pan, D. (2018). The effect of oxidation on the structure of G-actin and its binding ability with aroma compounds in carp grass skeletal muscle. *Food Chemistry*, 240, 346-353
- Cevallos-Cevallos, J., Rouseff, R., & Reyes-De-Corcuera, J. (2009). Untargeted metabolite analysis of healthy and Huanglongbing infected orange leaves by CEEDAD. *Electrophoresis*, 30(7), 1240-1248
- Chan, J. F., Hung, I. F., Yam, W. C., Yuen, K. Y., & Woo, P.C. (2015). Identification of specific metabolites in culture supernatant of mycobacterium tuberculosis using metabolomics: exploration of potential biomarkers. *Emerging Microbes & Infections*, 4, 1-10
- Chin, E., & Slupsky, C. M. (2013). Applications of metabolomics in food science: food composition and quality, sensory and nutritional attributes. *Metabolomics in Food and Nutrition*.
- Cho, S., Kim, Y., Park, T., & Hwang, K. (2004). Development of beef freshness sensor using NIR spectroscopy. *Journal of Biosystems Engineering*, 29, 539-543
- Choe, J. H., Nam, K., Jung, S., Kim, B., Yun, H., & Jo, C. (2010). Differences in the quality characteristics between commercial Koreannative chickens and broilers. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 30, 13-19. [https://doi: 10.5851/kosfa.2010.30.1.13](https://doi.org/10.5851/kosfa.2010.30.1.13).
- Choi, M.Y., Choi, W., Park, J., Lim, J. & Kwon, S. (2010). Determination of coffee origins by integrated metabolomic approach of combining multiple analytical data. *Food*

*Chemistry* 121 , 1260–1268, <https://doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.035>.

Colombo, F. M., Cattaneo, P., Confalonieri, E., & Bernardi, C. (2018). Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (7), 1131-1151

Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., & Baucells, M.D., (2005). Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry Science*, 84, 48–55

Consonni, R., Cagliani, L. and Cogliati, C. (2012) NMR Characterization of Saccharides in Italian Honeys of Different Floral Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 , 4526–4534, <https://doi:10.1021/jf3008713>.

Dabadé, D. S., Jacxsens, L., Micolte, L., Abatih, E., Frank, D., & De Meulenaer, B. (2020). Survey of multiple biogenic amines and correlation to microbiological quality and free amino acids in foods. *Food Control*, 120

Dannert, R. D., & Pearson, A. M. (1967). Concentration of inosine 5'-monophosphate in meat. *Journal of Food Science*, 32, 49-52

Domínguez, R., Gómez, M., Fonseca, S., & Lorenzo, J. M. (2014). Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of volatile compounds in foal meat. *Meat Science*, 97, 223-230

Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis, 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>.

Eggink, P., Maliepaard, C., Tikunov, Y., Haanstra, J., & Bovy, A. (2012). A taste of sweet pepper: Volatile and non-volatile chemical composition of fresh sweet pepper ( *Capsicum annuum* ) in relation to sensory evaluation of taste. *Food Chemistry*, 132, 301–310, [doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.081](https://doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.081).

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., 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>.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *In Functional genomics*. Kluwer Academic Publishers, 155–171

- 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
- Gika, H. G., Wilson, I. D., Theodoridis, G. A. (2018). *Metabolomics: An Analytical Perspective*.
- Green, R. D., Qureshi, M. A., Long, J. A., Burfening, P.J., & Hamernik, D.L.(2007). Identifying the Future Needs for Long-Term USDA Efforts in Agricultural Animal Genomics. *International Journal of Biological Science*, 3(3), 185–191
- Gullberg, J., Jonsson, P., Nordstrom, A., Sjostrom, M., & Moritz, T.(2004). Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of Arabidopsis thaliana samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 331(2), 283-295
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5 (2), 42-49
- Hall, R. D. (2007). Food metabolomics: META-PHOR e a new European research initiative. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 18(1), 14-16.
- Hall, R. D., Brouwer, I. D., & Fitzgerald, M. A. (2008). Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 162-175
- Hill, C., & Roessner, U., (2014). Advances in high-through put untargeted LC-MS analysis for plant metabolomics. *Advanced LC-MS Applications for Metabolomics*. UK: Future Science Group.
- Hernández, P., Navarro, J. L., Toldrá, F. (1999). Lipids of pork meat as affected by various cooking techniques, *Food Science Technology International*, 5, 501-508
- Hong, H., Regenstein, J. M., Luo, Y. (2017). The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: a review *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1787-1798
- Howgate, P. (2006). Review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage . *International Journal Food Science Technology*, 41, 341-353
- ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods (2005). *Microorganisms in foods 6 (2nd ed.)*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Iulietto, M. F., Sechi, P., Borgogni, E., & Cenci-Goga, B. T. (2015). Meat spoilage: A critical review of a neglected alteration due to ropy slime producing bacteria

*Italian Journal of Animal Science*, 14 (3) , 4011

Imparato, G., Paolo, E., Braca, A., & Lamanna, R. (2011). Nuclear Magnetic Resonance Profiling of Wine Blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 , 4429–4434, <https://doi:10.1021/jf200587n>.

J. van der Greef, H., Van Wietmarschen, B., & Van Ommen, E., (2013). Looking back into the future: 30 years of metabolomics at TNO. *Mass Spectrometry Revision*, 32 , 399-415

James, C., Vincent, C., De Andrade Lima, T. I., & James, S. J., (2006). The primary chilling of poultry carcasses—a review. *International Journal of Refrigeration*. <https://doi:10.1016/j.ijrefrig.2005.08.003>.

Jay J. M. (1986). Microbial spoilage indicators and metabolites. *Developing methodology*, 219-240

Kaeun, L., Hyunwoo, P., Sangho, B., Seungjong, H., Dowan, K., Soo C., Jeong-Yeol, Y., Jongchul, S. (2019). Colorimetric array freshness indicator and digital color processing for monitoring the freshness of packaged chicken breast. *Food Packaging and Shelf Life*, 22

Kemsley, E. K., Le Gall, G., Dainty, J. R., Watson, A. D., Harvey, L. J., Tapp, H. S. (2007). Multivariate techniques and their application in nutrition: a metabolomics case study. *British Journal of Nutrition*, 98(1), 1-14

Kotzekidou, P., & Bloukas, J. G. (1995). Effect of Protective Cultures and Packaging Film. *Meat Science*, 333-345

Koutsidis, G., Elmore, J. S., Oruna-Concha, M. J., Campo, M. M., Wood, J. D., & Mottram, D. S. (2008). Water-soluble precursors of beef flavour. Part II: Effect of post-mortem conditioning. *Meat Science*, 79, 270–277

Kristensen, L., & Purslow P. P. (2001). The effect of processing temperature and addition of mono- and divalent salts on the heme- nonheme- iron ratio in meat, *Food Chemistry*, 73, 433-439

Kuswandi, B., Wicaksono, Y., Abdullah, A., Heng, L. Y., & Ahmad, M. (2011). Smart packaging: Sensors for monitoring of food quality and safety. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 5, 137-146

Lahellec, C., Colin, P., Bennejean, G., Paquin, J., Guillerm, A., & Deboisj, C. (1986). Influence of Resident *Salmonella* on Contamination of Broiler Flocks, *Poultry Science* , 65, 2034-2039

Lau, S. K., Lam, C. W., Curreem, S. O., Lee, K. C, Lau, C. C., Chow, W. N., Ngan Navarro-Reig, M., Jaumot, J., García-Reiriz, A., & Tauler, R. (2015). Evaluation of changes induced in rice metabolome by Cd and Cu exposure using LC-MS with XCMS and MCR-ALS data analysis strategies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 8835-8847

Lázaro, C. A., Conte-Junior, C. A., Canto, A.C., Monteiro, M. L. G., Costa-Lima, B., Da Cruz, A. G., & Franco, R. M. (2015). Biogenic amines as bacterial quality indicators in

different poultry meat species. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie -Food Science and Technology*, 60 (1), 15-21

Lee, H. Y., Kim, J. M., Byun, M. J., Kang, K. S., Kim, T. H., Hong, K. C., Lee, K. T. (2011). Structure and polymorphisms of the 5' regulatory region of porcineadenylate kinase 3-like 1gene and effect on trait of meat quality. *Genes & Genomics*, 33, 147-148

Buňková, L., Buňka, F., Klčovská, P., Mrkvička, V., Doležalová, M., & Kráčmar, S. (2007). Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*, 121, 203-206

Leggio, A., Belsito, E. L., Marco, R. D., Liguori, A., Siciliano, C., & Spinella, M. (2012). Simultaneous extraction and derivatization of amino acids and free fatty acids in meat products. *Journal of Chromatography A*, 1241, 96–102

Li, C., Shi, P., Xu, C., Xu, X., & Zhou, G., (2010). Tracing processes of rigor mortis and subsequent resolution of chicken breast muscle using a texture analyzer. *Journal of Food Engineering*, 100, 388–391. <https://doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.10.040>.

Fu, L., Wang, A., Zhang, H., Zhou, Q., Chen, F., Su, W., Yu, A., Ji, Z., & Liu, Q. (2019). Analysis of chicken breast meat freshness with an electrochemical approach. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 855

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. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie -Food Science and Technology*, 78, 317-324

Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., & Martín, M. C. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180

Lombardo, V., Osorio, S., Borsani, J., Lauxmann, M., Bustamante, C. (2011). Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiology*, 157, 1696–1710. <https://doi:10.1104/pp.111.186064>.

Louw, L., Roux, K., Tredoux, A., Tomic, O., Naes, T. (2009). Characterization of selected South African young cultivar wines using FTMIR spectroscopy, gas chromatography, and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2623–2632. <https://doi:10.1021/jf8037456>.

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. <https://doi:10.1016/j.fm.2017.04.013>.

Malmendal, A., Amoresano, C., Trotta, R., Lauri, I., & Tito, S. (2011). NMR spectrometers as “magnetic tongues”: prediction of sensory descriptors in canned tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10 831–10 838, <https://doi:10.1021/jf203803q>.

Mancini, R., & Hunt, M. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71 (1) , 100-12.

Masic, U., Yeomans, M. R.(2014).Umami flavor enhances appetite but also increases satiety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100, 532-538.

Mataragas, M., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H., (2007). Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *International Journal of Food Microbiology*, 126 , 1–12.

May, K. N., Stadelman, W. J. (1960). Some factors affecting components of eggs from adult hens. *Poultry Science*, 39, 560-565.

Mazzei, P., & Piccolo, A. (2012).1H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132 , 1620–1627.<https://doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.142>.

Muhalidin, B. J., Kadumc, H., Fathallaha, S., Shobirin, A., & Hussin, M. (2020) Metabolomics profiling and antibacterial activity of fermented ginger paste extends the shelf life of chicken meat. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 132.

Mills, A. (2005). Oxygen indicators and intelligent inks for packaging food. *Chemical Society Reviews*, 34 , 1003-1011.

Min, B., & Ahn, D. U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products-a review, *Food Science and Biotechnology*, 14, 152-163.

Moing, A., Aharoni, A., Biais, B., Rogachev, I., & Meir , S. (2011). Extensive metabolic cross-talk in melon fruit revealed by spatial and developmental combinatorial metabolomics. *The New Phytologist* 190 , 683–696. <https://doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03626.x>.

Morsy, M. K., Zor, K., Kostesha, N., Alstrøm, T. S., Heiskanen, A., & El-Tanahi, H. (2016).Development and validation of a colorimetric sensor array for fish spoilage monitoring. *Food Control*, 60, 346-352.

Monton, M. R. N., & Soga, T. (2007). Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1168(1e2), 237-246.

Muhalidin, B. J., Kadum, H., Fathallah, S., & Meor Hussin, A. S. (2020). Metabolomics profiling and antibacterial activity of fermented ginger paste extends the shelf life of chicken meat. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. <https://doi:10.1016/j.lwt.2020.109897>.

Muhlisin, D. T., Utama, J. H., Lee, J. H., & Choi, S. K. (2016).Antioxidant enzyme activity, iron content and lipid oxidation of raw and cooked meat of Korean native chickens and other poultry. *Asian - Australasian Journal of Animal Science*, 29, 695-701.

Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29, 1181-1192.

Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., & Suppakul, P. (2010). Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture dessert spoilage. *Talanta*, 81, 1126-1132.

Nychas, G.J.E, Drosinos, E. & Board, R.G (1998) Chapter 9; Chemical changes in stored meat - *In The Microbiology of Meat and Poultry* (eds. R.G Board & A.R Davies) Chapman & Hall, pp.288-326

Nychas, G. J. E, Skandamis, P. N., Tassou, C. C., Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78 (1–2) , 77-89.

Onuha, J. O., & Aluko, R. E. (2019). Metabolomics as a tool to study the mechanism of action of bioactive protein hydrolysates and peptides: A review of current literature *Trends in Food Science & Technology*.

Önal, A., & Tekkeli, S.E.K. , Önal C. (2013). A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*, 138 (1), 509-515.

Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103 (4), 1475-1486.

Papadopoulou, O., Panagou, E., Tassou, C. C., & Nychas G.J.E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, 44 (10), 3264-3271.

Paramithiotis, S., Pappa, A. M., Drosinos, E. H. (2009). Microbiological, physico-chemical and safety parameters of cereal-based animal diets. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1(3), 170-178.

Pintado, A. I., Pinho, O., Ferreira, I. M. , Pintado, M. M. E., Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (2008). Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*, 18 (6), 631-640.

Plumb, R. S., Granger, J. H., Stumpf, C. L., Johnson, K. A., Smith, B. W., Gaulitz S., Wilson, I. D, Castro-Perez, J. (2005). A rapid screening approach to metabolomics using UPLC and TOF mass spectrometry: application to age, gender and diurnal variation in normal/zucker obese rats and black, white and nude mice. *Analyst*, 130, 844-849.

Qiu, W., Xie, J., Chen, S., Qu, Y., Song, X., & Danni, W. (2015). Changes of ATP-related compounds contents and its degradation pathways in Shrimps during chilled storage. *Modern Food Science and Technology*, 31, 103-108.

Pham, Q. T., (2014). Refrigeration and freezing technology. *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)*, 202-208.

Ramanauskienė, K., Stelmakienė, A., Briedis, V., Ivanauskas, L., & Jakstas, V. (2012). The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *Food Chemistry* 132, 1544–1548, <https://doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.007>.

Ramautar, R., Demirci, A., & Jong, G. J.d. (2006). Capillary electrophoresis in metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(5), 12.

Ryu, K. Y., Shim, S.L., Kim, W., Jung, M.S., Hwang, I.M, Kim, J.H., Hong, C.H., Jung, C.H., & Kim, K.S. (2009). Analysis of the seasonal change of the proximate composition and taste components in the Conger Eels (Conger myriaster). *Journal of Korean Society Food Science Nutrition*, 38, 1069-1075.

Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29 (2-3), 213-231.

Schievano, E., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin, C., & Mammi, S. (2011). An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics*, 8, 679–690, <https://doi:10.1007/s11306-011-0362-8>.

Serpen, A., Gokmen, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90, 60-65.

Shin, H. Y., Ku, K.J., Park, S. K., & Song, K. B. (2006). Use of freshness indicator for determination of freshness and quality change of beef and pork during storage. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 38, 325-330.

Skogerson, K., Runnebaum, R., Wohlgemuth, G., Ropp, J., Heymann, H., (2009). Comparison of Gas Chromatography-Coupled Time-of-Flight Mass Spectrometry and <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Metabolite Identification in White Wines from a Sensory Study Investigating Wine Body. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6899–6907. <https://doi:10.1021/jf9019322>

Slisz, A. M., Breksa, A. P., Mishchuk, D. O., Mccollum, G. & Slupsky, C. M. (2012). Metabolomic Analysis of Citrus Infection by ‘Candidatus Liberibacter’ Reveals Insight into Pathogenicity. *Journal of Proteome*, 11, 4223–4230. <https://doi:10.1021/pr300350x>.

Smolander, M., Hurme, E., Latva-Kala, K., Luoma, T., Alakomi, H. L., Ahvenainen, R. (2002). Myoglobin -based indicators for the evaluation of freshness of unmarinated broiler cuts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 279-288.

Soyer, A., Özalp, B., Dalmiş, Ü., & Bilgin, V., (2010). Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *Food Chemistry*, 120, 1025–1030. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.042>.

Suman, S.P., & Joseph P. (2013). Myoglobin chemistry and meat color. *Food Science and Technology*, 4, 79-99.

Sun, W., Li, H., Wang, H., Xiao, S., Wang, J., & Feng, L. (2015). Sensitivity enhancement of pH indicator and its application in the evaluation of fish freshness. *Talanta*, 143, 127-131.



- Sugimoto, M., Kaneko, M., Onuma, H., Sakaguchi, Y., & Mori, M. (2012). Changes in the Charged Metabolite and Sugar Profiles of Pasteurized and Unpasteurized Japanese Sake with Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2586–2593, <https://doi:10.1021/jf2048993>.
- Suzzi, G., & Torriani, S. (2015). Biogenic amines in foods. *Frontiers in Microbiology*, 6, 472.
- Tassou, C.C., Drosinos, E.H. & Nychas, G-J.E (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593-600.
- Thissen, U., Coulier, L., Overkamp, K., Jetten, J., & Werff, B. (2011). A proper metabolomics strategy supports efficient food quality improvement: A case study on tomato sensory properties. *Food Quality and Preference*, 22, 499–506, <https://doi:10.1016/j.foodqual.2010.12.001>.
- Tsigarida, E., & Nychas, G.J.E. (2001). Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 696-705.
- Van Hoof, J. (1979). Influence of ante- and peri-mortem factors on biochemical and physical characteristics of turkey breast muscle. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 104(2), 29–36.
- Wang, G. Y., Wang, H. H., Han, Y. W., Xing, T., & Zhou, G. H. (2017). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. *Food Microbiology*, 63, 139–146.
- Wells, N., Yusufu, D., & Mills, A. (2019) Colourimetric plastic film indicator for the detection of the volatile basic nitrogen compounds associated with fish spoilage. *Talanta*, 194, 830-836.
- 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, 156–161.
- Wen, D., Liu, Y., & Yu, Q., (2020). Metabolomic approach to measuring quality of chilled chicken meat during storage. *Poultry Science*, 5, 2543-2554.
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 482-493.
- Worley, B., Halouska, S., & Powers, R. (2013). Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots. *Analytical Biochemistry*, 433, 102-104.
- Ye, Z., Xie, J., Qiu, W., Gao, L., Zhu, H., Zhao, Y., Wang, Y., & Zhang, N. (2015). Changes of flavor nucleotides and free amino acid contents in chicken muscle under room temperature and cold storage. *Science Technology Food Industry*, 36, 301-305.

Yusufu, D., & Mills, A. (2018). Spectrophotometric and digital colour colourimetric (DCC) analysis of colour-based indicators. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 273, 1187-1193.

Zeki, Ö., Cansın, E., Cemil, C., Rec, T., Kır, S., & Nemitlu, E., (2020). Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

Zhang, J. , Wang , X. , Yu , O. , Tang , J. , & Gu , X., (2011). Metabolic profiling of strawberry ( *Fragaria × ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *Journal of Experimental Botany*, 62 , 1103–1118, <https://doi:10.1093/jxb/erq343>.

Zhang, P., Georgiou, C. A., & Brusica, V. (2017a). Elemental metabolomics. *Briefings Bioinformatics*, 19, 524–536.

Zhang, Y., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, G., Yang, W., & Feng, X. (2019). A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. *Journal of Chromatography A* , 1605.

Zhi, B. Y., Yu, Y., & Yi, Z. L. (2008). Investigation of antimicrobial model of *Hemsleya pengxianensis* W.J. Chang and its main active component by metabolomics technique. *Journal of Ethnopharmacology*.

Zou, Y., Yang, H., Li, P. P., Zhang, M. H., Zhang, X. X., Xu, W. M., Wang, D. Y. (2019). Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal and antioxidant properties of chicken plasma . *Poultry Science*, 98, 1925-1933.

## Ελληνική Βιβλιογραφία

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Χημεία Τροφίμων* (4th Edition). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 590-620.

Εθνικός διατροφικός οδηγός για ενήλικες

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (2018). Έκθεση της Επιτροπής προς το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο σχετικά με την εφαρμογή της οδηγίας 2007/43/EK και την επιρροή της στην καλή διαβίωση των κοτόπουλων που εκτρέφονται για την παραγωγή κρέατος, καθώς και σχετικά με την ανάπτυξη δεικτών καλής διαβίωσης.

Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Κοτζεκίδου, Π.-Ρούκα, (1993). Μικροβιολογία Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων, Τομέας Γεωργικών Βιομηχανιών – Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τομέας Γεωπονίας Α.Π.Θ.

Ραμαντάνης, Σ .Β., (1999). «Τεχνολογία Κρέατος και Κρεατοσκευασμάτων», Τ.Ε.Ι. Αθήνας

### **Διαδίκτυο**

Avec : <http://www.avec.com>

Food and Agriculture Organization of the United States:  
<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=USA>

Europages : <https://www.europages.co.uk/companies/Greece/poultry.html>

Eurostat 2015 : Poultry meat statistics.

Ms-Dial: <http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>

National Chicken Council: <https://www.nationalchickencouncil.org/chicken-the-preferred-protein-for-your-health-and-budget/the-nutritional-value-of-chicken/>

Nist Ei-Ms: Database <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>

OECD 2019: Meat consumption.

ResearchGate:

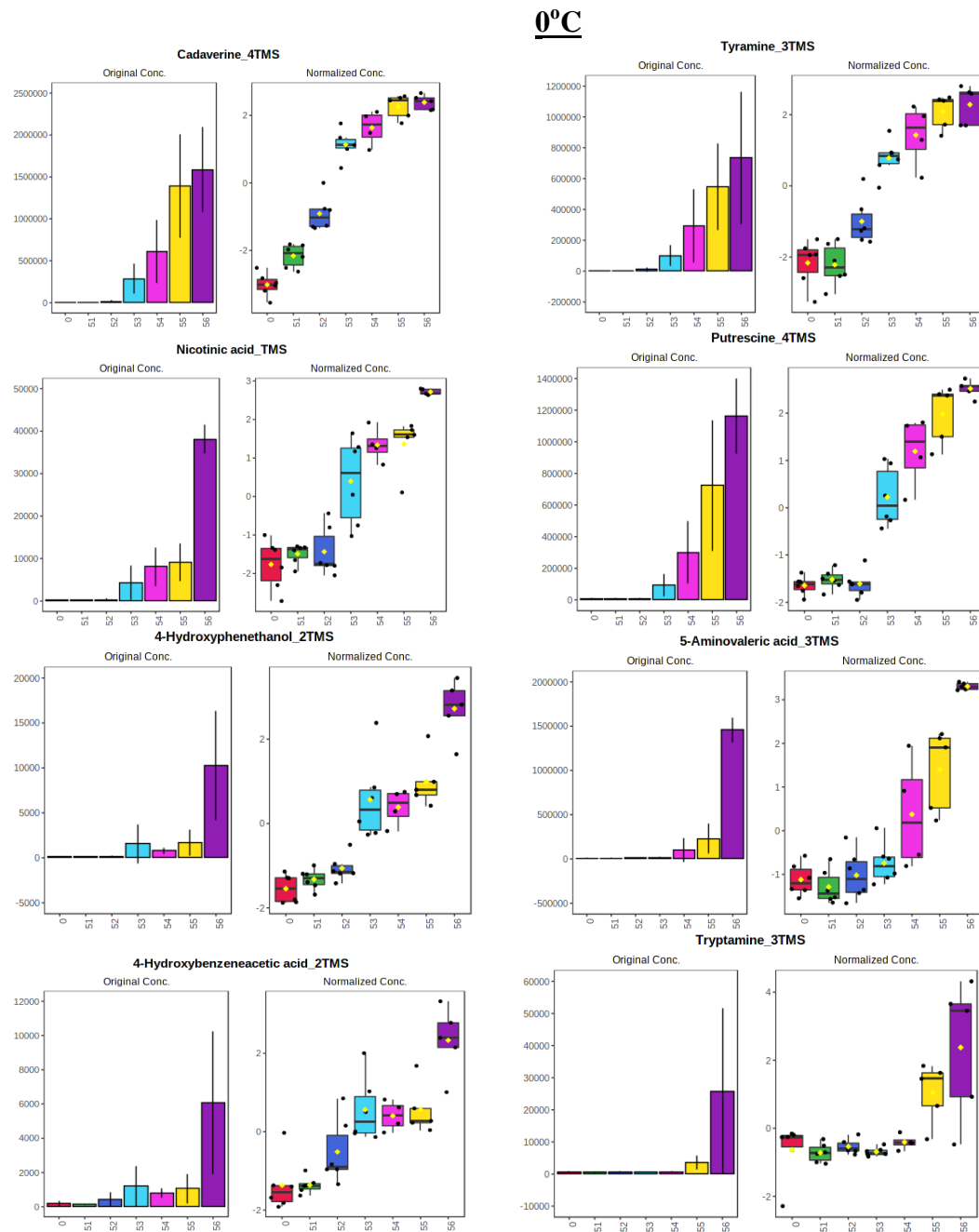
[https://www.researchgate.net/publication/234027279\\_Present\\_and\\_future\\_of\\_poultry\\_industry\\_in\\_Greece](https://www.researchgate.net/publication/234027279_Present_and_future_of_poultry_industry_in_Greece)

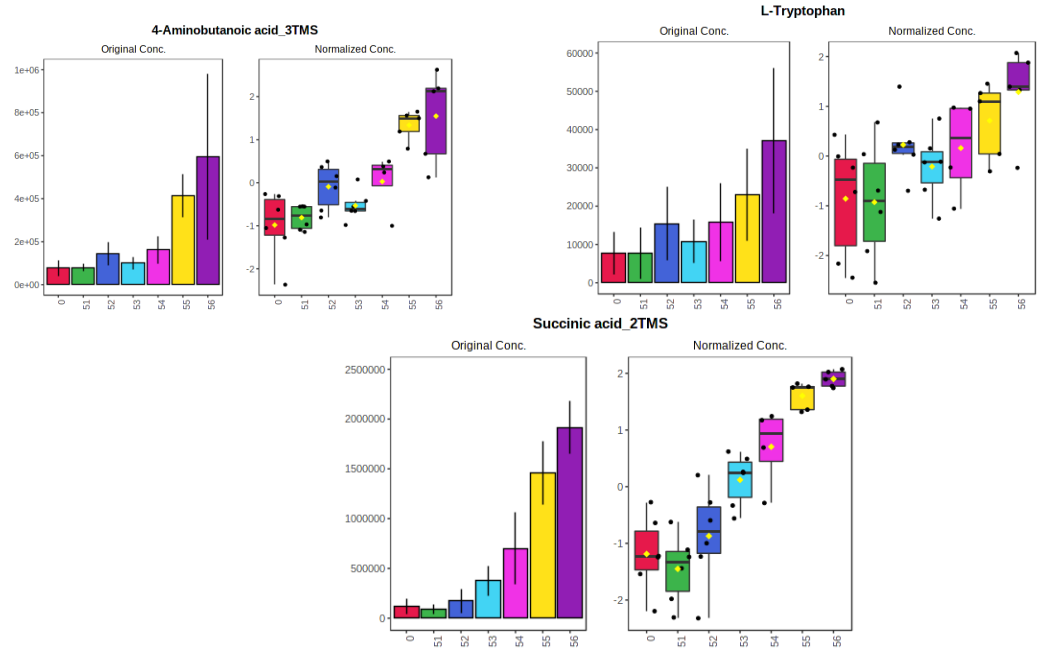
Wattagnet: <http://www.wattagnet.com/WattPoultry>

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης: <https://www.minagric.gr>

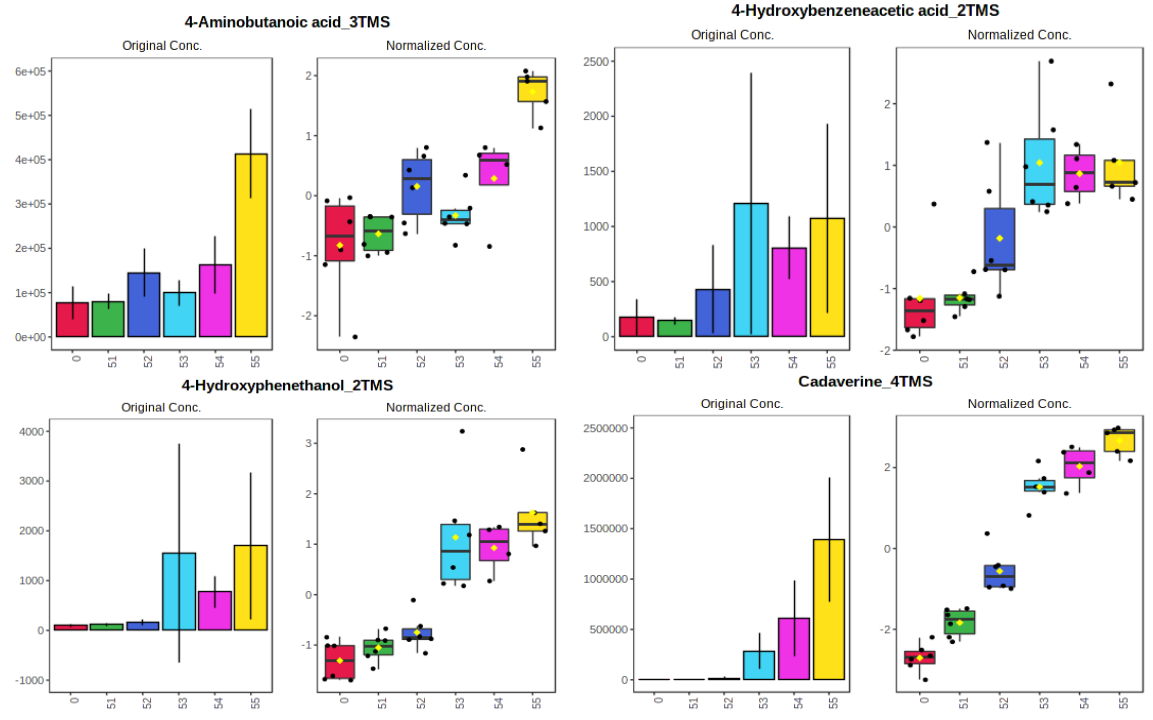
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

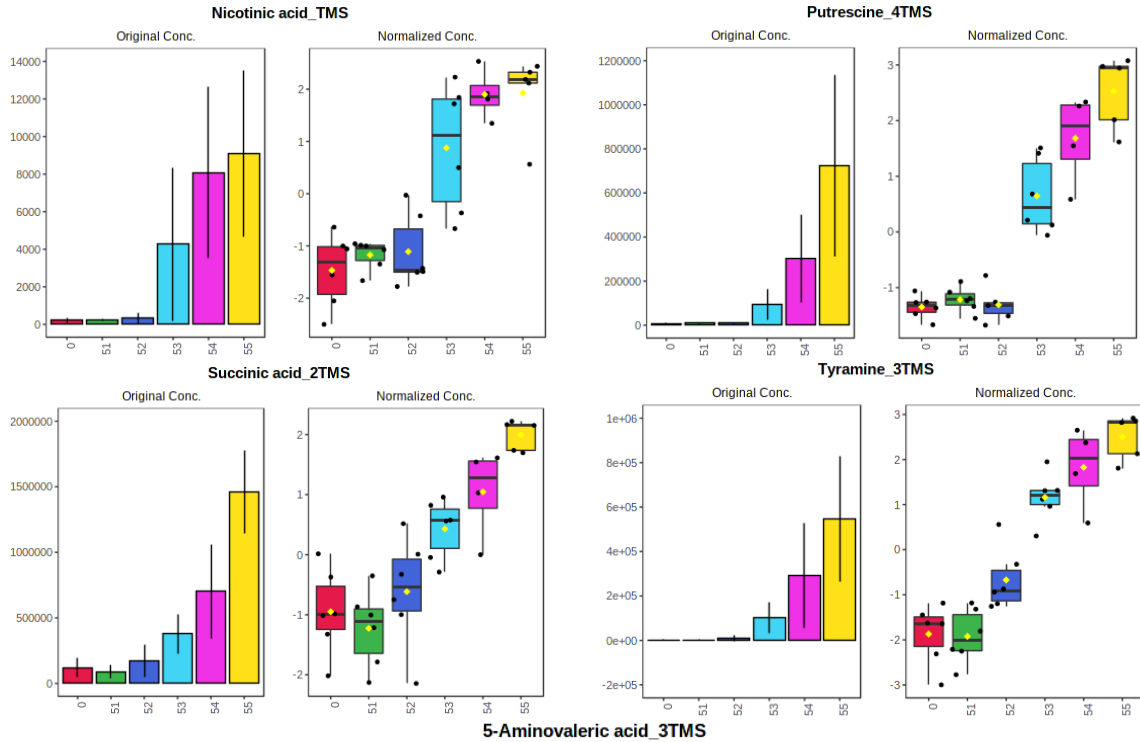
**Π-1. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του μπουτιού κοτόπουλου.**



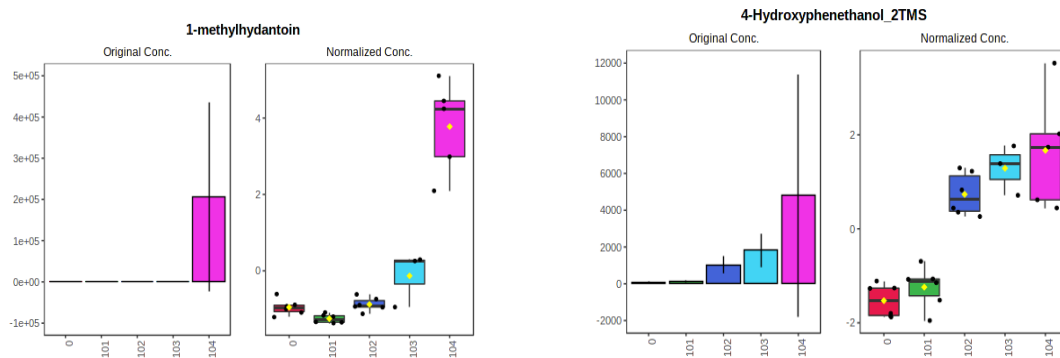


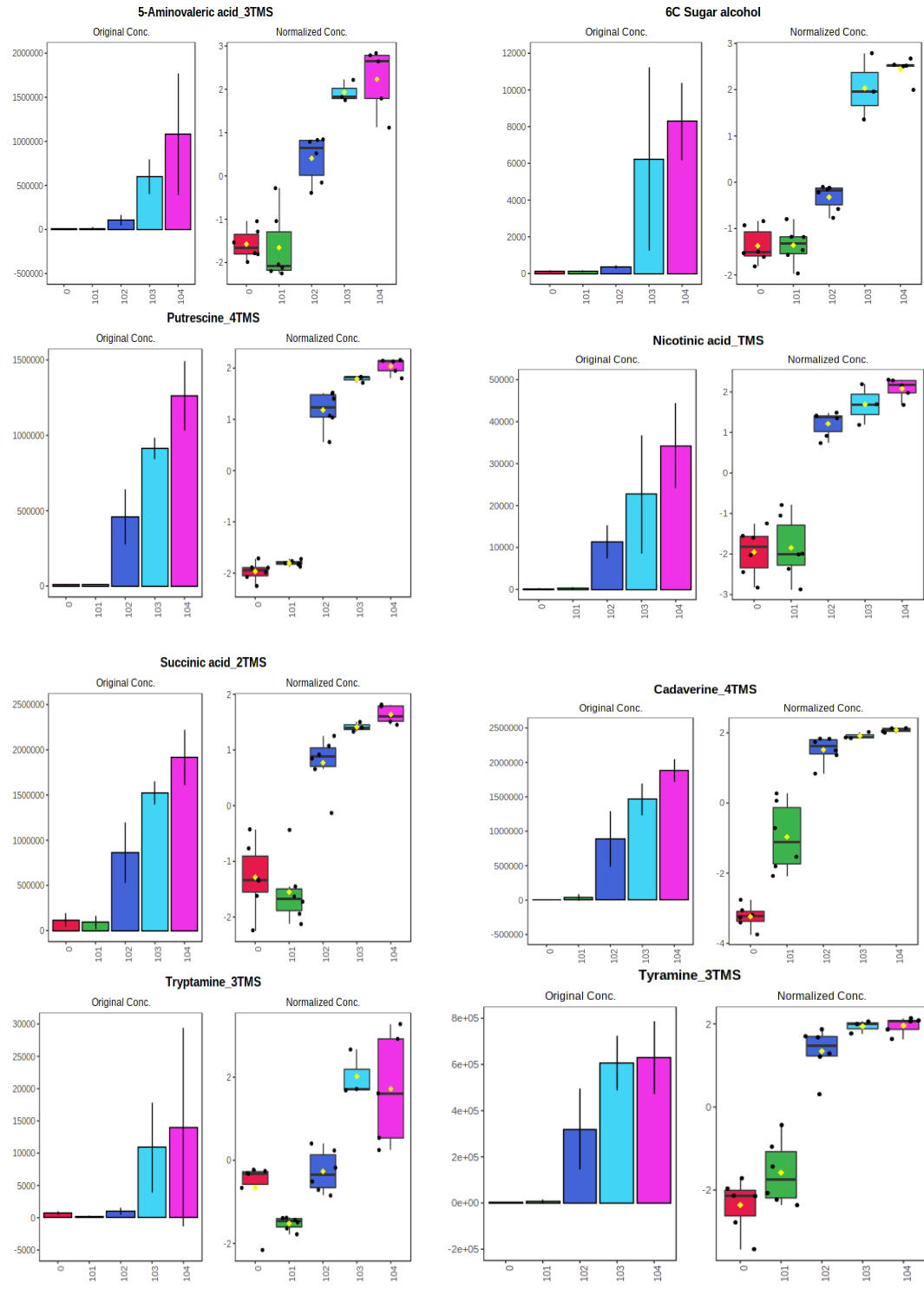
5°C





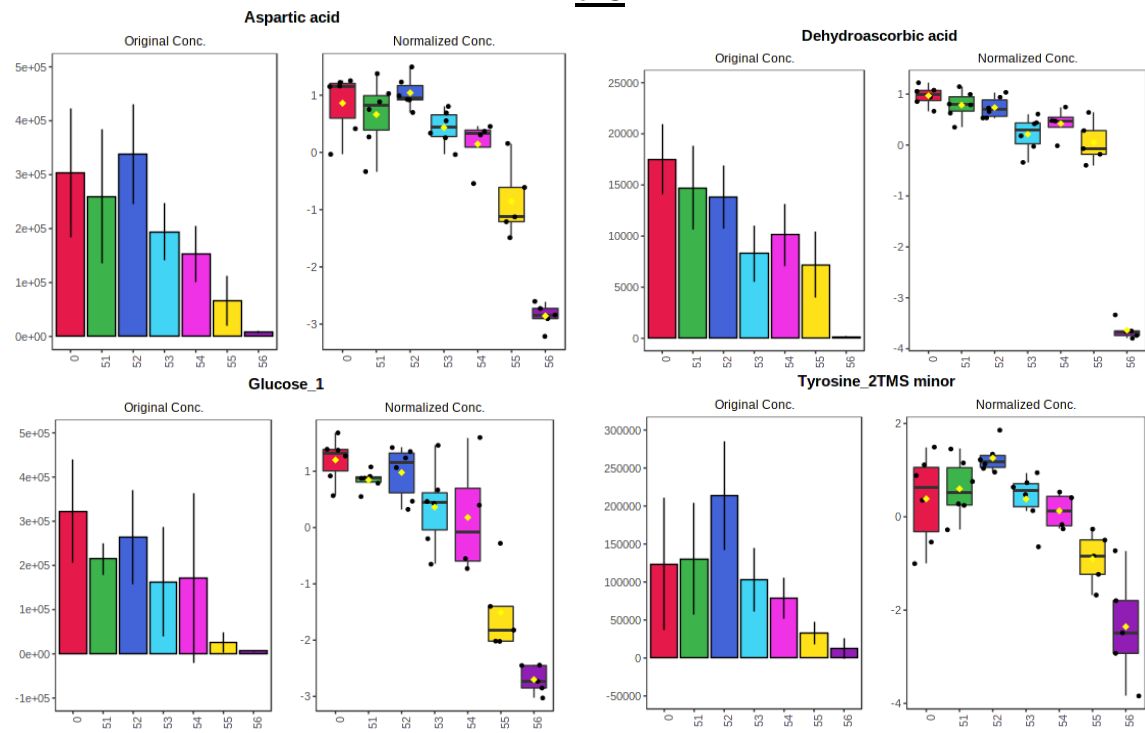
10°C



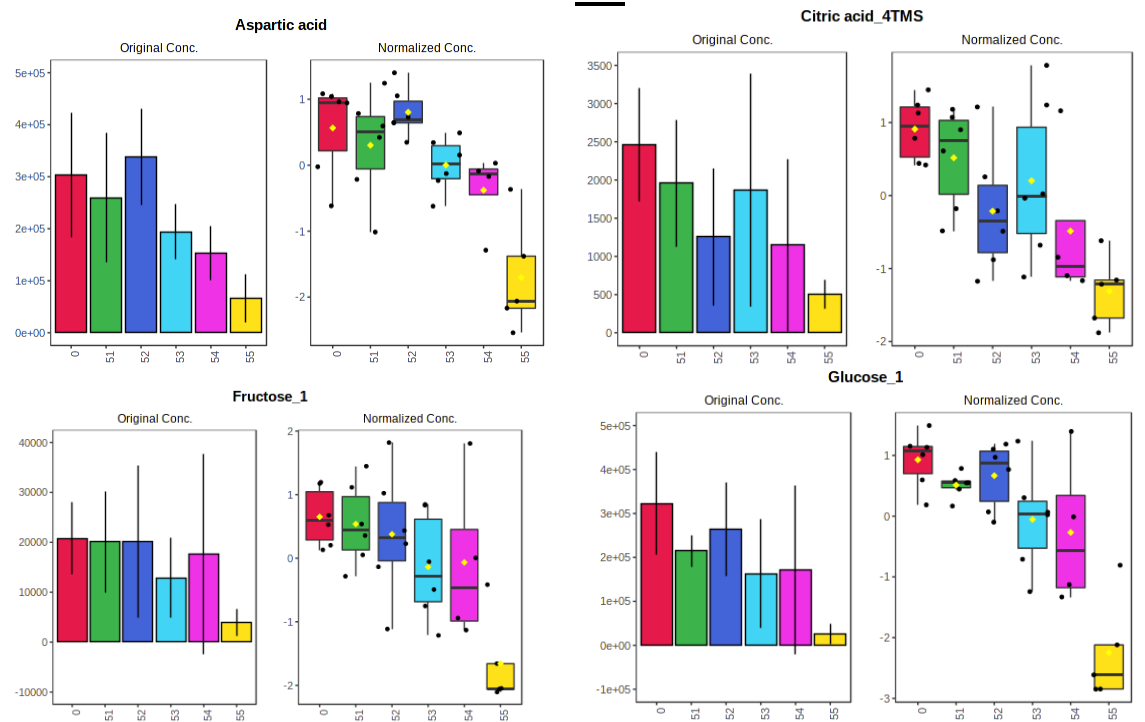


**Π.2. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν μειωμένη τάση κατά τη διάρκεια της συντήρησης του μπουτιού κοτόπουλου.**

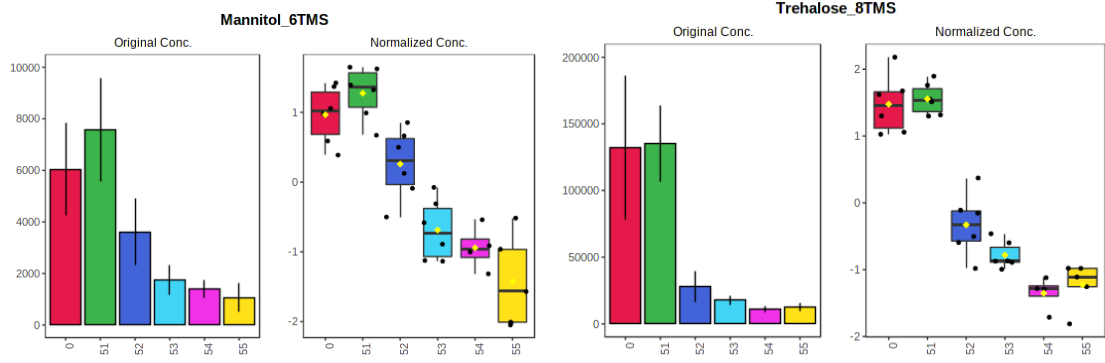
0°C



5°C







10°C

