ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Περιγραφή της ποιότητας ιχθυηρών με τη χρήση μικροβιολογικών οργανοληπτικών μεθόδων και ταχειών τεχνολογιών»



Αικατερίνη Ν. Λουλούδα

Επιβλέπων Καθηγητής: Νυχάς Ε. Γεώργιος – Ιωάννης

Αθηνα 2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Περιγραφή της ποιότητας ιχθυηρών με τη χρήση μικροβιολογικών οργανοληπτικών μεθόδων και ταχειών τεχνολογιών»

«Microbiological, sensory methods and rapid technologies for assessing fishery quality»

Αικατερίνη Ν. Λουλούδα

<u>Εξεταστική Επιτροπή:</u>

Νυχάς Ε. Γεώργιος – Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων) Πανάγου Ζ. Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ Μήλιου – Μπαρσάκη Α. Ελένη, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Περιγραφή της Ποιότητας Ιχθυηρών με τη χρήση Μικροβιολογικών Οργανοληπτικών Μεθόδων και Ταχειών Τεχνολογιών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναζήτηση αποτελεσματικών μεθόδων συντήρησης των ψαριών καθώς και της μείωσης της ποσότητας ψαριών που απορρίπτονται λόγω της ταχείας αλλοίωσής τους, είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη βιομηχανία τροφίμων. Η θερμοκρασία συντήρησης και η ατμόσφαιρα συσκευασίας μπορούν να μεταβάλλουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής των προϊόντων. Τα ψάρια, κατά την επεξεργασία, μεταφορά και αποθήκευσή τους συστήνεται να συντηρούνται σε συνθήκες ψύξης, στους 0-4°C. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση του CO₂ και του O₂ στη συσκευασία επηρεάζουν σημαντικά τη μικροβιολογική και χημική αλλοίωση των ψαριών. Συνεπώς, η κατάλληλη σύσταση αερίων στη συσκευασία τροποποιημένων ατμοσφαιρών μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση του χρόνου ζωής των φρέσκων ψαριών.

Η παρακολούθηση της αλλοίωσης των ψαριών μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικίλες μεθόδους, όπως η απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού και η οργανοληπτική αξιολόγηση. Ωστόσο, η χρήση ταχειών, χαμηλού κόστους, μη επεμβατικών μεθόδων ή μεθόδων που απαιτούν μικρό δείγμα, όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου και ορατού (FTIR και MSI), εξασφαλίζει αποτελεσματικούς και συνεχείς ελέγχους μεγάλης κλίμακας. Οι αισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με διάφορες στατιστικές μεθόδους (όπως η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-R) για την ανάπτυξη μοντέλων εκμάθησης και την πρόβλεψη της αλλοίωσης των ψαριών.

Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν φιλέτα τσιπούρας και λαβρακιού, συσκευασμένα σε αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) (CO2: 31-34% και O2: 23-24%) τα οποία συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 0, 4, 8 και 12°C. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν ανά τακτικά χρονικά διαστήματα σε δύο δείγματα κάθε φορά. Έγιναν μικροβιολογικές αναλύσεις για τον καθορισμό της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC), Pseudomonas spp., μκροοργανισμούς που παράγουν H₂S (Shewanella spp.), Enterobacteriaceae, B. thermosphacta, γαλακτικά βακτήρια (LAB) και ζύμες. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος, μέτρηση του pH και της συγκέντρωσης (%) των αερίων CO2 και O2. Επιπλέον εφαρμόστηκε φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (ATR-FTIR) καθώς και ανάλυση πολυφασματικών εικόνων (MSI) με το όργανο VideometerLab στην επιδερμίδα και στη σάρκα των φιλέτων. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε το πρωτογενές μοντέλο Baranyi & Roberts για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης των υπό μελέτη μικροοργανισμών. Τέλος, συσχετίστηκαν τα φασματικά δεδομένα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας την παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R), με τα πρώτα να αποτελούν τις εισερχόμενες και τα δεύτερα τις εξερχόμενες μεταβλητές των PLS-R μοντέλων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης και η συσκευασία υπό MAP οδήγησαν σε μείωση του ρυθμού της μικροβιακής αλλοίωσης και αύξηση του χρόνου ζωής των δειγμάτων. Η οργανοληπτική απόρριψη των δειγμάτων σε αέρα καταγράφηκε στις 258, 126, 78, 66 ώρες και 215, 143, 82, 58 ώρες στους 0, 4, 8, 12°C, στη τσιπούρα και το λαβράκι αντίστοιχα. Αντίθετα, στις συσκευασίες MAP η οργανοληπτική απόρριψη καταγράφηκε στις 281, 257, 113, 71 ώρες και 377, 257, 113, 95 ώρες, στους 0, 4, 8, 12°C, στη τσιπούρα και το λαβράκι αντίστοιχα.

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί ήταν τα *Pseudomonas* spp. και ακολουθούνταν από τα *Shewanella* spp. και τα Enterobacteriaceae. Παρατηρήθηκε σημαντική παρεμπόδιση της ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp. στις συσκευασίες MAP, συγκριτικά με τις συσκευασίες σε αέρα (ρυθμοί ανάπτυξης 0.009-0.012 h⁻¹ και 0.044-0.047 h⁻¹ αντίστοιχα, στους 0 °C). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μικρή μείωση των ρυθμών ανάπτυξης των *Shewanella* spp. και Enterobacteriaceae στις συσκευασίες MAP συγκριτικά με τις συσκευασίες σε αέρα (λ. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μικρή μείωση των ρυθμών ανάπτυξης των *Shewanella* spp. και Enterobacteriaceae στις συσκευασίες MAP συγκριτικά με τις συσκευασίες σε αέρα. Οι μικροοργανισμοί *B. thermosphacta*, τα γαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες, βρίσκονταν σε χαμηλούς πληθυσμούς στα δείγματα και δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μεταξύ των δύο διαφορετικών συσκευασιών.

Το pH δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή και κυμαίνονταν από 6 έως 7 κατά τη διάρκεια του χρόνου, σε όλες τις συνθήκες συντήρησης.

Τα μοντέλα PLS-R που αναπτύχθηκαν για τη πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού στα δείγματα, χρησιμοποιώντας τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από το FTIR, είχαν καλή απόδοση στις περιπτώσεις των φασμάτων που λήφθηκαν από την επιδερμίδα των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε αέρα. Για την εκπαίδευση των μοντέλων αυτών, επιλέχθηκαν τα δεδομένα από τις θερμοκρασίες 0, 4 και 12°C, ενώ για την επικύρωση χρησιμοποιήθηκε η ενδιάμεση θερμοκρασία των 8°C. Οι δείκτες επίδοσης ήταν ικανοποιητικοί, με $R_{cv}^2 = 0.74$, $R_p^2 = 0.70$ για την τσιπούρα και $R_{cv}^2 = 0.72$, $R_p^2 = 0.69$ για το λαβράκι. Επιπλέον, ένα ακόμα μοντέλο αναπτύχθηκε στην περίπτωση της σάρκας των δειγμάτων τσιπούρας σε συσκευασία ΜΑΡ. Για την εκπαίδευση του μοντέλου επιλέχθηκαν τα δεδομένα από το πρώτο δείγμα κάθε ανάλυσης και για την επικύρωση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του δεύτερου δείγματος. Οι δείκτες επίδοσης ήταν ικανοποιητικοί, με R_{cv}^2 = 0.66 και R_{p}^2 = 0.66. Η ανάπτυξη μοντέλων για την εκτίμηση της αλλοίωσης των ψαριών χρησιμοποιώντας τα δεδομένα MSI (VideometerLab) δεν ήταν αποτελεσματική για την επιδερμίδα των δειγμάτων, ενώ στην περίπτωση της σάρκας των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε ΜΑΡ, τα μοντέλα που εφαρμόστηκαν είχαν καλύτερη επίδοση. Οι δείκτες επίδοσης ήταν ικανοποιητικοί, με R_{cv}^2 = 0.66, R_{p}^2 = 0.74 για την τσιπούρα και R_{cv}^2 = 0.80, R_p^2 = 0.64 για το λαβράκι.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις - κλειδιά: μικροβιακή αλλοίωση, συσκευασία, τροποποιημένη ατμόσφαιρα, θερμοκρασία συντήρησης, MSI, FTIR, πολυφασματική ανάλυση, φασματοσκοπία υπερύθρου

Microbiological, sensory methods and rapid technologies for assessing fishery quality

Department of Food Science and Human Nutrition Laboratory of Foods Microbiology and Biotechnology

ABSTRACT

Fish conservation and food waste reduction due to spoilage are very important for food industry. Shelf-life of fish products can be affected both by storage temperature and atmosphere packaging. Recommended preservation temperature for fish during handling, transport and storage is 0-4°C. Moreover, microbiological and chemical spoilage of fish is affected by the concentration of CO_2 and O_2 at the atmosphere package. Therefore, proper gas concentration at modified atmosphere packaging (MAP) contributes to shelf-life extension of fresh fish.

Freshness of fish can be established by various indicators, including microbial enumeration methods and sensory evaluation. However, in order to ensure constant, large-scale and effective monitoring, rapid, low cost, non-invasive methods, or methods requiring a small sample have to be employed (infrared and visible spectroscopy). The use of sensors, in tandem with various statistical techniques (partial least square regression, PLS-R) could provide machine learning models for prediction of fish spoilage.

Sea bream and European sea bass fillets were studied, in air and under modified atmosphere packaging conditions (MAP) (CO₂: 31-34% and O₂: 23-24%), stored at different conditions (0, 4, 8 and 12°C). At regular time intervals during storage, duplicate samples were analysed. Fillets were subjected to microbiological analysis for the determination of the total viable counts (TVC), Enterobacteriaceae species, *Pseudomonas* spp., H₂S-producing bacteria (*Shewanella* spp.), *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria (LAB) and yeasts. At the same time, organoleptic control, pH measurement, CO₂ and O₂ concentration (%) measurement were performed. Moreover, Attenuated total reflection - Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and Multispectral image analysis (MSI) with VideometerLab instrument, were applied at both sides of fillets. The primary model of Baranyi & Roberts was fitted to the derived microbiological data and the growth kinetic parameters for the aforementioned microbial groups were estimated. Correlation between spectral/ imaging data and total viable counts was established using the partial least squares regression (PLS-R), with the former constituting the input and the latter the output variables in the PLS-R models.

Extended shelf-life of samples was detected due to MAP and low storage temperature. Shelf-life of fish in air packaging, according to sensory evaluation, was 258, 126, 78, 66 hours and 215, 143, 82, 58 hours at 0, 4, 8, 12°C, for sea bream and sea bass respectively. However, under MAP conditions, shelf-life of fish was augmented at 281, 257, 113, 71 hours and 377, 257, 113, 95, at 0, 4, 8, 12°C, for sea bream and sea bass respectively.

The predominant microflora consisted mainly of *Pseudomonas* spp., followed by *Shewanella* spp. and Enterobacteriaceae. Prevention of *Pseudomonas* spp. growth was observed under

MAP conditions, compared to air packaging conditions (growth rate of 0.009-0.012 h⁻¹ and 0.044-0.047 h⁻¹ respectively, at 0°C). Moreover, the growth of *Shewanella* spp. and Enterobacteriaceae was slightly decreased under MAP conditions compared to air packaging conditions. Microbiological population of *B. thermosphacta*, LAB and yeasts was low, and did not quite change under MAP packaging.

No considerable differences in the pH values of fish were observed among the different storage conditions during time, ranging from 6 to 7.

PLS-R models developed to predict the microbial population using the spectral data obtained from the FTIR, performed well for fish skin samples in air and for fish flesh samples under MAP conditions. In the case of fish skin samples in air, data set derived from storage at 0, 4, 12 °C was used for model calibration, while data set from storage at 8°C was used for model prediction. Performance indicators were satisfactory ($R_{cv}^2 = 0.74$, $R_p^2 = 0.70$ for sea bass and $R_{cv}^2 = 0.72$, $R_p^2 = 0.69$ for sea bream). In the case of fish flesh samples under MAP conditions, data set derived from the first sample of each analysis was used for model calibration, while data set from the second sample was used for model prediction. Performance indicators were satisfactory for sea bream ($R_{cv}^2 = 0.66$ and $R_p^2 = 0.66$). On the contrary, models developed using MSI (VideometerLab) data of skin samples did not perform well, while models based on MSI data of flesh samples under MAP conditions had a better performance. In this case, performance indicators were $R_{cv}^2 = 0.66$, $R_p^2 = 0.74$ for sea bass and $R_{cv}^2 = 0.80$, $R_p^2 = 0.64$ for sea bream.

Scientific area: Food Microbiology

Key words: microbial spoilage, package, modified atmosphere, storage temperature, MSI, FTIR, multispectral imaging, infrared spectroscopy

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά για την ανάθεση του θέματος της παρούσας μελέτης και την καθοδήγηση για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή Ευστάθιο Πανάγου και την καθηγήτρια Ελένη Μήλιου-Μπαρσάκη, για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη του παρόντος κειμένου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Διδάκτορα Πασχαλίτσα Τρυφινοπούλου που μου προσέφερε την απαραίτητη καθοδήγηση και συμβουλές σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, τόσο κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Γκόβαρη, στο πρώην μέλος προσωπικού εργαστηρίου Σοφία Βόρρη και τον Θεοδόση Δημητριάδη για την άψογη συνεργασία και υποστήριξη κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Λεμονιά-Χριστίνα Φένγκου και Παναγιώτη Τσακανίκα για τις χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες τους στην επεξεργασία των δεδομένων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία και συνύπαρξη στο χώρο του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ПЕРІЛНѰН	3
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Γενικά στοιχεία	10
1.2 Περιγραφή βιολογίας τσιπούρας και λαβρακιού	11
1.2.1 Τσιπούρα	11
1.2.2 Λαβράκι	12
1.3 Σύσταση σάρκας, βασικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες των ψαριών	13
1.4 Μεταθανάτιες αλλαγές των ψαριών	14
1.5 Αλλοίωση ψαριών	14
1.5.1 Αυτολυτική ενζυμική αλλοίωση	15
1.5.2 Οξειδωτική αλλοίωση	15
1.5.3 Μικροβιολογική αλλοίωση	16
1.5.3.1 Ειδικοί αλλιωγόνοι μικροοργανισμοί	
1.5.3.2 Προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού	20
1.5.3.3 Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις	21
1.6 Θεωρία των εμποδίων (Hurdle Technology)	22
1.6.1 Επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας στη συντήρηση των ψαριών	23
1.6.2 Επίδραση της συσκευασίας ΜΑΡ στη συντήρηση των ψαριών	24
1.6.2.1 Αέρια που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία ΜΑΡ	25
1.6.2.2 Μικροβιολογια της συσκευασίας ΜΑΡ	27
1.6.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στη συσκευασία ΜΑΡ	27
1.6.2.4 Μη μικροβιολογικη επιδραση της συσκευασίας ΜΑΡ	28
1.7 Ταχείες και μη επεμβατικές μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της ιχθυηρών	αλλοίωσης 28
1.7.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analy	/sis) 29
1.7.1.1 VideometerLab	29
1.7.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)	
1.7.2.1 Οργανολογία φασματοφωτόμετρου FTIR	
1.7.2.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας C Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR))λικής 35
1.8 Μικροβιολογία Πρόρρησης	
1.8.1 Κινητική των μικροοργανισμών	

1.8.2 Μοντέλα πρόβλεψης3ξ
1.8.3 Βασικά στοιχεία για τα Πρωτογενή Μοντέλα
1.9 Σκοπός της μελέτης42
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός43
2.2 Δειγματοληψία και μικροβιολογικές αναλύσεις43
2.3 Μέτρηση αερίων
2.4 Οργανοληπτικός έλεγχος45
2.5 Μέτρηση pH45
2.6 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging)45
2.7 Εφαρμογή Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)47
2.8 Κινητικές παράμετροι μικροβιακής ανάπτυξης4ξ
2.9 Στατιστική ανάλυση – Κατασκευή μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης ανάπτυξης μικροοργανισμών4ξ
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
3.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων51
3.2 Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής αύξησης57
3.3 Οργανοληπτικός έλεγχος65
3.4 Αποτελέσματα μέτρησης pH65
3.5 Αποτελέσματα μέτρησης αερίων67
3.6 Αποτελέσματα δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης
3.7 Αποτελέσματα δεδομένων FTIR72
3.8 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμισης με την μέθοδο των μερικων ελαχίστων τετραγώνων74
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ87
ПАРАРТНМА І
ПАРАРТНМА II
ПАРАРТНМА III

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία

Με τον όρο ιχθυηρά χαρακτηρίζονται τα ψάρια, τα οστρακόδερμα και κάθε ζωντανός υδρόβιος οργανισμός που μπορεί να καταναλωθεί από τον άνθρωπο. Ο κώδικας τροφίμων και ποτών ορίζει ως νωπά ιχθυηρά, τα ιχθυηρά που διατίθενται αμέσως μετά την αλιεία ή συσκευάζονται μέσα σε τριμμένο πάγο και έτσι φέρονται στην κατανάλωση. Φρέσκο ψάρι είναι εκείνο στο οποίο δεν έχει εφαρμοστεί άλλη μέθοδος συντήρησης εκτός από την ψύξη (FAO, 2020) και μπορεί να πωληθεί ολόκληρο, καθαρισμένο και εκσπλαχνισμένο ή φιλετοποιημένο. Σύμφωνα με τον FAO (2020), φιλέτο ψαριού είναι μια φέτα από το ψάρι, κομμένη παράλληλα με τη ράχη του, σε ακανόνιστο μέγεθος και σχήμα. Τα φιλετα ψαριού παρουσιάζουν υψηλό ενδιαφέρον αλλά ταυτόχρονα και μικρότερη διάρκεια ζωής. Η διάρκεια ζωής των φρέσκων ψαριών μπορεί να επεκταθεί σημαντικά με τον συνδυασμό των χαμηλών θερμοκρασιών και τη συσκευασίας σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες. Συσκευασία τροποποιημένης ατόσφαιρας (MAP) είναι η συσκευασία στην οποία η ατμόσφαιρα που περιβάλλει το ψάρι είναι διαφορετική από την κανονική σύσταση του αέρα.

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί ένα σημαντικό τομέα της Αγροτικής Ανάπτυξης και ορίζεται ως η εκτροφή ιχθυηρών θαλάσσης και γλυκού νερού σε ελεγχόμενο περιβάλλον, είτε σε κάποια φάση είτε σε όλόκληρο τον κύκλο ζωής τους (FAO, 2020). Η παγκόσμια παραγωγή που προέρχεται από τις υδατοκαλλιέργειες ανήλθε σε 82,1 εκατομύρια τόννους το 2018 (FAO, 2018) αποτελώντας το 46% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ψαριών, με μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 4,5% για τα έτη 2010 - 2018 (Εικόνα 1.1). Στην Ευρώπη, η παραγωγή από τις υδατοκαλλιέργειες ήταν 3,1 εκατομύρια τόννοι το 2018 (FAO, 2018). Κατά τους Doxa και συνεργάτες (2011) η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια της Ευρώπης κυριαρχείται από τρία είδη, το σολομό, το λαβράκι και την τσιπούρα. Στη Μεσόγειο η εκτροφή περιορίζεται στην τσιπούρα και το λαβράκι (Kalinowski et al., 2005) και αποτελεί μια από τις κύριες πηγές παραγωγής ψαριών στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η συνολική παραγωγή τσιπούρας το 2018 στην Ελλάδα ανήλθε σε 56185 τόννους, ενώ του λαβρακιού ανήλθε σε 47028 τόννους (ΕΛΣΤΑΤ, 2020).



Εικόνα 1.1 Παγκόσμια χρήση και προμήθεια ψαριών (FAO, 2018).

1.2 Περιγραφή βιολογίας τσιπούρας και λαβρακιού

1.2.1 Τσιπούρα

Η τσιπούρα (Sparus aurata Linnaeus, 1758) ανήκει στην οικογένεια Sparidae και στην ομοταξία των οστεϋχθίων. Συνήθως αναφέρεται και ως Chrysophrys aurata, Chrysophrys crassirostris και Pagrus auratus, ενώ η αγγλική της ονομασία είναι Gilthead seabream (FAO). Είναι ασημόγκριζο ψάρι και διακρίνεται από μία χρυσοκίτρινη ταινία, που ενώνει τα μάτια και μία σκουρόχρωμη κηλίδα πίσω από τα βραγχιακά επικαλύμματα. Το μήκος του είναι 30 - 70 cm (συνήθως 30 - 35 cm), με ατρακτοειδές, πεπιεσμένο πλευρικά σώμα, με ψηλή ράχη και λεπτή βάση ουράς. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι ενιαίο και αποτελείται εν μέρει από ακανθώδεις ακτίνες στο ύψος του θώρακα και από το ουραίο διχαλωτό πτερύγιο. Η πλευρική γραμμή στο σώμα της τσιπούρας είναι διακριτή. Διαθέτει μικρά μάτια, εμφανή ρουθούνια, λεπτά χείλη και το στόμα της είναι ημιτελικό με σταυρό επάνω. Στην Εικόνα 1.2 φαίνεται η εξωτερική και η εσωτερική μορφολογία των οστεϊχθύων.



Εικόνα 1.2 Εξωτερική και εσωτερική μορφολογία οστεϊχθύος (τσιπούρας).

Η τσιπούρα συναντάται κυρίως στη Μεσόγειο θάλασσα, στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό και, λιγότερο συχνά, στη Μαύρη θάλασσα. Πρόκειται για ευρύθερμο και ευρύαλο είδος που ζει συχνά κοντά σε αμμώδεις ή ιλοαμμώδεις ακτές, σε βάθος από 5 έως 30 m τα νεαρά άτομα και έως 150 m τα ενήλικα. Οι διατροφικές του συνήθειες στο φυσικό του περιβάλλον εξαρτώνται από το μέγεθός του. Τα μικρού μεγέθους ιχθύδια τρέφονται με ζωοπλαγκτόν, ενώ τα μεγαλύτερα άτομα προτιμούν τα μαλάκια, κυρίως μύδια και γαστερόποδα, καρκινοειδή και μικρού μεγέθους ψάρια (Χώτος και Ρογδάκης, 1992). Είναι κυρίως σαρκοφάγα αλλά μπορούν να γίνουν και φυτοφάγα. Περιγράφεται ως μοναχικό είδος που σπάνια σχηματίζει μικρές ομάδες. (http://species-identification.org/index.php)

Η τσιπούρα είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος, δηλαδή γεννιέται ως αρσενικό και στο τέλος του 2^{ου} και αρχή του 3^{ου} έτους γίνεται αναστροφή φύλου και αρχίζουν να εμφανίζονται θηλυκά άτομα. Παρόλα αυτά, η σεξουαλική αναστροφή δε φαίνεται να επηρεάζει το σύνολο των ατόμων, αφού μερικά από αυτά παραμένουν αρσενικά σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν ή απλώς συμβάλλουν στην αλλαγή αυτή δεν έχουν εξακριβωθεί με σαφήνεια. Υποστηρίζεται ότι, εκτός από την ηλικία, είναι πιθανό το βάρος των ψαριών και η διατροφή τους να επηρεάζει αυτό το φαινόμενο (Kawai, 1996). Η αναπαραγωγή συμβαίνει από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο, με αλληλουχίες αναπαραγωγής κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου. Ένα θηλυκό γεννάει 20000 - 80000 αυγά καθημερινά, κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Ο γόνος κολυμπάει αρχικά στα ρηχά νερά, όπου υπάρχει μεγαλύτερη ασφάλεια και αφθονία τροφής, έως τον επόμενο Οκτώβριο όπου ενσωματώνεται στο αρχικό κοπάδι και

λαμβάνει μέρος στην αναπαραγωγή (<u>www.fishbase.org</u>). Όσον αφορά το βάρος, άτομα μέχρι 200 gr είναι συνήθως αρσενικά και μετά αλλάζουν φύλλο (Χώτος και Ρογδάκης, 1992). Αναφέρεται πως το μέγιστο βάρος σώματος της τσιπούρας μπορεί να φτάσει τα 16 με 18 κιλά, με μήκος σώματος που φτάνει τα 60 - 70 cm, ενώ είναι δυνατόν να φτάσει μέχρι την ηλικία των 10 - 15 ετών.

1.2.2 Λαβράκι

Το λαβράκι (*Dichentrarchus labrax Linnaeus, 1758*) ή European seabass (FAO), ανήκει στην οικογένεια Moronidae και στην ομοταξία των οστεϋχθίων. Το χρώμα του είναι ασημί - γκρι ενώ μερικές φορές φέρει υποκίτρινο χρώμα στην κοιλιά. Τα νεαρά άτομα εμφανίζουν σκούρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματός τους σε αντίθεση με τα ενήλικα που δεν φέρουν καθόλου κηλίδες. Το σώμα του είναι επίμηκες και το μήκος του φτάνει συνήθως στα 50 cm (μπορεί να φτάσει και τα 100 cm). Το μέγιστο μέγεθος που μπορεί να αποκτήσει είναι τα 103 cm, μέγιστο βάρος τα 12 kg και μέγιστη ηλικία τα 15 χρόνια. Το ραχιαίο πτερύγιο του λαβρακιού είναι διπλό ενώ το ουραίο μέτρια διχαλωτό, η πλευρική γραμμή είναι εκτεταμένη αλλά δεν εκτείνεται μέχρι την ουρά, το βραγχιακό επικάλυμμα αποτελείται από δύο πλατιά οστά και το στόμα είναι αιχμηρό, προεξέχοντας ελαφρώς. Στην εικόνα 1.3 φαίνεται η εξωτερική μορφολογία του λαβρακιού.



Εικόνα 1.3 Εξωτερική μορφολογία λαβρακιού www.fishbase.org

Το λαβράκι συνανταται στη Μεσόγειο και στη Μαύρη θάλασσα καθώς και στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό από τη Νορβηγία έως τη Σενεγάλη. Γενικά, είναι είδος ευρύθερμο με μεγάλο εύρος επιβίωσης σε θερμοκρασίες 8 - 30 °C (άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 22 °C) και ευρύαλο με δυνατότητα προσαρμογής των μεγάλων ατόμων και σε γλυκά νερά. Προτιμά να ζει σε υφάλμυρα, παράκτια ύδατα, σε εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες. Τα ενήλικα άτομα είναι βενθοπελαγικά, ζουν σε παράκτια νερά μέχρι 100 m βάθος, αλλά συχνότερα σε ρηχά νερά. Προτιμούν τους ιλυοαμμώδεις πυθμένες, κοντά σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες, γιατί σε αυτές τις περιοχές βρίσκουν βενθικούς οργανισμούς, κατάλληλους για τη διατροφή τους. Μπαίνουν στα παράκτια ύδατα και εκβολές ποταμών το καλοκαίρι, αλλά μεταναστεύουν βαθύτερα όταν είναι ψυχρότερες οι καιρικές συνθήκες και μετακινούνται σε βαθιά νερά κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε βόρεια γεωγραφικά πλάτη. Τα νεαρά λαβράκια ζουν σε κοπάδια, αλλά τα ενήλικα φαίνεται να είναι περισσότερο μοναχικά (FAO, 2020). Είναι γονοχωριστικό είδος και αναπαράγεται από Ιανουάριο έως Μάρτιο στη Μεσόγειο και στη Μαύρη θάλασσα ενώ αναπαράγεται από Μάρτιο έως Ιούνιο στις Βρετανικές Νήσσους. Τα αρσενικά ωριμάζουν στα 2 έτη (23 - 30 cm), ενώ τα θηλυκά στα 3 έτη (31 - 40 cm).

Το λαβράκι ανήκει στην κατηγορία των αρπακτικών και τρέφεται με σχετικά μεγάλου μεγέθους κινούμενους οργανισμούς. Η διατροφή του είναι ευκαιριακή (τρέφεται με μεγάλο πλήθος ειδών από τα επιφανειακά νερά έως τα μεσόνερα και τον πυθμένα) και είναι αδηφάγο. Τα βασικά του θηράματα είναι τα καβούρια, τα χέλια της άμμου, άλλα μικρά

ψάρια, οι γαρίδες, ενώ μικρότερης σημασίας είναι οι δακτυλιοσκώληκες και τα μαλάκια. Τα νεαρά λαβράκια τρέφονται με ασπόνδυλα, κυνηγώντας περισσότερο μικρά ψάρια όσο αυξάνεται η ηλικία τους.

Πίνακας 1.1 Συστηματική ταξινόμηση των μελετώμενων ειδών

Βασίλειο (Kingdom) Zώα (Animalia) Φύλο (Phylum) Χορδωτά (Chordata) Υποφύλο (Subphylum) Σπονδυλωτά (Vertebrata) Υπερομοταξία (Superclass) Γναθοστόματα (Gnathostomata) Ομοταξία (Class) Οστεϊχθύες (Osteichthyes) Υφομοταξία (Subclass) Ακτυνοπτερύγια (Actinopterygii) Υπερτάξη (Superorder) Τελεόστεοι (Teleostei) Tάξη (Order) Περκόμορφα (Perciformes) Υπόταξη (Suborder) Percoidei Οικογένεια (Family) Σπαρίδες (Sparidae) Μορονίδες (Moronidae) Γένος (Genus) Σπάρος (Sparus) Δικέντραρχος (Dichentrarchus) **Είδος (Species)** Τσιπούρα (Sparus aurata) Λαβράκι (Dichentrarchus labrax)

1.3 Σύσταση σάρκας, βασικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες των ψαριών

Η σάρκα των ψαριών αποτελεί το βρώσιμο μέρος του σώματός τους που αποτελείται από μυικό ιστό. Η χημική σύσταση της σάρκας των ψαριών αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες (18 - 21%) και υγρασία (70 - 80%), ενώ σε μικρότερα ποσοστά υπάρχουν ανόργανα στοιχεία, πτητικές βάσεις όπως είναι η αμμωνία (NH₃), η τριμεθυλαμίνη (TMA) και σε μικρότερα ποσοστά η διμεθυλαμίνη (DMA), το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), τα ελεύθερα αμινοξέα, η ουρία, μη πρωτεΐνικό άζωτο, οι βιταμίνες, οι υδατάνθρακες (κυρίως γλυκογόνο), καθώς και οι πτητικές ενώσεις που προσδίδουν άρωμα στα ψάρια, όπως είναι οι αλκοόλες, οι αλδεΰδες, οι κετόνες, οι αρωματικές ενώσεις και τα τερπένια. Επίσης αποτελείται από λίπος και συγκεκριμένα από τριακυλογλυκερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη και ιχνοποσότητες φωσφολιποειδών.

Η χημική σύσταση των ψαριών ποικίλει όχι μόνο ανάμεσα στα διαφορετικά είδη, αλλά και ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους, γεγονός που οφείλεται στην εποχή, στη θερμοκρασία των υδάτων, στην αλμυρότητα, στη συχνότητα και την ένταση της ηλιοφάνειας, στο μέγεθος, στο βάρος, στην ηλικία, στο φύλο, στην φάση του αναπαραγωγικού κύκλου στην οποία βρίσκονται καθώς και στη γεωγραφική τοποθεσία, ενώ στα ψάρια ιχθυοτροφείου σημαντικό ρόλο στη χημική τους σύσταση διαδραματίζει η διατροφή του ψαριού.

Η κατανάλωση ιχθυηρών αποτελεί σημαντικό στοιχείο μιας ισορροπημένης διατροφής και τα οφέλη στην υγεία του ανθρώπου είναι πολλά. Ενδεικτικά αναφέρεται πως έχουν αποδειχθεί ευεργετικά αποτελέσματα με εφαρμογή δίαιτας που περιλαμβάνει δύο ή τρεις δόσεις ψαριών εβδομαδιαίως σε αναγνωρισμένους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Επιπλέον τα ψάρια αποτελούν πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί πως τη χρονιά 2017 στην Ελλάδα, με συνολική παραγωγή θαλασσινών 203612 τόννων, οι πρωτεϊνες που λήφθηκαν από τα ψάρια αποτέλεσαν το 10% της συνολικής ζωικής πρωτεϊνης και το 5,4% της ολικής πρωτεϊνης ανά άτομο (FAO, 2018).

1.4 Μεταθανάτιες αλλαγές των ψαριών

Μετά τη θανάτωση του ψαριού, και κατά συνέπεια της παύσης λειτουργίας της καρδιάς και του ελέγχου του σώματος από τον εγκέφαλο, η τροφοδοσία των ιστών με οξυγόνο καθίσταται προβληματική. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την γλυκόλυση μέσα στους μυϊκούς ιστούς και την πτώση της τιμής του pH. Όταν η συγκέντρωση της ATP μειωθεί κατά 50%, η ακτινομυοσίνη (βασική πρωτεΐνη των μυϊκών ινών), αρχίζει να χάνει την ελαστικότητά της και συστέλλεται, ενώ ταυτόχρονα χάνει και ένα μέρος από το περιεχόμενο νερό της. Νεκρική ακαμψία (rigor mortis) είναι η διαδικασία μέσω της οποίας το ψάρι, λίγες ώρες μετά τη θανάτωσή του, χάνει την ελαστικότητά του, καθώς οι μύες του γίνονται άκαμπτοι (Adebowale et al., 2008). Η διάρκεια και η έκταση της νεκρικής ακαμψίας εξαρτάται από τον τύπο και τη φυσιολογική κατάσταση του ψαριού. Η διάρκεια αυτή είναι κανονικά μικρότερη στους χονδριχθύες και μεγαλύτερη στα τελεόστεα ψάρια. Η νεκρική ακαμψία εμφανίζεται ταχύτερα στα ψάρια με σκουρόχρωμη σάρκα (σκουμπρί, τόνος, σαρδέλα κλπ.) από ότι στα ψάρια με ανοιχτόχρωμη σάρκα. Ο τρόπος μεταχείρισης των ψαριών στους οποίους δεν έχει ακόμα εκδηλωθεί η νεκρική ακαμψία (pro-rigor) δεν επηρεάζει το χρόνο έναρξης του φαινομένου. Η θερμοκρασία αντιπροσωπεύει το βασικότερο παράγοντα που επιδρά στη νεκρική ακαμψία, με τις υψηλότερες θερμοκρασίες να οδηγούν σε ταχύτερη εξέλιξη του φαινομένου. Η νεκρική ακαμψία έχει μεγάλη σημασία για την τεχνολογία και τον ποιοτικό έλεγχο των αλιευμάτων.

Διακρίνονται δύο βασικά στάδια από τη στιγμή της σύλληψης του αλιεύματος μέχρι το τέλος της νεκρικής ακαμψίας. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη θανάτωση του αλιεύματος μέχρι την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας μέχρι το τέλος της. Τόσο κατά το πρώτο όσο και κατά το δεύτερο στάδιο, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επιβραδύνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα τα αλιεύματα να διατηρούν τα χαρακτηριστικά της απόλυτης φρεσκότητας. Είναι συνεπώς συμφέρον να επιμηκύνεται όσο το δυνατό η διάρκεια των δύο αυτών σταδίων. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων αλίευσης, ώστε να περιορίζεται στο μέγιστο δυνατό η μυϊκή δραστηριότητα, η ασφυξία και η αγωνία του αλιεύματος πριν από τη θανάτωσή του, φθάνοντας στη θανάτωση με υψηλά αποθέματα γλυκογόνου και ΑΤΡ, αλλά και η άμεση ψύξη του αλιεύματος πάνω στα αλιευτικά σκάφη.

1.5 Αλλοίωση ψαριών

Ως αλλοίωση των τροφίμων θεωρείται η υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Huis in't Veld, 1996). Η υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσης των μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξείδωσης (τάγγιση) (Ashie et al., 1996, Gram και Huss, 1996).

1.5.1 Αυτολυτική ενζυμική αλλοίωση

Αμέσως μετά τη θανάτωση του ψαριού πραγματοποιούνται χημικές και βιολογικές αλλαγές λόγω της ενζυμικής αποδόμησης των περισσότερων μορίων (FAO, 2005). Κατά τα αρχικά στάδια της αλλοίωσης, τα αυτολυτικά ένζυμα υποβαθμίζουν την ποιότητα της υφής του ψαριού αλλά δεν προκαλούν υποβάθμιση στην οσμή και τη γεύση (Hansen et al., 1996). Αυτό υποδεικνύει ότι η αυτόλυση μπορεί να περιορίσει τη διάρκεια ζωής και την ποιότητα του προϊόντος ακόμη και με σχετικά χαμηλά επίπεδα αλλοιωγόνων οργανισμών.

Η παραγωγή υποξανθίνης από τον καταβολισμό του ATP έχει άμεση επίδραση στην οσμή των αλλοιωμένων ψαριών. Επίσης, η φορμαλδεϋδη που παράγεται κατά την ενζυμική διάσπαση του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε διμεθυλαμίνη (DMA) και φορμαλδεϋδη (FA) επιδρά στην ποιότητα της δομής των ψαριών. Τα πεπτικά ένζυμα προκαλούν εκτεταμένη αλλοίωση που οδηγεί σε μαλάκωμα της σάρκας, ρήξη του κοιλιακού τοιχώματος και διαρροή νερού από το αίμα, το οποίο περιέχει πρωτεϊνες και λίπος (FAO, 1986). Στους μύες και στα σπλάχνα των αλλιευμένων ψαριών βρίσκεται ένας αριθμός πρωτεολυτικών ενζύμων (όπως οι καθεψίνες και οι κολλαγονάσες) τα οποία συμβάλλουν στην αποδόμηση των μυών και στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, που προάγουν τη μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της επεξεργασίας (Huss, 1995). Σύμφωνα με τους Fraser & Sumar (1998) μπορούν να παραχθούν πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα εξαιτίας της αυτόλυσης των πρωτεϊνών των μυών των ψαριών που οδηγούν στην αλλοίωση της σάρκας τους, ως αποτέλεσμα της μικροβιακής ανάπτυξης και της παραγωγής βιογενών αμινών.

1.5.2 Οξειδωτική αλλοίωση

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια σημαντική αιτία υποβάθμισης και αλλοίωσης των πελαγικών ειδών ψαριών με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες (Fraser και Sumar, 1998). Η οξείδωση των λιπιδίων πραγματοποιείται με έναν μηχανισμό ελεύθερων ριζών τριών σταδίων: έναρξη, διάδοση και τερματισμό (Frankel, 1985, Khayat και Schwall, 1983). Η έναρξη περιλαμβάνει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών λιπιδίων μέσω καταλυτών όπως η θερμότητα, τα μεταλλικά ιόντα και η ακτινοβολία, οι οποίες αντιδρούν με το οξυγόνο και σχηματίζουν υπεροξειδικές ρίζες. Κατά το στάδιο της διάδοσης, οι υπεροξειδικές ρίζες αντιδρούν με άλλα μόρια λιπιδίων για να σχηματίσουν υδροϋπεροξείδια και μια νέα ελεύθερη ρίζα (Fraser και Sumar, 1998, Hultin, 1994). Στο στάδιο του τερματισμού οι συσσωρευμένες ελεύθερες ρίζες αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν μη ριζικά προϊόντα. Η οξείδωση συνήθως περιλαμβάνει την αντίδραση του οξυγόνου με τους διπλούς δεσμούς λιπαρών οξέων. Επομένως, τα λιπίδια των ψαριών που αποτελούνται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση. Το μοριακό οξυγόνο πρέπει να ενεργοποιηθεί για να επιτρέψει την οξείδωση. Κύριοι ενεργοποιητές του μοριακού οξυγόνου είναι τα στοιχεία μετάπτωσης (Hultin, 1994).

Στα ψάρια, η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί να συμβεί ενζυμικά ή μη ενζυμικά. Η ενζυμική υδρόλυση των λιπών από λιπάσες ονομάζεται λιπόλυση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι λιπάσες διασπούν τα γλυκερίδια σχηματίζοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για την υποβάθμιση της γεύσης και της ποιότητας των λιπιδίων (Huis in't Veld, 1996, FAO, 1986). Τα λιπολυτικά ένζυμα μπορούν να προέρχονται είτε από το ίδιο το τρόφιμο είτε από ψυχρότροφους μικροοργανισμούς (Huis in't Veld, 1996). Τα ένζυμα

που εμπλέκονται είναι οι λιπάσες που βρίσκονται στο δέρμα, το αίμα και τους ιστούς των ψαριών. Τα κύρια ένζυμα που συμβάλλουν στην υδρόλυση των λιπιδίων είναι η τριακυλλιπάση και η φοσφωλιπάση A2 και B (Audley et al., 1978, Yorkowski και Brockerhoft, 1965).

Η μη ενζυματική οξείδωση προκαλείται από ενώσεις αιματίνης (αιμογλοβίνη, μυογλοβίνη, κυτόχρωμα) που παράγουν υδροϋπεροξείδια (Fraser και Sumar, 1998). Τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται κατά την υδρόλυση των λιπιδίων των ψαριών αλληλεπιδρούν με σαρκοπλασματικές και μυοϊνιδικές πρωτεΐνες προκαλώντας μετουσίωση (Anderson and Ravesi, 1969, King et al., 1962).

1.5.3 Μικροβιολογική αλλοίωση

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στα νωπά ψάρια (Gram και Dalgaard, 2002). Η μικροβιακή αλλοίωση οδηγεί σε ποικίλες αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, σαν αποτέλεσμα παραγωγής προϊόντων του μικροβιακού μεταβολισμού, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2.

πινακάς 1.2 Ινικροριολογική αλλοιωσή ίχου	npwv (Gram et al., 1996).

Οργανοληπτική εκδήλωση
Παραγωγή δυσάρεστων οσμών και γεύσης
Σχηματισμός γλοιώδους επιφάνειας
Εμφάνιση ορατών, έγχρωμων ή μη αποικιών
Παραγωγή αερίων
Αποχρωματισμός

Η αρχική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών επηρεάζεται από την ποικιλία των οικολογικών ενδιαιτημάτων των ψαριών (γλυκά ή αλμυρά ύδατα, εύκρατα, τροπικά ή αρκτικά ύδατα, κολύμπι κοντά στην επιφάνεια ή τον πυθμένα και βαθμός ρύπανσης) αλλά και από την ποικιλία των πρακτικών αλίευσης και επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται. Παρόλα αυτά, τα είδη μικροοργανισμών που τελικά θα επικρατήσουν εξαρτώνται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν σημαντικά τη μικροβιολογία και την αλλοίωση των ψαριών και αναλύονται παρακάτω.

Η μικροβιακή χλωρίδα των φρέσκων ψαριών επηρεάζεται κυρίως από το περιβάλλον στο οποίο διαβούν και λιγότερο από το είδος τους. Η ποικιλόθερμη φύση τους, επιτρέπει σε βακτήρια που αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών να εγκατασταθούν και να επιβιώσουν στις εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες των ζωντανών ψαριών. Έτσι, στα ψάρια των εύκρατων κλιμάτων η μικροβιακή χλωρίδα αποτελείται κυρίως από ψυχρότροφα, αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφα βακτήρια που ανήκουν στα γένη Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Shewanella, Flavobacterium, Vibrio, Photobacterium και Aeromonas ενώ σε μικρότερα ποσοστά (0 - 30% της ολικής χλωρίδας) συναντώνται και θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως τα γένη Bacillus, Micrococcus, Clostridium, Brochothrix, Lactobacillus και Coryneforms (Liston, 1960, Shewan et al., 1960). Η μικροβιακή χλωρίδα των τροπικών ψαριών συνήθως περιέχει ελαφρώς μεγαλύτερο φορτίο θετικών κατά Gram και εντερικών βακτηρίων, αλλά δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με τη μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών των εύκρατων κλιμάτων (Liston, 1980). Επιπρόσθετα, τα ψάρια που αλιεύονται σε ψυχρά κλίματα, όπως αυτά της βόρειας

Ευρώπης, περιέχουν περισσότερους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς (Gram και Huss, 1996, Shewan, 1971).

Η σάρκα των νωπών ψαριών έχει υψηλό pH (συνήθως > 6) λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς της σε υδατάνθρακες και κατά συνέπεια της παραγωγής μικρών ποσοτήτων γαλακτικού οξέως μετά το θάνατο. Το γεγονός αυτό ευνοεί την ανάπτυξη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών όπως το Shewanella putrefaciens. Η υψηλή συγκέντρωση μη πρωτεϊνικού αζώτου (Non Protein Nitrogen, NPN) στη σάρκα των ψαριών αποτελεί επίσης έναν σημαντικό ενδογενή παράγοντα που επηρεάζει τη μικροβιακή αλλοίωση. Το κλάσμα μη πρωτεϊνικού αζώτου αποτελείται από χαμηλού μοριακού βάρους, διαλυτό στο νερό, άζωτο το οποίο περιέχεται σε ενώσεις όπως ελεύθερα αμινοξέα και νουκλεοτίδια και αποτελεί άμεσα διαθέσιμο υπόστρωμα για τη βακτηριακή ανάπτυξη. Το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (Trimethylamine oxide, TMAO), το οποίο είναι μέρος του κλάσματος του NPN, οδηγεί σε υψηλό (θετικό) δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh) στη σάρκα του ψαριού, όμως δεν είναι ακόμα γνωστή η σημασία αυτού του φαινομένου. Η αλλοίωση των νωπών ψαριών επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία του ΤΜΑΟ, ειδικά σε αναερόβιες συνθήκες. Αρκετά αλλοιωγόνα βακτήρια (Shewanella putrefaciens, Photobacterium phosphoreum, Vibrionaceae) χρησιμοποιούν το ΤΜΑΟ σαν τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων κατά την αναερόβια αναπνοή σχηματίζοντας τριμεθυλαμίνη (Trimethylamine, TMA) που οδηγεί σε υποβάθμιση της οσμής και της γεύσης (Gram και Huss, 1996).

Τα βακτήρια των ψαριών των εύκρατων κλιμάτων εισέρχονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης σχεδόν αμέσως μετά την αλίευση. Αυτό συμβαίνει ακόμα και όταν τα ψάρια συντηρούνται σε ψύξη, πιθανώς επειδή η μικροχλωρίδα έχει ήδη προσαρμοστεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Κατά τη συντήρηση σε ψύξη, τα βακτήρια αναπτύσσονται με χρόνο διπλασιασμού τη μία ημέρα και έπειτα από 2 - 3 εβδομάδες θα φθάσουν τα 10⁸ - 10⁹ CFU/g σάρκας ή cm² επιφάνειας. Κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) μπορούν να φθάσουν τα 10⁷ - 10⁸ CFU/g σε μία ημέρα. Τα βακτήρια των ψαριών που αλιεύτηκαν σε τροπικά νερά και συντηρούνται σε ψύξη παραμένουν στη φάση προσαρμογής για 1 - 2 εβδομάδες και έπειτα ξεκινάει η εκθετική φάση. Κατά την αλλοίωση, το επίπεδο των βακτηρίων στα τροπικά ψάρια είναι παρόμοιο με εκείνο των ψαριών των εύκρατων κλιμάτων (Gram et al., 1990).

Σε ψάρια που συντηρούνται σε κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα που περιέχει CO₂ υπό ψύξη, ο πληθυσμός των ψυχρότροφων βακτηρίων, όπως τα Shewanella putrefaciens και Pseudomonas spp., είναι αρκετά μικρότερος ($10^6 - 10^7$ CFU/g) συγκριτικά με τους αντίστοιχους πληθυσμούς στις αερόβιες συνθήκες αποθήκευσης. Ωστόσο, τα βακτήρια με ψυχρόφιλο χαρακτήρα, όπως το Photobacterium phosphoreum φθάνουν τα $10^7 - 10^8$ CFU/g κατά την αλλοίωση (Dalgaard et al., 1993).

Η σύνθεση της μικροχλωρίδας αλλάζει σημαντικά κατά την αποθήκευση. Έτσι, κατά την αερόβια συντήρηση σε πάγο η μικροβιακή χλωρίδα αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από *Pseudomonas* spp. και *S. putrefaciens* μετά από 1 - 2 εβδομάδες. Αυτό πιθανώς οφείλεται στον σχετικά σύντομο χρόνο διπλασιασμού των μικροοργανισμών αυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Κατά την αποθήκευση σε υψηλότερες θερμοκρασίες (25 °C) η μικροχλωρίδα

κατά την αλλοίωση αποτελείται κυρίως από τα μεσόφιλα Vibrionaceae αλλά και από τα Enterobacteriaceae ειδικά όταν τα ψάρια προέρχονται από μολυσμένα νερά (Huss, 1995).

1.5.3.1 Ειδικοί αλλιωγόνοι μικροοργανισμοί

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, κατά τη συντήρηση, μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (Specific Spoilage Organisms, SSO), αναπτύσσονται με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και, όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης (spoilage level) των 10⁷ - 10⁹ CFU/g, οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους (Chemical Spoilage Index, CSI), έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard et al., 1993, Gram και Huss, 1996, Huis in't Veld, 1996). Η επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν το μικρό αυτό κλάσμα εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες αποθήκευσης, όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα (Dalgaard 2003, Leisner και Gram 1999). Στην εικόνα 1.4 παριστάνεται γραφικά η διαδικασία αλλοίωσης των ψαριών κατά τη συντήρησή τους σε ατμοσφαιρικό αέρα, σε κενό και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.



Εικόνα 1.4 Γενική περιγραφή της αλλοίωσης των ιχθυηρών (Dalgaard et al. 1993).

Ατμόσφαιρα	Εύκρατη ζώνη	Τροπική ζώνη
Αέρας	Shewanella putrefaciens ¹	Shewanella putrefaciens ¹⁰
	Pseudomonas sp. ²	Pseudomonas sp. 10,11
Κενό	Shewanella putrefaciens ³	Γαλακτικά βακτήρια ¹²
	Photobacterium phosphoreum ⁴	Άλλοι Gram - θετικοί ¹²
	Γαλακτικά βακτήρια ^{5, 6}	
	Brochothrix thermosphacta ^{5, 7}	
	Άλλοι Gram - θετικοί ⁸	
CO ₂	Photobacterium phosphoreum ⁹	Γαλακτικά βακτήρια ¹³
	Γαλακτικά βακτήρια ⁵	Άλλοι Gram - θετικοί
	Brochothrix thermosphacta ⁵	ΤΜΑΟ - ανάγοντα βακτήρια ¹⁴

Πίνακας 1.3 Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί νωπών ιχθυηρών κατά τη συντήρηση σε θερμοκρασίες ψύξης.

¹ Levin (1968), Herbert et al. (1971), Jorgensen et al. (1989), ² Koutsoumanis et al. (1999a,b,2000), ³ Dalgaard et al. (1993), Jorgensen et al. (1988), ⁴ Dalgaard et al. (1993), ⁵ Koutsoumanis et al. (1998), ⁶ Tsironi et al. (2008), ⁷ Drosinos et al. (1996), ⁸ Hussain et al. (1976), ⁹ Dalgaard et al. (1993, 1995), ¹⁰ Gillespie et al. (1975), Gram (1992), ¹¹ Gram et al. (1990), ¹² Pedersen et al. (1995), ¹³ Banks et al. (1980), ¹⁴ Reddy et al. (1995)

Το βακτήριο S. putrefaciens αποτελεί ειδικό αλλοιωγόνο μικροοργανισμό σε ψάρια των εύκρατων κλιμάτων που συντηρούνται σε αερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία ψύξης και έχει αποδειχθεί πως ο πληθυσμός αυτών των βακτηρίων σχετίζεται γραμμικά με τη διάρκεια ζωής του μπακαλιάρου (Jorgensen, 1988). Έχει διαπιστωθεί ότι, το S. putrefaciens ανάγει το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) και παράγει τριμεθυλαμίνη (TMA), η οποία προσδίδει άσχημη οσμή στο τρόφιμο και οδηγεί στην οργανοληπτική του απόρριψη. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι πληθυσμοί *S. putrefaciens* μικρότεροι του 10^8 CFU/g δεν είναι ικανοί να προκαλέσουν αλλοίωση, λόγω του μικρού ποσού TMA που παράγεται (Dalgaard, 1995). Το Photobacterium phosphoreum παράγει σημαντική ποσότητα τριμεθυλαμίνης (10 -100 φορές περισσότερο TMA ανά κύτταρο από το S. putrefaciens) συνεισφέροντας στην αλλοίωση του μπακαλιάρου συντηρημένου σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Dalgaard et al., 1993). Παρ' όλα αυτά, κατά τη μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού αυτού δεν προκύπτουν δύσοσμα συστατικά, όπως από τη δράση του S. putrefaciens, δεν παράγονται πτητικές θειούχες ενώσεις, ενώ δεν έχει συσχετιστεί με την αλλοίωση ιχθυηρών της Μεσογείου, όπως η τσιπούρα, γεγονός που αποδίδεται στα πολύ χαμηλά επίπεδα της τριμεθυλαμίνης κατά τη συντήρηση των προϊόντων αυτών (Drosinos et al., 1997). Η αλλοίωση των ιχθυηρών της Βόρειας Ευρώπης προκαλείται από τα ανωτέρω βακτήρια και ο αρχικός τους πληθυσμός επηρεάζει την τελική τους ανάπτυξη και κυριαρχία. Η συσκευασία των ιχθυηρών αυτών σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης τόσο των Pseudomonas spp. όσο και του S. putrefaciens των οποίων ο τελικός πληθυσμός δεν ξεπερνάει τα 10^5 - 10^6 CFU/g. Η παραγωγή του TMA είναι παρόμοια ή λίγο καθυστερημένη σε σχέση με τα ψάρια που συσκευάζονται υπό κενό. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το P. phosphoreum είναι πολύ ανθεκτικό στο CO₂ και μπορεί να αναπτυχθεί σε επίπεδα $10^7 - 10^8$ CFU/g.

Στα ψάρια που αλιεύονται στη Μεσόγειο θάλασσα έχει παρατηρηθεί πως η τριμεθυλαμίνη δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο

χαμηλό πληθυσμό του *S. putrefaciens* που δεν το καθιστά ικανό να συναγωνιστεί τους μεγάλους πληθυσμούς των ανταγωνιστικών *Pseudomonas* spp. και την απουσία του *P. phosphoreum*, είτε στην απουσία του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης που είναι πρόδρομη ουσία για την παραγωγή τριμεθυλαμίνης (Koutsoumanis et al., 1999). Κατά την αερόβια συντήρηση των αλιευμάτων της Μεσογείου, τα βακτήρια του γενους *Pseudomonas* έχουν χαρακτηριστεί ως ειδικοί αλλοωγόνοι μικροοργανισμοί. Μελέτες έχουν δείξει ότι, στην τσιπούρα, η αρχική μιχροχλωρίδα αποτελείται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas, Psychrobacter, Acinetobacter, Flavobacterium, Shewanella* και *Macrococcus* (Parlapani et al., 2015). Επιπλέον, βρέθηκε ότι κυρίως τα *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως τα βακτήρια *Shewanella* spp. αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς αλλοίωσης της τσιπούρας, τόσο ολόκληρης όσο και σε φιλέτα, που συντηρήθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε αερόβιες συνθήκες (Parlapani et al., 2015, Parlapani και Boziaris, 2016).

Απεναντίας, κατά τη συντήρηση σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες, η σύσταση της μικροβιακής χλωρίδας μεταβάλλεται σημαντικά. Η ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp. παρεμποδίζεται και η κυρίαρχη αλλοιωγόνος μικροχλωρίδα στο τέλος της διάρκειας ζωής αποτελείται κυρίως από Gram θετικά βακτήρια, όπως τα γαλακτικά βακτήρια (Hussain et al., 1976), και το *Brochothrix thermosphacta* (Drosinos και Nychas, 1996). Η ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε διάφορα είδη ελληνικών ιχθυηρών, συσκευασμένων υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα με CO₂ έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται άμεσα με την αλλοίωση (Tsironi et al., 2008).

Τα ελαφρώς συντηρημένα προϊόντα ψαριών μπορεί επίσης να περιέχουν βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae καθώς και το *Brochothrix thermosphacta* σε χαμηλά (10 CFU/g) ή υψηλά ($10^6 - 10^7$ CFU/g) επίπεδα (Cann et al., *1984*, Civera et al., *1984*, Cory, 1995, Leisner et al., 1994, Truelstrup Hansen et al., 1996). Με την αύξηση της θερμοκρασίας, τα Enterobacteriaceae καθίστανται συν-κυρίαρχα με τις ψευδομονάδες ή/ και τα βακτήρια που παράγουν H₂S (Gram et al., 1987, Gram και Huss, 1996). Τα Enterobacteriaceae προκαλούν αλλοίωση μέσω της παραγωγής ανεπιθύμητων οσμών και της ικανότητάς τους να παράγουν H₂S από πρωτεϊνικά υποστρώματα (Truelstrup Hansen, 1995). Οι μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* μπορεί να είναι περιστασιακά παρόντες σε νωπά κρέατα (Gardner, 1981) και βρέθηκαν επίσης να αποτελούν μέρος του τελικού μικροβιακού τους πληθυσμού (Koutsoumanis και Nychas, 1999).

1.5.3.2 Προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού

Οι περισσότερες πτητικές χημικές ενώσεις στα αλλοιωμένα ψάρια παράγονται από τα βακτήρια (Shewan, 1962). Τέτοιες ενώσεις είναι η τριμεθυλαμίνη, πτητικές θειούχες ενώσεις, αλδεϋδες, κετόνες, εστέρες, υποξανθίνη και άλλες ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Τα υποστρώματα για την παραγωγή των χημικών αυτών ενώσεων είναι οι υδατάνθρακες (όπως γαλακτικό και ριβόζη) νουκλεοτίδια (όπως μονοφοσφωρική ινοσίνη και ινοσίνη) και άλλα μόρια μη πρωτεϊνικού αζώτου. Τα αμινοξέα αποτελούν σημαντικό υπόστρωμα για το σχηματισμό σουλφιδίων και αμμωνίας.

Οι πτητικές θειούχες ενώσεις έχουν πολύ έντονη μυρωδιά και μπορούν να ανιχνευθούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Έτσι, ακόμη και ελάχιστες ποσότητες επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα του ψαριού. Η αλλοίωση από τα *Pseudomonas* spp. χαρακτηρίζεται από την

παραγωγή πτητικών αλδεύδων, κετονών, εστέρων και σουλφιδίων (Miller et al., 1973). Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστό ποιες ενώσεις είναι υπεύθυνες για την χαρακτηριστική οσμή αλλοίωσης. Τα *Pseudomonas* spp. ως αερόβιοι μικροοργανισμοί οξειδώνουν την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Drosinos και Board, 1994) και αφού το αφομοιώσουν, συνεχίζουν διασπώντας τα αμινοξέα προς NH₃ και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις (Dainty, 1996). Το *S. putrefaciens* παράγει TMA, H₂S και σχηματίζει σουλφίδια από τις πρόδρομες ουσίες όπως οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), κυστεϊνη και μεθειονίνη, αντίστοιχα, και αποκαρβοξυλιώνει αμινοξέα όπως ιστιδίνη και τυροσίνη με αποτέλεσμα την παραγωγή των αντίστοιχων βιογενών αμινών (ισταμίνη και τυραμίνη) (Gram και Huss, 1996). Τα Enterobacteriaceae παράγουν κυρίως TMA από TMAO, κετόνες, αλδεΰδες, εστέρες και αμμωνία από αμινοξέα, οξέα από υδατάνθρακες κ.α. (Leisner και Gram, 1999). Η κυριαρχία των *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ένα τρόφιμο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οργανικών οξέων (Drosinos και Board, 1994, Drosinos και Nychas, 1997, Nychas και Arkoudelos, 1991).

Ο σχηματισμός TMA συνοδεύεται από τον σχηματισμό αμμωνίας κατά την αναερόβια συντήρηση στη ρέγγα και στον μπακαλιάρο (Haaland και Njaa, 1988). Η επιμήκυνση της αναερόβιας συντήρησης στα ψάρια έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή NH₃ λόγω της περαιτέρω αποικοδόμησης των αμινοξέων, αλλά και τη συσσώρευση λιπαρών οξέων όπως οξικό, βουτυρικό και προπιονικό οξύ.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πτητικών αζωτούχων βάσεων (Total Volatile Basic Nitrogen, TVB-N) που παράγονται κατά την αλλοίωση καθορίζει την ποιότητα των ψαριών κατά τα τελικά στάδια της αλλοίωσής τους. Η περιεκτικότητα των TVB-N σε φρέσκα ψάρια κυμαίνεται μεταξύ 5 και 20 mg/ 100 g (Koutsoumanis et al., 2000) και αυξάνει έως τιμές της τάξης των 50 - 100 mg/ 100 g στο τέλος της συντήρησής τους (Grigorakis et al., 2003).

1.5.3.3 Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις

Οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης και μπορεί να είναι είτε συνεργιστικές είτε αλληλεπιδράσεις ανταγωνισμού μεταξύ των μικροοργανισμών.

Στις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις οι μικροοργανισμοί (κυρίως τα αρνητικά Gram βακτήρια) προσπαθούν να συντονίσουν την έκφραση ορισμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (όπως υδρολυτικά ένζυμα) μέσω βακτηριακής επικοινωνίας με χημικά σήματα (Quorum sensing) μέσω των ακυλο-ομοσερινικών λακτονών (AHLs) (Gram et al., 2002). Η συγκέντρωση των AHLs αυξάνεται με την αύξηση των Gram αρνητικών βακτηρίων στα τρόφιμα. Ο ρόλος τους στην αλλοίωση των τροφίμων ζωικής προέλευσης δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά αρκετοί φαινότυποι (πηκτινολυτικές, λιπολυτικές, πρωτεολυτικές και χιτινολυτικές δράσεις) που ενδεχομένως εμπλέκονται στην αλλοίωση διαφόρων τροφίμων έχουν συνδεθεί με τη ρύθμιση των AHLs σε πολλά βακτήρια. Τα AHLs μπορούν να εξαχθούν από φιλέτα ψαριών και ψιλοκομμένα ψάρια κατά τη φάση της αλλοίωσης και παράγονται από πολλά σημαντικά αλλοιωγόνα βακτήρια (Nychas et al., 2008).

Στις αλληλεπιδράσεις ανταγωνισμού, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά όπως η γλυκόζη αλλά και για χημικά συστατικά, όπως ο σίδηρος, επηρεάζουν τη φυσιολογική συμπεριφορά των μικροοργανισμών (Drosinos et al., 1997, Gram και Dalgaard, 2002). Τα

οξυγαλακτικά βακτήρια, τα Pseudomonas spp., το S. putrefaciens και γενικότερα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διακρίνονται για τις ανταγωνιστικές τους ιδιότητες παράγοντας διάφορες ουσίες έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση των ιχθυηρών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν κυρίως βακτηριοσίνες (Adams και Nicolaides, 1997), τα Pseudomonas spp. και το S. putrefaciens παράγουν κυρίως σιδηροφόρες ουσίες (Gram, 1993, Gram, 1994), και γενικότερα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια παράγουν ουσίες όπως είναι η NH₃ και η TMA, οι οποίες δρουν τοξικά έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών. Ως αποτέλεσμα, οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν και επηρεάζει ο ένας την αύξηση του άλλου (Boddy και Wimpenny, 1992).

1.6 Θεωρία των εμποδίων (Hurdle Technology)

Η σύγχρονη τάση των καταναλωτών για ασφαλή και ποιοτικά προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί ελάχιστη επεξεργασία, με καθόλου ή ελάχιστη προσθήκη συντηρητικών, είναι θρεπτικά και υγιεινά, ενώ παράλληλα έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, έχει οδηγήσει στην ανάγκη υιοθέτησης νέων ή βελτιωμένων ήπιων μεθόδων συντήρησης που επιτρέπουν την παραγωγή φρέσκων αλλά σταθερών και ασφαλών τροφίμων. Η ανάγκη αυτή καλύπτεται από τη θεωρία των εμποδίων (Hurdle Technology), η οποία παρουσιάστηκε από τον Leistner το 1978, και υποστηρίζει τον προσεκτικό σχεδιασμό υφιστάμενων ή νέων τεχνικών συντήρησης, με σκοπό τον καθορισμό μίας σειράς παραγόντων συντήρησης (εμπόδια, hurdles) τους οποίους οι μικροοργανισμοί δεν είναι σε θέση να υπερνικήσουν (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5 Παράδειγμα της τεχνολογίας των εμποδίων στα ψάρια (Tsironi et al., 2020)

Τα πιο σημαντικά εμπόδια που χρησιμοποιούνται στη συντήρηση των τροφίμων είναι η θερμοκρασία (υψηλή ή χαμηλή), ενεργότητα νερού (α_w), οξύτητα (pH), δυναμικό οξειδοαναγωγής (E_h), συντηρητικά (όπως νιτρικά, σορβικό) και ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί (όπως γαλακτικά βακτήρια). Τα εμπόδια μπορούν να εφαρμόζονται ταυτόχρονα ή διαδοχικά, ανάλογα με τον τύπο του εμποδίου και τη συνολική επεξεργασία (Leistner και Gorris, 1995). Ο έξυπνος συνδυασμός των εμποδίων διασφαλίζει τη μικροβιακή ασφάλεια και σταθερότητα, καθώς και τις οργανοληπτικές, θρεπτικές και οικονομικές ιδιότητες του προϊόντος.

Το ψάρι αποτελεί ένα αρκετά ευαλλοίωτο προϊόν του οποίου η αλλοίωση οφείλεται κυρίως στη μικροβιακή δραστηριότητα. Στην περίπτωση αυτή, οι χαμηλές θερμοκρασίες αποτελούν το κύριο, και πολλές φορές το μοναδικό, εφαρμοζόμενο εμπόδιο. Παρ' όλα αυτά, όταν το ψάρι εκτίθεται σε μη κατάλληλες θερμοκρασίες κατά τη διανομή και αποθήκευσή του, το εμπόδιο της θερμοκρασίας δεν υφίσταται πλέον με αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση και τη μείωση της ασφάλειας του προϊόντος (Tsironi et al., 2020).

Συνεπώς ο συνδυασμός της ψύξης με άλλα εμπόδια, όπως η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, μπορεί να συμβάλει στη μεγαλύτερη διατηρησιμότητα του προϊόντος αυτού.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης και της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας στην ανάπτυξη των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας και λαβρακιού, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

1.6.1 Επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας στη συντήρηση των ψαριών

Τα ψάρια αλλοιώνονται πολύ γρήγορα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, καθώς οι χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές διεργασίες επιταχύνονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η συντήρηση των ευαλλοίωτων τροφίμων σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει σκοπό την καθυστέρηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και των φυσικοχημικών διεργασιών της αλλοίωσης, ώστε το προϊόν να διατηρηθεί φρέσκο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Είναι σημαντικό, αμέσως μετά την αλλίευση τα ψάρια να συντηρηθούν στους 0 °C, καθώς η αλλοίωσή τους είναι πολύ γρήγορη (FAO, 1973). Η ψύξη και η κατάψυξη είναι αποτελεσματικές μέθοδοι συντήρησης των ψαριών αλλά δεν βελτιώνουν την ποιότητα του προϊόντος, για αυτό το λόγο οι χαμηλές θερμοκρασίες πρέπει να εφαρμόζονται συνεχώς σε ολόκληρη την πορεία του προϊόντος από την αλίευση έως την κατανάλωση. Αυτές οι μέθοδοι συντήρησης δεν θανατώνουν τους μικροοργανισμούς, αλλά μειώνουν τον μικροβιακό μεταβολισμό που είναι υπεύθυνος για την αλλοίωση (Ashie et al., 1996), με αύξηση της φάσης προσαρμογής και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Η επιβίωση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών κατά τη συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες εξαρτάται από τον τύπο του μικροοργανισμού, το είδος και την προέλευση του ψαριού, τη μέθοδο αλίευσης, καθώς και τις διαδικασίες χειρισμού και συντήρησης κατά την αλίευση (Ashie et al., 1996).

Οι ψυχρόφιλοι και οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί έχουν μεγάλη σημασία για τη μικροβιολογία τροφίμων. Ο ρυθμός αύξησης των ψυχρότροφων μικροοργανισμών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και παρουσιάζει μείωση με τη μείωση της θερμοκρασίας. Η συντήρηση των τροφίμων σε θερμοκρασίες ψύξης μπορεί να μεταβάλλει το ρυθμό και τη φύση της αλλοίωσης. Έτσι, είναι δυνατό να υπάρξουν ποιοτικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης, καθώς οι χαμηλές θερμοκρασίες ασκούν επιλεκτική δράση, εμποδίζοντας τους μεσόφιλους μικροοργανισμών. Παρ' όλο που οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης, η διαδικασία συμβαίνει με αργούς ρυθμούς, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της αλλοίωσης (Ercolini et al., 2006).

Συνοπτικά, οι μεταβολές που συμβαίνουν στα ψάρια κατά τη συντήρηση υπό ψύξη είναι οι εξής :

Οι ομάδες των ψυχρότροφων βακτηρίων πολλαπλασιάζονται. Παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού σε θερμοκρασίες κοντά στους 0 °C και προσβολή της μεθειονίνης και κυστεϊνης με ταυτόχρονη παραγωγή υδρόθειου, μεθυλοσουλφιδίου και μεθυλομερκαπτάνης, ενώ τα ψυχρότροφα βακτήρια υπερισχύουν.

- Αρχικά καταναλώνεται το γαλακτικό οξύ και οι μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ουσίες, με αποτέλεσμα την παραγωγή τριμεθυλαμίνης, διμεθυλαμίνης και πτητικών λιπαρών οξέων.
- Παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων αμινοξέων, καθώς η υδρόλυση των πρωτεϊνών γίνεται εντονότερη.
- Τέλος, επιταχύνεται η μετατροπή της ινοσίνης σε υποξανθίνη.

(Γεωργάκης, 2000).

Τα ψάρια ψύχονται σε θερμοκρασία περίπου 0 °C, χωρίς να υποστεί κρυστάλλωση (πήξη) ο μυϊκός τους οπός. Στη θερμοκρασία αυτή επιβραδύνονται οι βιομηχανικές διεργασίες και η βιομηχανική δραστηριότητα με αποτέλεσμα να επιμηκύνεται ο χρόνος συντήρησής τους. Η ψύξη των ψαριών με πάγο είναι η πιο απλή και η πιο διαδεδομένη μέθοδος.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι συντήρησης των ψαριών περιλαμβάνουν την συντήρηση σε ψύξη σε θερμοκρασία από 0 °C έως 4 °C, σε συνθήκες υπέρψυξης (superchilling) σε θερμοκρασία κυμαινόμενη από -1 °C έως -4 °C και σε κατάψυξη σε θερμοκρασία από -18 °C έως -40 °C (Gallart-Jornet et al., 2007). Κατά την κατάψυξη σταματάει εντελώς η ανάπτυξη των βακτηρίων,όμως οι ενζυμικές και μη ενζυμικές αλλαγές συνεχίζουν να υφίστανται με πολύ μικρότερο ρυθμό.

1.6.2 Επίδραση της συσκευασίας ΜΑΡ στη συντήρηση των ψαριών

Η προσπάθεια για τη διατήρηση της ποιότητας και την επέκταση του χρόνου ζωής των τροφίμων οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών συντήρησης, όπως είναι η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Packaging, MAP), η οποία αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους συντήρησης των αλιευτικών προϊόντων. Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε συνδυασμό με τις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης είναι μία αποτελεσματική μέθοδος που επιτυγχάνει την επέκταση της διάρκειας ζωής των ιχθυηρών (DeWitt, 2016). Ο ορισμός για τη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, όπως έχει δοθεί από τους Young et al. (1988), είναι η τοποθέτηση του τροφίμου σε πλαστικά συσκευασίας (μεμβράνες), στο εσωτερικό των οποίων η αέρια σύσταση έχει τροποποιηθεί με σκοπό τη μείωση της αναπνοής, την ελάττωση της μικροβιακής ανάπτυξης και την επιβράδυνση της ενζυμικής αλλοίωσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Ο εμπορικός χρόνος ζωής των αλιευτικών προϊόντων σε ΜΑΡ είναι δυνατόν να αυξηθεί από μερικές ημέρες έως και μία εβδομάδα ή και περισσότερο (Pastoriza et al. 1996). Οι Pastoriza και συνεργάτες (1996) αναφέρουν ότι ο χρόνος ζωής φιλέτων μπακαλιάρου (Merluccius merluccius) στους 0 °C ήταν 7 ημέρες κατά τη συντήρησή τους σε αερόβιες συνθήκες και 14 ημέρες κατά τη συντήρησή τους υπό συνθήκες MAP (50% CO₂, 5% O₂, 45% N₂), γεγονός που δείχνει ότι ο χρόνος ζωής αυξήθηκε 100% με τη συσκευασία ΜΑΡ.

Κατά τη δημιουργία μίας συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας, μείγμα αερίων εμφυσάται μέσα σε εγκεκριμένο περιέκτη, με καθορισμένη διαπερατότητα στα αέρια, και αποθηκεύεται συνήθως σε θερμοκρασίες ψύξης (McMillin, 2008). Ο εμπλουτισμός της ατμόσφαιρας της συσκευασίας με CO₂ αποτελεί το μέσο για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης. Τα υλικά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται γενικά είναι εγκεκριμένα πλαστικά υλικά - μεμβράνες συσκευασίας, μη διαπερατά ή επιλεκτικά διαπερατά στα

αέρια, τα οποία επιπρόσθετα προστατεύουν τα τρόφιμα από τη σκόνη, τη περιβαλλοντική μόλυνση και τις μηχανικές βλάβες. Οι πιο συχνά εφαρμοζόμενες μέθοδοι τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι η συσκευασία σε κενό (Vacuum Packaging, VP), η συσκευασία όπου εμφυσάται αέριο μείγμα (Gas-flush Packaging) και η συσκευασία ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (Control Active Packaging, CAP).

Στη συσκευασία ελεγχόμενης ατμόσφαιρας, το προϊόν εκτίθεται συνεχώς σε ένα σταθερό μείγμα αερίων, η σύνθεση των οποίων παρακολουθείται και ελέγχεται καθ 'όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Επομένως, τα συστήματα CAP διατηρούν μια σταθερή σύνθεση αερίων καθώς και άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες μέσα στη συσκευασία, όπως η θερμοκρασία και η υγρασία (Farber, 2016). Στην συσκευασία σε κενό, απομακρύνεται ο αέρας από τη συσκευασίας σε κενό, με υλικά αδιαπέραστα από αέρια και σταθερά στη θερμότητα, έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ελαχιστοποίηση των κινδύνων μόλυνσης μετά την παστερίωση, ευκολία χειρισμού, αναστολή της ανάπτυξης αερόβιων μικροοργανισμών αλλοίωσης και αναστολή ή επιβράδυνση επιβλαβών οξειδωτικών αντιδράσεων στο τρόφιμο κατά την αποθήκευση (Nagarajarao, 2016). Στην παρούσα μελέτη αναλύεται η συσκευασία όπου εμφυσάται αέριο μείγμα.

1.6.2.1 Αέρια που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία ΜΑΡ

Η αναλογία των αερίων στο μείγμα καθορίζεται κατά τη στιγμή της εισαγωγής και πριν από την τελική σφράγιση της συσκευασίας. Ωστόσο, η σύνθεση του αερίου μίγματος αλλάζει από την αρχική σύνθεση ως αποτέλεσμα της χημικής, ενζυμικής και μικροβιακής δραστηριότητας του προϊόντος κατά την αποθήκευση. Τα αέρια που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το οξυγόνο (O₂), διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), και άζωτο (N₂), με σύσταση διαφορετική από την ατμοσφαιρική (N₂ 78%, O₂ 21%, CO₂ 0,03%). Τα μείγματα αερίων για μη λιπαρά ψάρια είναι τυπικά 30% O₂, 40% CO₂, 30% N₂ ενώ για καπνιστά και λιπαρά ψάρια είναι 60% N₂ (Cooksey, 2013).

Το οξυγόνο (O₂), χρησιμοποιείται στη συσκευασία MAP, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με σκοπό την παρεμπόδιση της ανάπτυξης αναερόβιων μικροοργανισμών, όπως είναι το υποχρεωτικά αναερόβιο παθογόνο *Clostridium botulinum*. Η χρήση του O₂ είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της αύξησης του παθογόνου αυτού βακτηρίου. Επιπλέον, στα λιπαρά ψάρια το O₂ αποκλείεται συνήθως από το μείγμα αερίων, καθώς μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό τάγγισμα.

Το άζωτο (N₂), είναι αδρανές αέριο χωρίς αντιμικροβιακή δράση, με μικρή διαλυτότητα στο νερό. Χρησιμοποιείται συνήθως για την αποφυγή της κατάρρευσης (παραμόρφωσης) της συσκευασίας, καθώς ένα μέρος του CO₂ απορροφάται από το τρόφιμο. Επιπλέον, χρησιμοποιείται πολλές φορές αντί του O₂ επιβραδύνοντας έτσι την οξειδωτική τάγγιση και παρεμποδίζοντας την αύξηση των αερόβιων μικροοργανισμών (Sivertsvik et al. 2002).

Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), αποτελεί το πιο σημαντικό αέριο στη συσκευασία MAP και χρησιμοποιείται συνήθως σε υψηλή συγκέντρωση, εξαιτίας της βακτηριοστατικής του δράσης. Το CO₂ ακόμη και σε συγκέντρωση 5 - 10% είναι δυνατόν να αναστείλει την αύξηση των αερόβιων βακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονται στα αλιεύματα, σε θερμοκρασίες ψύξης και είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση σε αυτές τις συνθήκες (Dainty, 1971). Η συνολική επίδραση του CO₂ στους μικροοργανισμούς είναι η επιμήκυνση της φάσης προσαρμογής και η μείωση του ειδικού ρυθμού αύξησης των μικροοργανισμών κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους (Farber, 1991). Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα διαλυτό στο νερό και στο λίπος, όπου σχηματίζει ανθρακικό οξύ (H₂CO₃). Η υψηλή διαλυτότητά του μπορεί να προκαλέσει μείωση του pH, με αποτέλεσμα την αλλοίωση της οσμής των ψαριών, ενώ η απορρόφησή του από το προϊόν μπορεί να οδηγήσει σε κατάρρευση της συσκευασίας (Ashie et al., 1996). Επιπρόσθετα, η αντικατάσταση μέρους ή ολόκληρου του O₂ στη συσκευασία MAP από το CO₂, οδηγεί σε μείωση του ρυθμού αύξησης των αερόβιων μικροοργανισμών στο προϊόν.

Η παρεμποδιστική δράση του CO2 εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η μερική πίεση του CO2, το περιεχόμενο οξυγόνο, ο όγκος του αερίου στη συσκευασία, η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα νερού, η αρχική ολική μικροβιακή χλωρίδα, το είδος των μικροοργανισμών και το στάδιο αύξησής τους, καθώς και τα εγγενή χαρακτηριστικά του τροφίμου (Farber, 1991). Το μέγιστο επιθυμητό αποτέλεσμα της αντιμικροβιακής δράσης των τροποποιημένων ατμοσφαιρών επιτυγχάνεται με τη συντήρηση των προϊόντων σε χαμηλές θερμοκρασίες, επειδή η διαλυτότητα του CO2 μειώνεται καθώς η θερμοκρασία συντήρησης αυξάνεται (Daniel et al., 1985). Η παρεμποδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στη συσκευασία ΜΑΡ είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του διαλυμένου CO_2 στο τρόφιμο. Μετά το άνοιγμα της συσκευασίας, το CO_2 απελευθερώνεται αργά από το τρόφιμο και συνεχίζει να ασκεί προστατευτική επίδραση για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται υπολειμματική δράση του CO2 (Sivertsvik et al., 2002). Γενικά, αν ένα ποιοτικό, συντηρημένο σε ψύξη προϊόν, στο οποίο έχει εφαρμοστεί σωστή υγιεινή κατά το χειρισμό του από τη στιγμή της αλίευσης, συντηρείται σε κατάλληλη ελεγχόμενη θερμοκρασία, η επέκταση του χρόνου ζωής του είναι ανάλογη των αρχικών επιπέδων CO2 στη συσκευασία MAP. Η συσκευασία MAP δεν μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα των κατώτερων ποιοτικά προϊόντων (Farber, 1991). Έτσι, όσο μικρότερος είναι ο αριθμός των βακτηρίων κατά την εφαρμογή της συσκευασίας ΜΑΡ, τόσο μεγαλύτερη είναι η παράταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Έχει αποδειχθεί ότι ο χρόνος ζωής φρέσκων, ολόκληρων ψαριών και φιλέτων, επιμηκύνεται σημαντικά, όταν η συγκέντρωση του CO2 κυμαίνεται από 40% έως 50% στη συσκευασία τους (Davis, 1997). Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλούν μείωση της έντασης του χρώματος της σάρκας των ψαριών ή ανώμαλο χρωματισμό (Wolfe, 1980).

Ο μηχανισμός δράσης του διοξειδίου του άνθρακα στους ιστούς του τροφίμου και στους μικροοργανισμούς δεν είναι πλήρως γνωστός. Μία σημαντική επίδραση του CO₂ είναι η μείωση του ενδοκυτταρικού pH των ιστών. Έχει αποδειχθεί ότι η έκθεση των ιστών στο CO₂ έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία πτώση της τιμής του pH του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος, η οποία εξαρτάται από το είδος των ιστών, τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, την ποσότητα του CO₂ που υπάρχει στο περιβάλλον και από την παρουσία ή απουσία διττανθρακικών αλάτων (Parry, 1993). Στα βακτήρια *Pseudomonas* spp. η ενδοκυτταρική μείωση του pH επιδρά σημαντικά στις ενζυμικές δραστηριότητες των μικροβιακών κυττάρων, που έχουν άμεση σχέση με την ανάπτυξή τους (Munro, 1970). Συνεπώς, η εφαρμογή του CO₂ προκαλεί άμεση παρεμπόδιση των ενζύμων ή μείωση του ρυθμού των ενζυμικών αντιδράσεων. Μία άλλη πιθανή δράση του CO₂ είναι ότι αυτό

ρυθμίζει το μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Αύξηση της ποσότητας του CO₂ προκαλεί μείωση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης στα *Pseudomonas* spp. (King et al., 1975). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η παρουσία του CO₂ και του HCO₃- επηρεάζει τις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης, επιδρώντας στη λήψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Daniels et al., 1985). Επιπλέον, η δράση του CO₂ μπορεί να προκαλέσει άμεση μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών λόγω μεταβολών στις ενδοηλεκτρικές τους δυνάμεις.

1.6.2.2 Μικροβιολογια της συσκευασίας ΜΑΡ

Η διάρκεια ζωής των φρέσκων ιχθυηρών, περιορίζεται με την παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, από την ανάπτυξη και τις βιοχημικές δραστηριότητες των Gram αρνητικών, ψυχρότροφων βακτηρίων των γενών Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium και Moraxella. Η συσκευασία των προϊόντων σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO2 προκαλεί παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών. Υπό αυτές τις συνθήκες συσκευασίας, η αύξηση των κοινών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών παρεμποδίζεται και μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται αργά, κυρίως τα γαλακτικά βακτήρια, τα ψυχρότροφα Enterobacteriaceae και το Brochothrix thermosphacta, μπορεί να αποτελέσουν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς της αλλοιωγόνου μικροβιακής χλωρίδας. Το ιδανικό αποτέλεσμα μίας συσκευασίας σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες είναι η επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία διαθέτουν ένα χαμηλό δυναμικό αλλοίωσης, διότι απαιτούν περισσότερο χρόνο ώστε να αναπτυχθούν και να παράγουν τα προϊόντα μεταβολισμού τους, σε σχέση με τους αερόβιους μικροοργανισμούς. Επιπλέον αυτά τα προϊόντα δεν είναι τόσο έντονα και δυσάρεστα όπως αυτά των ψευδομονάδων (αμμωνία κι άλλες θειούχες ενώσεις). Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στη συσκευασία περιορίζεται, κάποιοι μικροοργανισμοί, όπως το Shewanella putrefaciens, χρησιμοποιούν το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης ως πηγή οξυγόνου, επιτρέποντάς τους να αναπτυχθούν σε αναερόβιες συνθήκες. Μεταβολικά προϊόντα που παράγονται σε αυτή την περίπτωση είναι θειούχες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, όπως H2S και CH3SH καθώς και πτητικά λιπαρά οξέα και αμμωνία (Sivertsvik et al., 2002). Η σύσταση της αλλοιωγόνου χλωρίδας και η διαδικασία της αλλοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον αρχικό πληθυσμό των διάφορων μικροοργανισμών και από τον ανταγωνισμό μεταξύ των προαιρετικά αναερόβιων και αερόβιων μικροοργανισμών.

1.6.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στη συσκευασία ΜΑΡ

Η θερμοκρασία είναι ιδιαίτερα σημαντική για όλους τους τρόπους συντήρησης των ιχθυηρών, συμπεριλαμβανομένης της συσκευασίας σε MAP, καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη μικροβιολογική και την ενζυμική δραστηριότητα. Η αυξημένη διαλυτότητα του CO₂ στις χαμηλές θερμοκρασίες προκαλεί αύξηση της επίδρασης του MAP. Μελέτες με μπακαλιάρο συντηρημένο σε MAP και σε αέρα έδειξαν πως στους 5 - 10 °C, σε ατμόσφαιρα με 40% ή 60% CO₂ δεν επιμηκύνεται η διάρκεια ζωής του τροφίμου συγκριτικά με τον αέρα, ενώ στους 0 °C η διάρκεια ζωής είναι 2 - 4 ημέρες μεγαλύτερη στο MAP (Sivertsvik et al., 2002). Η συσκευασία MAP μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματική σε θερμοκρασίες υψηλότερες της συνιστώμενης, λόγω της ελάττωσης της περιεκτικότητας του CO₂ στο τρόφιμο και συνεπώς την ελάττωση της αναστολής της μικροβιακής ανάπτυξης οδηγώντας σε αβεβαιότητα για την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Sivertsvik et al., 2002). Επιπλέον, κατά τη συντήρηση των συσκευασμένων σε MAP ιχθυηρών σε χαμηλή θερμοκρασία (< 3,3

°C) μειώνεται ο κίνδυνος βουτυλισμού και ο μοναδικός φραγμός για την παραγωγή τοξίνης από τα στελέχη του *Clostridium botulinum* τύπου Ε και Β είναι η διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας (Lilly et al., 1990). Συνεπώς, η θερμοκρασία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό αλλοίωσης των ιχθυηρών, ενώ η καταγραφή και ο έλεγχος των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας σε όλη την ψυκτική αλυσίδα είναι απαραίτητος στην περίπτωση της συσκευασίας σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες.

1.6.2.4 Μη μικροβιολογικη επιδραση της συσκευασίας ΜΑΡ

Σε μερικά προϊόντα MAP έχει βρεθεί χαμηλό μικροβιακό φορτίο κατά τη χρονική στιγμή της οργανοληπτικής απόρριψης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αλλοίωση οφείλεται σε μη μικροβιολογικές αντιδράσεις. Οι Arkeudolos και συνεργάτες (2007) διερεύνησαν τη διάρκεια ζωής του νωπού χελιού (*Anguilla anguilla*) συσκευασμένου σε ατμοσφαιρικό αέρα, σε κενό και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (40% CO₂, 30% N₂, 30% O₂). Διαπίστωσαν ότι η διάρκεια ζωής του χελιού συσκευασμένου σε αέρα, κενό και MAP ήταν πάνω από 18, 28 και 34 ημέρες αντίστοιχα, σύμφωνα με μικροβιακές αναλύσεις ποιότητας. Ωστόσο, στις ίδιες συνθήκες συσκευασίας, η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε μικρότερη διάρκεια ζωής των συσκευασιών, στις 11, 11 και 18 ημέρες αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούνται από την κυριαρχία των αυτολυτικών διεργασιών κατά τη διαδικασία αλλοίωσης παρά από τη μικροβιακή αύξηση (Gucoglu, 2020).

1.7 Ταχείες και μη επεμβατικές μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης ιχθυηρών

Οι μικροβιολογικες, χημικές και φυσικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ασφάλειας και της αλλοίωσης των τροφίμων είναι χρονοβόρες, επεμβατικές, παρέχουν αναδρομικές πληροφορίες και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν πάνω στη γραμμή παραγωγής ή να δώσουν άμεσα αποτελέσματα. Από την άλλη, ο προσδιορισμός της αλλοίωσης των τροφίμων με ταχείες, μη παρεμβατικές μεθόδους, που επιτρέπουν τη συλλογή πληροφοριών και την αξιολόγηση ποιοτικών παραμέτρων σε πραγματικό χρόνο, έχει κερδίσει έδαφος τα τλευταία χρόνια στις βιομηχανίες τροφίμων. Οι μέθοδοι απεικόνισης (imaging) και φασματοσκοπίας (streptoscopy) έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία στη μέτρηση και αξιολόγηση της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων, διότι μπορούν να λύσουν ορισμένα από τα υπάρχοντα προβλήματα που εμφανίζουν οι παραδοσιακές μέθοδοι και όργανα μέτρησης.

1.7.1 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis)

Η πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI) είναι μία νέα, μη επεμβατική και ταχεία μέθοδος που ενσωματώνει τη συμβατική απεικόνιση με τη φασματοσκοπία για να αποκτήσει χωρική και φασματική πληροφορία ταυτόχρονα, από το δείγμα που μελετάται. Χρησιμοποιώντας πολυφασματικές εικόνες, είναι δυνατό να εκτιμηθούν τα φυσικά αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα, το μέγεθος, το σχήμα και η υφή. Κατά την εφαρμογή της τεχνική αυτής δεν απαιτείται προ-επεξεργασία του δείγματος γεγονός που την καθιστά ιδανική για χρήση on-line παρακολούθησης και ελέγχου της ποιότητας των προϊόντων (Feng et al., 2012). Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικών, διασφαλίζοντας έτσι την ποιότητα. Είναι μάθοδος φιλική προς το περιβάλλον, μη καταστροφική ως προς το προϊόν, ταχεία και μη τοξική. Η μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης ιαπό δειαστασιμότητα και τα οποία μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας ειδικές τεχνικές (Daugaard et al., 2010).

1.7.1.1 VideometerLab

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της πολύφασματικής απεικόνισης είναι το VideometerLab, το οποίο είναι σε θέση να καταγράψει τις φασματικες ιδιότητες ανάκλασης σε στενές ζώνες (Chevallier et al., 2006). Το όργανο αυτό είναι εξαιρετικά εύχρηστο, ενσωματώνοντας πηγές φωτισμού, φωτογραφική κάμερα και την τεχνολογία υπολογιστών, μαζί με την προηγμένη ψηφιακή ανάλυση εικόνας, καθώς και διάφορες στατιστικές προσεγγίσεις.

Το Videometer παίρνει πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά και μη ομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος που κατανέμονται από την περιοχή του υπεριώδους (405 nm) έως την περιοχή του εγγύς υπερύθρου (970 nm) δηλαδή στα 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 87, 890, 910, 940 και 970 nm (Carstensen και Hansen, 2003, Panagou et al., 2014). Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία LED συνδιάζει μετρήσεις από τα 18 μήκη κύματος σε μία ενιαία, υψηλής ανάλυσης πολυφασματική εικόνα. Κάθε pixel στην εικόνα αποτελεί ένα φάσμα.

Η διάταξη του οργάνου πολυφασματικής απεικόνισης περιλαμβάνει μία φωτεινή πηγή (δέσμη φωτός), έναν αισθητήρα φωτός, έναν φασματογράφο, μία φωτογραφική μηχανή, (συνήθως κάμερα μεγάλης ευκρίνειας), έναν μετατροπέα σήματος, καθώς και έναν υπολογιστή με εγκατεστημένο λογισμικό για την επεξεργασία της εικόνας (Feng et al., 2018, Tsakanikas et al., 2016) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης.

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του VideometerLab είναι τα εξής:

- Ομοιογενής και διάχυτος φωτισμός μέσα στη σφαίρα ενσωμάτωσης.
- Διενέργεια πολυφασματικής ανάλυσης σε λιγότερο από 6 δευτερόλεπτα.
- Δυνατότητα απόκτησης 18 φασματικών ζωνών με μήκος κύματος από 405 έως 970 nm.
- Διαθέσιμη επιλογή φθορισμού.
- 18 δίοδοι φωτισμού LED και μία εξωτερική πηγή φωτός.
- Βελτιωμένη αναλογία σήματος θορύβου μέσω ατομικών και αυτοματοποιημένων προσαρμογών της έντασης του φωτός σε κάθε φασματική ζώνη.
- Βάρος της συσκευής στα 16,7 kg.
- Καλύτερος προσδιορισμός του χρώματος σε σχέση με την παραδοσιακή τεχνολογία RGB.
- Κάμερα με αισθητήρα CCD ανάλυσης 1600 x 1200 pixels και δυνατότηα προσαρμογής για αύξηση της ανάλυσης (2056 x 2056 ή υψηλότερη).

Το σύστημα καταγράφει τις ανακλάσεις στην επιφάνεια του δείγματος με μία μονοχρωματική πρότυπη συσκευή. Το δείγμα τοποθετείται μέσα στη σφαίρα Ulbricht με την κάμερα τοποθετημένη πάνω στο δείγμα. Η λευκή ματ επικάλυψη της σφαίρας και η καμπυλότητά της εξασφαλίζει ομοιόμορφη ανάκλαση του φωτός σε ολόκληρο το χώρο. Στην άκρη της σφαίρας είναι τοποθετημένοι αντιδιαμετρικά οι δίοδοι εκπομπής φωτός LED οι οποίοι εκπέμπουν ακτινοβολία σε μία στενή φασματική ζώνη. Η τεχνολογία LED προσφέρει αυξημένη σταθερότητα. Όταν λαμβάνεται η φωτογραφία, οι δίοδοι εκπέμπουν διαδοχικά μονοχρωματική ακτινοβολία και η ανάκλαση από το συγκεκριμένο μήκος κύματος καταγράφεται από τη κάμερα CCD που βρίσκεται στη κορυφή. Το σύστημα καλιμπράρεται ραδιομετρικά και γεωμετρικά χρησιμοποιώντας πλακέτες ακριβείας. Η ομοιογένεια του φωτός και η βαθμονόμηση του οργάνου έχουν ως στόχο τη διασφάλιση ενός βέλτιστου δυναμικού εύρους και την ελαχιστοποίηση των σκιάσεων που μπορεί να δημιουργηθούν, καθώς και τις όποιες κατοπτρικές αντανακλάσεις ή αντανακλάσεις λόγω στιλπνότητας.

Μετά την απεικόνιση του τροφίμου γίνεται η επεξεργασία της εικόνας και ορίζεται η περιοχή ενδιαφέροντος (Region Of Interest, ROI), ώστε να εξαιρεθούν από την εικόνα

τμήματα από τον περιβάλλοντα χώρο, το τρυβλίο, λίπος κ.α. (Carstensen et al., 2006, Daugaard et al., 2010). Τα δεδομένα που προκύπτουν περιέχουν πληροφορία από κάθε φάσμα και αξιοποιούνται αντίστοιχα με άλλα δεδομένα φασματοσκοπίας, δημιουργώντας μοντέλα πρόβλεψης, αλλοίωσης ή νοθείας, μέσω της χημειομετρίας, με τα οποία μπορεί να εκπαιδευτεί το όργανο.

Band	Wavelength	Color	Compound/application example
1	395 (option)	Violet	Fluorescence
2	435	Ultra blue	Chlorophyll A
3	450	Blue	Riboflavin, Chlorophyll B, Beta-carotene
4	470	Blue	RGB Blue
5	505	Green	RGB green, Metmyoglobin
6	525	Green	RGB green
7	570	Green	Myoglobin
8	590	Amber	Oxymyoglobin
9	630	Red	RGB red, Metmyoglobin (weak)
10	645	Red	Chlorophyll B
11	660	Red	Oxidation, Chlorophyll A
12	700	Red	Oxidation
13	850	NIR	Baseline
14	870	NIR	Baseline
15	890	NIR	Fat shoulder (instauration)
16	910	NIR	Protein (C-H)
17	940	NIR	Fat
18	950	NIR	Valley (carbohydrate, protein)
19	970	NIR	Water
20	N/A	-	-

Πίνακας 1.4 Μήκη κύματος Videometer και παραδείγματα εφαρμογής (Manual VideometerLab).

1.7.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infra Red spectroscopy, IR) είναι μία τεχνική με πολλές εφαρμογές, η οποία δίνει τη δυνατότητα διερεύνησης της μοριακής σύνταξης και ταυτοποίησης άγνωστων οργανικών ενώσεων, καθώς και πιστοποίησης της καθαρότητάς τους. Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, ολόκληρα ή ορισμένες ταινίες απορρόφησής τους, με άλλα γνωστά.

Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή από 0,75 μm έως 1000 μm και χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: άπω υπέρυθρο φάσμα (Far IR, FIR) (50 - 1000 μm), μέσο υπέρυθρο φάσμα (Mid IR, MIR) (2,5 - 50 μm) και εγγύς υπέρυθρο φάσμα (Near IR, NIR) (0,75 - 2,5 μm). Συνήθως, στο υπέρυθρο φάσμα, αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού, ο οποίος ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός ($\overline{v} = v/c = 1/\lambda$). Συνεπώς, η συνήθης περιοχή του MIR καλύπτει την περιοχή 4000 - 400 cm⁻¹, ενώ η πλέον αξιοποιήσιμη περιοχή είναι η περιοχή 4000 - 600 cm⁻¹. Όλες σχεδόν οι οργανικές και ανόργανες ενώσεις

είναι σε θέση να απορροφήσουν ακτινοβολία σε ορισμένες συχνότητες σε αυτή την περιοχή.

Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο προκαλεί διεγέρσεις στις δονήσεις των ατόμων σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες. Απαραίτητη προϋπόθεση για την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο είναι η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι ίση με τη συχνότητα δόνησης ή περιστροφής των ατόμων του μορίου. Επιπλέον, πρέπει να μεταβάλεται η διπολική ροπή του κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργός στο υπέρυθρο. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο δεν παρατηρείται απορρόφηση ακτινοβολίας στην περιοχή αυτή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από τα πολύ συμμετρικά μόρια. Οι δονήσεις είναι δονήσεις τάσης, στις οποίες μεταβάλλεται μόνο το μήκος του δεσμού και δονήσεις κάμψης στις οποίες μεταβάλλεται μόνο η γωνία μεταξύ των δεσμών.

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολιας διακρίνονται δύο περιοχές, αυτή των χαρακτηριστικών ομάδων (Ο-Η, NH₂, C≡N, C=O κ.α.) και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η περιοχή των χαρακτηριστικών ομαδων εκτείνεται στην περιοχή 4000 - 1400 cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων, ενώ η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων βρίσκεται στα 1400 - 600 cm⁻¹. Στην περιοχή αυτή οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα κάθε ένωσης. Οι περιοχές αυτές είναι ενδεικτικές, ενώ η ερμηνεία των φασμάτων ΙR γίνεται με τη χρήση πινάκων IR που υπάρχουν στην επιστημονική βιβλιογραφία, και οι οποίοι υποδεικνύουν τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις μίας μεγάλης ποικιλίας οργανικών ενώσεων (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6 Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων.

Συνήθως, στο IR χρησιμοποιείται η περιοχή 4000 - 600 cm⁻¹, στην οποία όμως η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο "θόρυβος" να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Αυτή η αδυναμία των κοινών φασματοφωτομέτρων υπερνικήθηκε με τη φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμο κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FTIR).

1.7.2.1 Οργανολογία φασματοφωτόμετρου FTIR

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα: πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, πηγή λέιζερ, συμβολόμετρο Michelson, υποδοχή του δείγματος, ανιχνευτής, υπολογιστής - καταγραφικό και κάτοπτρα (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτομέτρου FTIR με συμβολόμετρο & σχηματικό διάγραμμα συμβολόμετρου Michelson, όπου Π = πηγή, M1 = κάτοπτρο μείξης, M1' = είδωλο του M1 όπως φαίνεται από τη θέση A, M2 = κινητό κάτοπτρο, B = διαιρέτης δέσμης (chopper) και A = αναλυτής.

Η πηγή laser χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, τη μέτρηση των κυματαριθμών και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών. Οι πηγές που χρησιμοποιούν τα φασματοφωτόμετρα FTIR στο μέσο υπέρυθρο φάσμα είναι του ίδιου τύπου με αυτές των συμβατικών φασματοφωτόμετρων IR (λυχνίες Globar ή Nerst). Στην περίπτωση που εξετάζεται η άπω υπέρυθρη περιοχή (FIR), τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί λάμπα υδραργύρου υψηλής πίεσης, ενώ για κοντινό υπέρυθρο (NIR) φάσμα χρησιμοποιούνται συνήθως λάμπες βολφραμίου - αλογόνου.

Το συμβολόμετρο αποτελεί την καρδιά του φασματοφωτόμετρου FTIR, του οποίου η χρήση παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης ενός μονοχρωμάτορα στην καταγραφή του IR φάσματος. Ένα από τα πιο διαδεδομένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα συμβολόμετρα είναι το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.7, αποτελείται από δύο κάτοπτρα M1 και M2, εκ των οποίων το ένα παραμένει σταθερό (fixed mirror), ενώ το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα (moving mirror). Τα επίπεδα των δύο κατόπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους, ενώ ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο κάτοπτρο υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης 50/ 50 (beam splitter). Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο το οποίο αποτελείται από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθρη περιοχή, με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50% αντίστοιχα. Η επιλογή του υλικού για τον διαχωριστή δέσμης γίνεται με βάση την περιοχή του φάσματος που εξετάζεται. Οι διαχωριστές δέσμης που χρησιμοποιούνται στη NIR και FIR περιοχή αποτελούνται συνήθως από υποστρώματα βρομιούχου καλίου ή ιωδιούχου καισίου επικαλυμμένων με υλικά όπως γερμάνιο ή οξείδιο του σιδήρου, ενώ η χρήση λεπτών οργανικών φιλμ (όπως πολυαιθυλενίου) συναντάται στο άπω υπέρυθρο φάσμα.

Η υπέρυθρη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται στο διαχωριστή δέσμης όπου διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, εκ των οποίων η μία προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο ενώ η άλλη στο κινητό και στη συνέχεια, αφού αντανακλαστούν, επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά τη συμβολή, ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στον θάλαμο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρόλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές. Η διαφορά (δ) των οπτικών διαδρομών (optical path difference) μεταξύ των δύο φωτεινών δεσμών ονομάζεται καθυστέρηση και είναι 2(OM2 – OM2'). Όταν δ = κλ (όπου κ = 0,1,2,.... και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας) τότε το σήμα παίρνει τη μέγιστη τιμή, ενώ όταν δ = (2κ+1)λ/ 2 τότε το σήμα μηδενίζεται. Σε κάθε άλλη περίπτωση το σήμα λαμβάνει ενδιάμεση τιμή.

Το συμβολογράφημα αποτελεί ένα φάσμα στον χώρο του χρόνου (time domain spectrum) που καταγράφει τις μεταβολές της απόκρισης του ανιχνευτή (ένταση) συναρτήσει του χρόνου κατά την κατοπτρική σάρωση, και παρέχει πληροφορίες για όλη την υπέρυθρη φασματική περιοχή στην οποία αποκρίνεται ο ανιχνευτής. Το συμβολογράφημα υπόκειται σε μαθηματική επεξεργασία με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, όπου τελικά μετατρέπεται στο ληφθέν φάσμα IR, το οποίο αναπαριστά την ένταση συναρτήσει της συχνότητας (frequency domain spectrum).

Τα φασματοφωτόμετρα FTIR παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές φασματοσκοπίας ΙR κυρίως ως προς την υψηλή ευαισθησία και ταχύτητα που παρουσιάζουν, καθώς και τον βελτιωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο (SNR) ανά μονάδα χρόνου (Fellget advantage). Αυτή η υπεροχή τους οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους που επιτρέπουν τη λήψη ενός πλήρους φάσματος κατά τη διάρκεια μίας μόνο κατοπτρικής σάρωσης, ενώ ο ανιχνευτής μπορεί να παρατηρεί όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα. Η υψηλής ταχύτητας σάρωση που εμφανίζουν επιτρέπει την καταγραφή πολλαπλών φασμάτων σε πολύ μικρό χρόνο (1 min ή και λιγότερο), και ως εκ τούτου η ευαισθησία μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά αυξάνοντας τον λόγο σήματος προς θόρυβο μέσω πολλών επαναλαμβανόμενων σαρώσεων. Επιπλέον, στα όργανα αυτά χρησιμοποιείται συνήθως κυκλικό οπτικό άνοιγμα που επιτρέπει να περνά μέσα από το δείγμα ένα μεγάλο εμβαδόν δέσμης, το οποίο είναι περίπου 75 έως 100 φορές μεγαλύτερο από το πλάτος σχισμής ενός πρίσματος ή φράγματος περίθλασης που χρησιμοποιούν τα κλασικά φασματοφωτόμετρα διασποράς, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος και τη βελτίωση του λόγου SNR (Jacquinot advantage). Επίσης, η ακτίνα laser HeNe, σε συντονισμό με την προσπίπτουσα στο συμβολόμετρο Michelson υπέρυθρη ακτινοβολία, παρέχει τη δυνατότητα ακριβούς καταγραφής της μετατόπισης του κινούμενου κάτοπτρου, ενώ παράλληλα καθορίζει τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων φασμάτων. Τέλος, η χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή στην FTIR φασματοσκοπία προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων αλλά και επεξεργασίας των δεδομένων με μία μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων τεχνικών επεξεργασίας, με αποτέλεσμα την καταγραφή φασμάτων πολύ υψηλής ποιότητας.

Η καταγραφή φασμάτων με το μετασχηματισμό Fourier παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Η υγρασία του δείγματος και η υγρασια του χώρου τοποθέτησης του δείγματος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλή. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με την τεχνική της λυοφιλίωσης των δειγμάτων και με την τοποθέτηση στον χώρο του δείγματος αφυγραντικών (π.χ. silica gel) ή τη διαβίβαση ξηρού αέρα ή αζώτου. Επίσης, λόγω της παρουσίας στο χώρο των οργάνων ατμοσφαιρικού αέρα, το φάσμα που καταγράφεται

λαμβάνει υπόψη του και τα αέρια συστατικά που απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί και διοξείδιο του άνθρακα). Για το λόγο αυτό, πριν από τη λήψη του δείγματος γίνεται καταγραφή του φάσματος αναφοράς.

Το φάσμα αναφοράς λαμβάνεται με τον υποδοχέα του δείγματος, χωρίς δείγμα, αλλά περιέχοντας κατά περίπτωση βρωμιούχο κάλιο ή το διαλύτη διάλυσης του δείγματος ή μόνο ατμοσφαιρικό αέρα. Το φάσμα αναφοράς στη συνέχεια αφαιρείται αυτόματα, με τη βοήθεια του λογισμικού, από το συνολικό φάσμα. Πριν από την καταγραφή των φασμάτων πρέπει να γίνεται ευθυγράμμιση των οπτικών μερών του φασματοφωτομέτρου. Η διαδικασία αυτή γίνεται αυτόματα με τη βοήθεια λογισμικού οργάνου. Κυρίως η ευθυγράμμιση αποσκοπεί στο να είναι ίσες οι γωνίες που σχηματίζει ο διαχωριστής δέσμης με το κινούμενο και το ακίνητο κάτοπτρο.

1.7.2.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)

Οι τεχνικές ανάκλασης ΙR στην υπέρυθρη φασματοσκοπία χρησιμοποιούνται για την ανάλυση δειγμάτων τα οποία είναι δύσκολο να μελετηθούν με τις συμβατικές φασματοσκοπικές μεθόδους διαπερατότητας. Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάκλασης που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως από τα φασματοφωτόμετρα FTIR κυρίως για επιφανειακές αναλύσεις, είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR), η οποία είναι κατάλληλη για τη μελέτη δειγμάτων μεγάλου πάχους ή υψηλά απορροφητικών και αδιαφανών στερεών ή υγρών υλικών που περιλαμβάνουν λεπτά φιλμ και επικαλύψεις, κονιοποιημένα υλικά (σκόνες), νήματα, πάστες, κόλλες, λεπτά υμένια πολυμερών και υδατικά διαλύματα.

Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection) το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n₁) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n₂). Το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται όσο μεγαλώνει η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας. Όταν η γωνία πρόσπτωσης *θ* είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία *θc*, η οποία αποτελεί συνάρτηση των δεικτών διάθλασης των δύο μέσων και ορίζεται ως: $θc = \sin^{-1} (n_2/n_1)$, τότε όλες οι προσπίπτουσες ακτινοβολίες ανακλώνται πλήρως στη διεπιφάνεια των δύο μέσων με αποτέλεσμα να συμβαίνει ολική εσωτερική ανάκλαση.

Στα ATR εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (Internal Reflection Element, IRE) ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία 45°) υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται. Η εσωτερική ολική ανάκλαση της ακτινοβολίας στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μέσων με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φθίνοντος κύματος (evanescent wave), το οποίο διεισδύει κι εκτείνεται στο μέσο με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης (δείγμα) και εξασθενεί (attenuates) στις περιοχές του υπέρυθρου ηλεκτρομαγνητικού φάσματος όπου

το δείγμα απορροφά ενέργεια. Η ένταση του κύματος αυτού μειώνεται εκθετικά με την απόσταση από την επιφάνεια του κρυστάλλου σύμφωνα με την παρακάτω σχέση: $Iev = I_o$ exp $[-z/d_p]$, (όπου z είναι η απόσταση κάθετα στην οπτική διεπιφάνεια, I_o η ένταση στο σημείο z = 0, και d_p το βάθος διείσδυσης), επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ανάλυση δειγμάτων μεγάλου πάχους ή υψηλής απορροφητικότητας.

Οι ΑΤR κρύσταλλοι, κατασκευάζονται από υλικά που έχουν πολύ υψηλό δείκτη διάθλασης και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Επίσης το μήκος του ΑΤR κρυστάλλου καθορίζει την ευαισθησία της τεχνικής. Για μια δεδομένη γωνία πρόπτωσης της ακτινοβολίας, η αύξηση του λόγου του μήκους προς το πάχος του κρυστάλλου παρέχει μεγαλύτερο αριθμό ανακλάσεων.

Η ATR-FTIR φασματοσκοπία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πιο ευέλικτες μεθόδους, η οποία παρέχει φάσματα πολύ υψηλής ποιότητας για μία πολύ μεγάλη ποικιλία υλικών. Το βασικό πλεονέκτημα της ATR-FTIR μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτεί οποιαδήποτε επεξεργασία ή ομογενοποίηση του δείγματος, παρά μόνο μία ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο ως έχει. Για την επίτευξη καλής επαφής, που έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια των ληφθέντων φασμάτων, χρησιμοποιείται κατάλληλος εξοπλισμός που πιέζει το δείγμα πάνω στον κρύσταλλο.

1.8 Μικροβιολογία Πρόρρησης

Μία εναλλακτική λύση στην ανάπτυξη γρήγορων μεθόδων προσδιορισμού της μικροβιακής ποιότητας των τροφίμων αποτελεί η Μικροβιολογία Πρόρρησης (Predictive Microbiology). Η Μικροβιολογία Πρόρρησης αποτελεί την έκφραση της επίδρασης των συνθηκών του περιβάλλοντος στη συμπεριφορά των μικροοργανισμών, με ποσοτικούς όρους. Αναλυτικότερα, βασίζεται στην ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων που μπορούν να προβλέψουν το ρυθμό αύξησης ή και θανάτου των μικροοργανισμών υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των πολλαπλών ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και των αλληλεπιδράσεών τους. Τα μαθηματικά μοντέλα αναπτύσσονται με την παρακολούθηση της μικροβιακής συμπεριφοράς υπό την επίδραση των κύριων ρυθμιστικών παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα του νερού, η σύσταση της ατμόσφαιρας, τα πρόσθετα, καθώς και ο συνδυασμός αυτών. Στη συνέχεια, τα μοντέλα μοορετικές συνθήκες.

1.8.1 Κινητική των μικροοργανισμών

Με βάση τη σιγμοειδή καμπύλη της εικόνας 1.9 η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις φάσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως: λανθάνουσα φάση (Lag phase), εκθετική φάση (exponential phase), φάση στασιμότητας (stationary phase) και φάση κάμψης ή θανάτου (death phase).


Εικόνα 1.9 Απεικόνιση της μικροβιακής καμπύλης ανάπτυξης συναρτήσει του χρόνου.

Στη λανθάνουσα φάση ο μικροοργανισμός προσαρμόζει τη φυσιολογία και τις βιοχημικές του λειτουργίες ώστε να ανταποκριθεί στο νέο περιβάλλον. Στη φάση αυτή δεν υπάρχει μεταβολή του αριθμού των κυττάρων, ενώ η διάρκειά της εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο νέο περιβάλλον καθώς και από την ιστορία των μικροοργανισμών. Η εκθετική ή λογαριθμική φάση που ακολουθεί, χαρακτηρίζεται από λογαριθμική αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών ανά μονάδα χρόνου, όπως φαίνεται και από τη θετική κλίση της καμπύλης. Για όσο χρονικό διάστημα υπάρχει περίσσεια υποστρώματος, ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ο μέγιστος και είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ ολόκληρη η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων κατευθύνεται στην αναπαραγωγή. Καθώς ο πληθυσμός των κυττάρων συνεχίζει να αυξάνεται, η συσσώρευση των μεταβολιτών μέσα στο περιβάλλον φτάνει σε επίπεδο στο οποίο παρεμποδίζεται πλέον η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στο θάνατο κάποιων. Έτσι, ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού σταδιακά μειώνεται, μέχρι που οδηγείται στην επόμενη φάση της κινητικής ανάπτυξης. Στη φάση στασιμότητας, το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί, ο ρυθμός ανάπτυξης μηδενίζεται, ο αριθμός των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός και όπως φαίνεται στην καμπύλη, ο λογάριθμος του πληθυσμού αποκτά σταθερή τιμή. Η διάρκεια αυτής της φάσης ποικίλλει, και στο τέλος η συσσώρευση τοξινών στο περιβάλλον, οδηγεί στο σταδιακό θάνατο των κυττάρων και τη μετάβαση στην επόμενη φάση. Τέλος, στη φάση θανάτου, οι μικροοργανισμοί πεθαίνουν λόγω έλλειψης ενέργειας, ο πληθυσμός μειώνεται και αντίστοιχα η καμπύλη αποκτά πλέον αρνητική κλίση.

Οι πιο σημαντικές φάσεις ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού για την προρρητική μικροβιολογία είναι η λανθάνουσα φάση και η φάση στασιμότητας. Κατά τη λανθάνουσα φάση, ο μικροοργανισμός δεν πολλαπλασιάζεται, άρα η επιμήκυνσή της ωφελεί στην αύξηση της συντήρησης του τροφίμου. Συνεπως, η διάρκεια της φάσης αυτής και οι παράγοντες που την επηρεάζουν αποτελούν σημαντικές γνώσεις για την αλλοίωση των τροφίμων. Αντίστοιχα, η κινητική ανάπτυξης στην εκθετική φάση αποτελεί σημαντική γνώση για την πρόβλεψη της ημερομηνίας λήξης του τροφίμου. Συνεπώς, για να εκτιμηθεί σε πόσο χρόνο ο πληθυσμός των μικροοργανισμών θα φτάσει σε απαγορευτικά επίπεδα

για την κατανάλωση του τροφίμου, πρέπει να είναι γνωστή η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης αλλά και ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

1.8.2 Μοντέλα πρόβλεψης

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης των μαθηματικών μοντέλων που προτάθηκε από τους Whiting και Buchanan (1993), τα μοντέλα διακρίνονται σε Πρωτογενή, Δευτερογενή, και Τριτογενή. Τα Πρωτογενή Μοντέλα (Primary Models) περιγράφουν τις μεταβολές του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε σχέση με το χρόνο. Τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης όπως είναι ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης, ο χρόνος γενεάς, η διάρκεια λανθάνουσας φάσης και η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού. Τα Δευτερογενή Μοντέλα (Secondary Models) χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. θερμοκρασία, ατμόσφαιρα, pH, ενεργότητα νερού) σε μία από τις κινητικές παραμέτρους ανάπτυξης (π.χ. μέγιστη ταχύτητα ανάπτυξης, χρόνος υστέρησης). Για παράδειγμα, για κάθε θερμοκρασία μπορεί να υπολογιστεί ο αντίστοιχος ρυθμός ανάπτυξης με τη χρήση ενός πρωτογενούς μοντέλου. Στη συνέχεια οι ρυθμοί ανάπτυξης που αντιστοιχούν στις διαφορετικές θερμοκρασίες προσαρμόζονται σε ένα δευτερογενές μοντέλο έτσι ώστε η επίδραση της θερμοκρασίας να εκφραστεί ποσοτικά με μια μαθηματική εξίσωση η οποία θα επιτρέπει στον τελικό χρήστη να προσδιορίσει τον ρυθμό ανάπτυξης σε μία θερμοκρασία. Τα Τριτογενή Μοντέλα (Tertiary Models) συνδυάζουν πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα με φιλικά προς το χρήστη πακέτα λογισμικών ώστε να μην απαιτούνται γνώσεις των τεχνικών της μικροβιολογίας πρόρρησης από τους τελικούς χρήστες. Συνεπώς, τα μοντέλα αυτά μετατρέπουν τη μικροβιολογία πρόρρησης σε ένα προσιτό και χρήσιμο εργαλείο για τη βιομηχανία τροφίμων. Στον Πίνακα 1.5 παρουσιάζονται τα κυριότερα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης που χρησιμοποιούνται στην επιστήμη τροφίμων.

Πρωτογενή Μοντέλα	Δευτερογενή Μοντέλα	Τριτογενή Μοντέλα
Μοντέλο Gompertz ¹	Μοντέλο Belehradek ⁹	USDA Pathogen Modeling
		Program ¹⁵
Τροποποιημένο μοντέλο	Μοντέλο Ratkowsky ¹⁰	Food Micromodel ¹⁶
Gompertz ²		
Λογιστικό μοντέλο ³	Μοντέλο Arrhenius ¹¹	Pseudomonas Predictor ¹⁷
Μοντέλο Richards ⁴	Μοντέλο Schoolfield ¹²	Expert Systems ^{18,19}
Μοντέλο Baranyi⁵	Μοντέλο Davey ¹³	Seafood Spoilage and Safety
		Predictor (SSSP) ²⁰
1 ^{ης} τάξης μοντέλο Monod ⁶	Μοντέλα πιθανοτήτων ¹⁴	Food Spoilage Predictor (FSP) ²¹
Τροποποιημένο μοντέλο		Safety Monitoring and
Monod ⁷		Assurance System (SMAS) ²²

Πίνακας 1.5 Βασικά μοντέλα πρόβλεψης που χρησιμοποιούνται για τη Μικροβιολογία Πρόρρησης στην επιστήμη τροφίμων (McDonald et al., 1999)

Γραμμικό μοντέλο 3 φάσεων⁸

¹Gibson *et al.* (1987), ²Zwietering *et al.* (1990), ³Jason (1983), ⁴Pruit *et al.* (1979), ⁵Baranyi *et al.* (1993), ⁶Monod (1949), ⁷Houtsma *et al.* (1996), ⁸Buchanan *et al.* (1997), ⁹Belehradek (1930), ¹⁰Ratkowsky *et al.* (1982), ¹¹Arrhenius (1889), ¹²Schoolfield *et al.* (1981), ¹³Davey (1989, 1993), ¹⁴Hauschild (1982), ¹⁵Buchanan (1991), ¹⁶McClure *et al.* (1994), ¹⁷Neumeyer *et al.* (1997a), ¹⁸Zwietering *et al.* (1992), ¹⁹Voyer *et al.* (1993), ²⁰Dalgaard *et al.* (2003), ²¹Neumeyer *et al.* (1997b), ²²Koutsoumanis *et al.* (2003)

1.8.3 Βασικά στοιχεία για τα Πρωτογενή Μοντέλα

Είναι γνωστό ότι η εκθετική αύξηση των μικροοργανισμών σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα περιγράφεται μαθηματικά από την παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{\mathrm{d}\mathrm{N}(\mathrm{t})}{\mathrm{d}\mathrm{t}} = \mu_{\max} * \mathrm{N}(\mathrm{t})$$

(Εξίσωση 1.1)

όπου,

dN/ dt : η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων στο χρόνο,

N(t) : η συγκέντρωση των μικροοργανισμών τη χρονική στιγμή t (CFU/ ml),

 μ_{max} : ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης.

Ωστόσο, σε πραγματικές συνθήκες, το περιβάλλον ανάπτυξης δεν είναι απεριόριστο και ο ειδικός ρυθμός αύξησης δεν είναι σταθερός, αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με την πυκνότητα του πληθυσμού. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται το μοντέλο λογισμικού τύπου το οποίο περικλείει έναν παράγοντα παρεμπόδισης για να περιγράψει τη στατική φάση. Ο παράγοντας παρεμπόδισης είναι ένας μειούμενος παράγοντας και παίρνει τιμές από 0 έως 1. Όταν ο πληθυσμός πλησιάζει προς τη στατική φάση, ο παράγοντας μ_{max}(1 - N(t)/ N_{max}) πλησιάζει προς το μηδέν. Η διαφορική μορφή του λογισμικού μοντέλου (Εξίσωση 1.2) δείχνει πως ο ρυθμός αύξησης μειώνεται όταν η συγκέντρωση των κυττάρων Ν προσεγγίζει το N_{max}. Το μοντέλο είναι αυτόνομο όταν η μικροβιακή ανάπτυξη εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση των κυττάρων.

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{max} * \left(1 - \frac{N(t)}{N_{max}}\right) * N(t)$$

(Εξίσωση 1.2)

όπου,

N_{max} : η μέγιστη συγκέντρωση των μικροοργανισμών (CFU/ ml).

Έχουν διατυπωθεί επίσης, περισσότερο ευέλικτα μοντέλα, όπως το μοντέλο Richards, που περιλαμβάνει την παράμετρο m για τον έλεγχο του βαθμού της ανάπτυξης, όταν η τιμή N προσεγγίζει την τιμή N_{max}, που περιγράφεται από την εξίσωση 1.2 (Pruitt et al., 1979, Turner et al., 1976). Το μοντέλο του Richards εμπεριέχει το λογιστικό μοντέλο ως μία ειδική περίπτωση όπου η παράμετρος m είναι ίση με 1. Το μοντέλο αυτό δεν εφαρμόζεται συχνά, λόγω των μεγάλων στατιστικών σφαλμάτων που περιλαμβάνουν οι κινητικές του παράμετροι και ειδικότερα η παράμετρος m (Ratkowsky, 1983).

$$\frac{\mathrm{dN}(t)}{\mathrm{dt}} = \mu_{\max} * \left(1 - \frac{\mathrm{N}(t)^{\mathrm{m}}}{\mathrm{N}_{\mathrm{max}}^{\mathrm{m}}}\right) * \mathrm{N}(t)$$

(Εξίσωση 1.3)

Το μοντέλο του Gompertz μπορεί να θεωρηθεί ως μια ειδική περίπτωση του μοντέλου του Richards όπου η παράμετρος m τείνει στο 0 και το γινόμενο μ_{max}* x * m τείνει στο μ' (Εξίσωση 1.4). Το μοντέλο δεν εμπεριέχει παράμετρο για τη λανθάνουσα φάση και διαφέρει πολύ από το λογιστικό μοντέλο. Ενώ εμφανίζει πολύ καλά αποτελέσματα, η ακρίβειά του επηρεάζεται έντονα από τον αριθμό των παρατηρήσεων για την καμπύλη ανάπτυξης και τη στατιστική ποιότητα αυτών των μετρήσεων.

$$dN = \ln\left(1 + \frac{1}{qo}\right) = \mu_{\max} * \lambda$$

(Εξίσωση 1.4)

Οι Gibson *et al* (1988) και Zwietering *et al* (1990) πρότειναν δύο τροποποιήσεις του μοντέλου του Gompertz. Στις τροποποιήσεις αυτές έχει εφαρμοστεί μια λογαριθμική μετατροπή αλλά μόνο στην αριστερή πλευρά της συνάρτησης. Με αυτή τη μετατροπή η συνάρτηση του Gompertz αλλάζει τελείως ενώ μπορεί να περιγράψει και την λανθάνουσα φάση.

Λόγω της μονόπλευρης λογαριθμικής μετατροπής στην τροποποιημένη συνάρτηση του Gompertz, η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης και ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης δεν αντιπροσωπεύουν τις αντίστοιχες τιμές των κλασσικών μοντέλων ανάπτυξης. Οι υπολογισμοί της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης χαρακτηρίζονται από μικρή ακρίβεια ενώ μπορεί να πάρουν και αρνητικές τιμές. Οι υπολογισμοί του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης με την τροποποιημένη συνάρτηση του Gompertz είναι υπερεκτιμημένοι κατά 10 - 20 % (Baranyi et al., 1993, McClure et al., 1994).

Το μοντέλο Baranyi αναφέρεται ως ένα μηχανιστικό μοντέλο, όπου ο μέγιστος ρυθμός βακτηριακής ανάπτυξης εξαρτάται από το χρόνο και τη συγκέντρωση των κυττάρων (Baranyi et al., 1993, 1994). Περιλαμβάνει το μοντέλο Richards και μία εξίσωση για τη φάση υστέρησης. Παρόλο που το μοντέλο αυτό είναι πολύπλοκο, η ανάπτυξη ειδικού λογισμικού (Dmfit, Institute of Food Research, Reading, UK) για την εφαρμογή του και την προσαρμογή στις καμπύλες, έχει κάνει τη χρήση του πολύ εύκολη και διαδεδομένη στη μικροβιολογία πρόρρησης.

Το μοντέλο Baranyi αποδίδεται στην ανάγκη για σύνθεση ενός άγνωστου υποστρώματος q, το οποίο θεωρείται κρίσιμο για την αύξηση. Όταν τα κύτταρα προσαρμοστούν σε ένα νέο υπόστρωμα αναπτύσσονται εκθετικά μέχρι να περιοριστούν από τους παράγοντες του μέσου αύξησης. Η μικροβιακή αύξηση περιγράφεται από την εξίσωση 1.5.

$$\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} = \frac{q(t)}{q(t)+1} * \mu_{\max} * \left(1 - \left(\frac{x(t)}{x_{\max}}\right)^{\mathrm{m}}\right) * x(t)$$

(Εξίσωση 1.5)

όπου,

x(t) : ο αριθμός των κυττάρων σε χρόνο t, x_{max} : η μέγιστη πυκνότητα των κυττάρων, q(t) : η συγκέντρωση του υποστρώματος.

Το υπόστρωμα ανάπτυξης μεταβάλλεται με το χρόνο, δηλαδή:

$$\frac{\mathrm{d}q}{\mathrm{d}t} = \mu_{\max} * q(t)$$

(Εξίσωση 1.6)

Η αρχική τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος (q0) είναι η μέτρηση της αρχικής φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων. Το q0 μπορεί να οριστεί και ως εξής:

$$ho = \ln\left(1 + \frac{1}{qo}\right) = \mu_{max} * \lambda$$

(Εξίσωση 1.7)

1.8)

Η παράμετρος m χαρακτηρίζει τη καμπυλότητα πριν τη φάση σταθεροποίησης. Όταν m = 1 η συνάρτηση μετατρέπεται σε μία λογιστική καμπύλη, μία απλούστευση του μοντέλου, που συχνά θεωρείται δεδομένη. Συνεπώς, η τελική μορφή του μοντέλου έχει τέσσερις παραμέτρους, που είναι οι εξής:

- x_{o} : o arclikóg ariθμός των κυττάρων,
- h_o : η μεταβαλλόμενη παράμετρος της φυσιολογικής κατάστασης,
- x_{max}: η μέγιστη κυτταρική πυκνότητα,
- μ_{max}: ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (h⁻¹).

Η τελική μορφή της εξίσωσης Baranyi και Roberts (1994) είναι :

$$\begin{split} y(t) &= yo + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m}\ln\left(1 + \frac{e^{m_{\mu max}A(t) - 1}}{e^{m(ymax - yo)}}\right) \\ A(t) &= t + \frac{1}{v}\ln\left(\frac{e^{-vt} + qo}{1 + qo}\right) \end{split} \tag{ESioword}$$

όπου,

 ν : ο ρυθμός αύξησης του περιοριστικού υποστρώματος το οποίο θεωρείται ότι είναι ισοδύναμο με το μ_{max}.

Η τιμή της συνάρτησης A(t) σε συνδυασμό με τις συνθήκες που επικρατούν πριν τον ενοφθαλμισμό, χρησιμεύουν για την πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης προσαρμογής των μικροοργανισμών.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα στη μικροβιολογία τροφίμων και δίνουν ικανοποιητικά ακριβείς προβλέψεις. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε το πρωτογενες μοντέλο Baranyi. Το μοντέλο Baranyi (Baranyi et al., 1993) αποσκοπεί να δώσει μία πιο μηχανιστική περιγραφή για τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, η οποία αποτελεί μία διαδικασία προσαρμογής σε ένα νέο περιβάλλον.

1.9 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθούν νέες, σύγχρονες, ταχείες μέθοδοι στον τομέα της αλλοίωσης των τροφίμων και να ερευνηθεί η αποτελεσματικότητά τους. Μελετήθηκε η μικροβιακή χλωρίδα φιλέτων τσιπούρας και λαβρακιού που συσκευάστηκαν σε αέρα και MAP και συντηρήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ειδικότερα, μελετήθηκαν η ολική μικροβιακή χλωρίδα καθώς και οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp., Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, LAB και ζύμες, και υπολογίστηκαν οι κινητικές τους παράμετροι. Εξετάστηκαν τα δεδομένα για την εξέλιξη της μικροβιακής χλωρίδας από τα φασματοσκοπικά όργανα FTIR και VideometerLab και συσχετίστηκαν με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα με σκοπό την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης της μικροβιακής αλλοίωσης των φιλέτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν νωπά φιλέτα τσιπούρας (Sparus aurata) και λαβρακιού (Dicentrarchus labrax) συσκευασμένα σε αερόβιες συνθήκες και υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα δείγματα παραλήφθηκαν από την εταιρεία Σελόντα Α.Ε. (ελληνικής υδατοκαλλιέργειας). Τα φιλέτα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε πάγο, συσκευάστηκαν στο εργαστήριο σε δίσκο πολυστυρενίου και καλύφθηκαν με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου οικιακής χρήσης, διαπερατή στο O₂. Τα δείγματα που παραλήφθηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, με δύο φιλέτα ανά συσκευασία, μεταφέρθηκαν σε συνθήκες ψύξης. Αμέσως με την παραλαβή και τη συσκευασία τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους θαλάμους συντήρησης (MIR-153, Sanyo electric Co., Osaka, Japan) σε θερμοκρασίες Ο, 4, 8 και 12 °C. Πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες (A, B) σε κάθε πείραμα, από δύο διαφορετικούς αναλυτές.



Εικόνα 2.1 Δείγματα φιλέτων λαβρακιού και τσιπούρας σε συσκευασία ΜΑΡ.

2.2 Δειγματοληψία και μικροβιολογικές αναλύσεις

Από κάθε δείγμα λήφθηκαν ασηπτικά 25 g, τοποθετήθηκαν σε ειδική σακούλα ομογενοποίησης (BagLight[®], INTERSCIENCE, France) και μετά την προσθήκη 225 ml αποστειρωμένου διαλύματος MRD (0.85% w/v NaCl και 0.1% w/v Bacteriological peptone) ομογενοποιήθηκαν για 60 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στη συσκευή Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK).

Στη συνέχεια, από το ομογενοποιημένο δείγμα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με το διάλυμα MRD. Με την κατάλληλη κάθε φορά αραίωση των δειγμάτων έγινε εμβολιασμός σε αποστειρωμένα θρεπτικά υποστρώματα για την μελέτη της ανάπτυξης διαφόρων μικροοργανισμών.

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των μικροοργανισμών ήταν τα παρακάτω:

 Plate Count Agar (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, επώαση στους 25 °C για 2 ημέρες.

- Pseudomonas Agar Base (LAB108, LAB M., U.K.) με την προσθήκη του αντιβιοτικού Cetrimide-Fusidin-Cephaloridine (Modified C.F.C. X108, LAB M, UK), για την καταμέτρηση των Pseudomonas spp., επώαση στους 25 °C για 2 ημέρες.
- ✓ VRBG, Violet Red Bile Glucose Agar, (VRBG, Biolife) για την καταμέτρηση των Enterobacteriaceae, επώαση στους 37 °C για 1 ημέρα.
- Shewanella putrefaciens, Iron Agar (Lungby) Code: CM 867, Oxoid manual, για την καταμέτρηση των βακτηρίων που παράγουν H₂S, επώαση στους 25 °C για 2 ημέρες. Το υλικό παρασκευάσθηκε από τα συστατικά του σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base, STAA (Ref. 4020792, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy) με την προσθήκη αντιβιοτικού (Ref. 4240052, Biolife, Italiana S.r.1, Milano, Italy), για την καταμέτρηση του *B. thermosphacta*, επώαση στους 25 °C για 3 ημέρες.
- Επιλεκτικό υπόστρωμα de Man, Rogosa and Sharpe agar ISO Formulation, (MRS, Biolife) (Ref. 401728S2, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση των γαλακτικών βακτηρίων, επώαση στους 25 °C για 3-5 ημέρες.
- RBC Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (RBC, LAB M Limited) LAB 036 με την προσθήκη αντιβιοτικού X009 (Chloramphenicol, LAB M Limited) για την καταμέτρηση των ζυμών, επώαση στους 25 °C για 3-5 ημέρες.

Μετά την απαρίθμηση των αποικιών τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε log colony forming units / g δείγματος (log CFU / g).



Εικόνα 2.2 Αποικίες των δειγμάτων που επωάστηκαν στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα.

2.3 Μέτρηση αερίων

Η μέτρηση της σύστασης των αερίων έγινε στα δείγματα που ήταν συσκευασμένα υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες με το μετρητικό όργανο Dansensor CheckMate 9900 O₂/CO₂ (PBI-Dansensor A/S, Denmark) ακρίβειας ±1. Πριν από τη δειγματοληψία η βελόνα του οργάνου τοποθετήθηκε μέσα στην κλειστή συσκευασία και καταγράφηκε η μέτρηση.



Εικόνα 2.3 Μετρητικό όργανο Dansensor CheckMate 9900 O₂/CO₂ (PBI-Dansensor A/S, Denmark).

2.4 Οργανοληπτικός έλεγχος

Στην αρχή της δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση από τον αναλυτή ως προς το χρώμα και την οσμή του φιλέτου. Η κλίμακα αξιολόγησης ορίστηκε από το μηδέν έως το πέντε, με το μηδέν να χαρακτηριζει το φρέσκο, το τρία το όριο της αποδοχής και το πέντε το αλλοιωμένο φιλέτο ψαριού. Οι αναλυτές ήταν μη εκπαιδευμένοι και αξιολόγησαν ως καταναλωτές.

2.5 Μέτρηση pH

Η τιμή του pH του κάθε δείγματος μετρήθηκε με το όργανο Russell RL150 (Russell Inc, Boston, U.S.A.) ακρίβειας ±0,2. Μετά την ολοκλήρωση των μικροβιολογικών αναλύσεων και αφού είχε γίνει βαθμονόμηση του οργάνου, το ηλεκτρόδιο του οργάνου βυθίστηκε στη σακούλα Stomacher που περιείχε την αρχική αραίωση του ομογενοποιημένου δείγματος και καταγράφηκε η μέτρηση.

2.6 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging)

Η λήψη πολυφασματικών εικόνων πραγματοποιηθηκε με τη συσκευή VideometerLab της Videometer A/S (Videometer, 2018) (Carstensen and Hansen, 2003) με την οποία λαμβάνονται ποσοτικές μετρήσεις των οπτικών ιδιοτήτων δειγμάτων ή επιφανειών (<u>www.videometer.com</u>). Η εικόνα που λαμβάνεται αποτελεί μια πολυφασματική εικονα από 18 στιγμιότυπα (μήκη κύματος) που κατανέμονται από την περιοχή του υπεριώδους (405 nm) έως την περιοχή του εγγύς υπερύθρου (970 nm). (Panagou et al., 2014, Ropodi et al., 2015). Η καταγραφή της ανάκλασης από την επιφάνεια του δείγματος πραγματοποιείται από μία τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (Charge Coupled Device chip, CCD chip) η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε κάμερα τύπου Point Grey Scorpion.

Το δείγμα τοποθετήθηκε εντός της σφαίρας Ulbricht η οποία είναι λευκού χρώματος, έχει εσωτερικά επίστρωση ματ και στην οροφή της έχει την κάμερα. Η ματ επίστρωση και το σφαιρικό σχήμα συντελούν στην ομοιογενή ανάκλαση του φωτός εντός της σφαίρας. Περιμετρικά της σφαίρας και αντιδιαμετρικά μεταξύ τους είναι τοποθετημένοι δίοδοι εκπομπής φωτός (Light Emitting Diodes, LEDs) 18 μηκών κύματος. Όταν λαμβάνεται εικόνα,

οι δίοδοι εκπομπής φωτός ανάβουν διαδοχικά και η ανάκλαση του συγκεκριμένου μήκους κύματος καταγράφεται από την κάμερα μέσα στην σφαίρα. Με αυτό τον τρόπο λαμβάνεται μία μονόχρωμη εικόνα με ακρίβεια 32-bit για κάθε LED τύπο καταλήγοντας σε έναν υπερφασματικό κύβο με διαστάσεις 1280 x 960 x 18 (m x n x 18, όπου m x n το μέγεθος της εικόνας σε pixels) (Dissing et al., 2013, Tsakanikas et al., 2015).

Πριν την πρώτη χρήση του VideometerLab, για κάθε διαφορετική κατηγορία δείγματος, εφαρμόστηκε η διαδικασία autolight, κατά την οποία δημιουργείται αρχείο με την πρώτη απεικόνιση της κάθε κατηγορίας. Το αρχείο αυτό ανακαλείται με τη διαδικασία του light set up, έτσι ώστε να προετοιμάζονται οι δίοδοι εκπομπής φωτός με βάση τον τύπο του αντικειμένου προς απεικόνιση και ακολουθεί η γεωμετρική και ραδιομετρική βαθμονόμηση της συσκευής με τη χρήση προτύπων στόχων (πλακέτες ακριβείας) (Folm-Hansen 1999). Με αυτή τη διαδικασία διασφαλίζεται ένα μέσο δυναμικό εύρος φωτός και ελαχιστοποιούνται φαινόμενα όπως οι σκιές και η παραμόρφωση ειδώλων (Panagou et al., 2014)

Τμήμα φιλέτου από το δείγμα μεταφέρθηκε σε τρυβλία Petri τα οποία τοποθετήθηκαν κάτω από τη σφαίρα Ulbricht ώστε να ληφθεί η εικόνα τους. Από κάθε δείγμα λήφθηκαν δύο εικόνες, μία από την επιδερμίδα και μία από τη σάρκα του.



Εικόνα 2.4 Όργανο VideometerLab της Videometer A/S (Videometer, 2018).

Απόκτηση δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης από το VideometerLab

Στις εικόνες που λήφθηκαν από το VideometerLab ήταν απαραίτητη η απομόνωση του προς εξέταση δείγματος (Main Region of Interest, ROI) από την μη χρήσιμη πληροφορία, όπως το περίγραμμα του τρυβλίου και τον περιβάλλοντα χώρο του τρυβλίου (Ropodi et al., 2013, Tsakanikas et al., 2015).

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα VideometerLab version 2.12.39, (Videometer A/S, Denmark) που βασίζεται στην κανονική διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminal Analysis, CDA) η οποία διαχωρίζει τις απεικονίσεις με βάση τις περιοχές ενδιαφέροντος, δηλαδή προσδιορίζει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό δύο ή περισσότερων κλάσεων σύμφωνα με τον αριθμό των ανεξάρτητων μεταβλητών (Daugaard et al., 2010).

$$R(a) = \frac{\alpha^{T} \Sigma_{s} \alpha}{\alpha^{T} \Sigma_{N} \alpha}$$

(Carstensen et al., 2003) (Εξίσωση 2.1) όπου, Σ_s = Α : η διασπορά μεταξύ των κλάσεων, Σ_N = W : η διασπορά μέσα στις κλάσεις.

Μετά το διαχωρισμό αυτό, υπολογίστηκε για κάθε εικόνα η μέση φασματοσκοπική ανάκλαση σε κάθε μήκος κύματος, όπως αυτή προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI). Παράλληλα, υπολογίστηκε και η τυπική απόκλιση της έντασης των εικονοστοιχείων ανά μήκος κύματος. Τα τελικά δεδομένα που προέκυψαν ήταν 18 μέσοι οροι ανάκλασης με 18 τυπικές αποκλίσεις ανάκλασης και τα αντίστοιχα 18 μήκη κύματος (Estelles-Lopez et al., 2017) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μοντέλων για την μηχανική εκμάθηση του οργάνου (Videometer A/S, Denmark).

2.7 Εφαρμογή Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Για τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometry, ATR-FTIR) χρησιμοποιήθηκε ο κρύσταλλος ZnSe 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) (PIKE technologies, Madison, WI, USA) με δείκτη διάθλασης 2.4 και βάθος διείσδυσης 2.0 μm στα 1000 cm⁻¹ καθώς και το φασματόμετρο τύπου FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan), εξοπλισμένο με ανιχνευτή TGS (θειική τριγλυκίνη) και με διαχωριστή δέσμης Ge/KBr. Το φασματοφωτόμετρο λειτουργούσε με το λογισμικό Manager[™] Code of Federal Regulations (CFR) version 2 (Jasco Corp.), μεταξύ των κυματαριθμών 4000-400 cm⁻¹, ενώ ο αριθμός των σαρώσεων ανά μέτρηση ήταν 100 και η κάθε μέτρηση διαρκούσε 2 λεπτά.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο FT-IR για την καταγραφή του φάσματός τους. Το κάθε δείγμα κόπηκε σε λωρίδες, σε κατάλληλες διαστάσεις, ώστε να εφαρμόζει πλήρως στον κρύσταλλο και να εφάπτεται πλήρως η υπό μελέτη επιφάνεια (επιδερμίδα ή σάρκα). Στη συνέχεια, ο κρύσταλλος με το δείγμα τοποθετήθηκε στην κατάλληλη υποδοχή του οργάνου για να ληφθεί η μέτρηση. Πριν από την μέτρηση των δειγμάτων και μεταξύ των μετρήσεων λαμβάνονταν το φάσμα αναφοράς (background spectra), χρησιμοποιώντας τον καθαρό κρύσταλλο χωρίς δείγμα. Μετά από κάθε μέτρηση, η επιφάνεια του κρυστάλλου καθαρίζονταν με σαπούνι, ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και ακετόνη και αφήνονταν να στεγνώσει πριν επαναχρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 2.5 Όργανο FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan).

2.8 Κινητικές παράμετροι μικροβιακής ανάπτυξης

Με βάση τα μικροβιολογικά αποτελέσματα υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι αύξησης για την OMX καθώς και για τις κατηγορίες μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp., βακτήρια που παράγουν H₂S, Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, LAB και ζύμες χρησιμοποιώντας το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα DMFit του excel (Institute of Food Research, Reading, UK, διαθέσιμο στο <u>www.combase.cc</u>) και προσδιορίστηκαν ο χρόνος της φάσης προσαρμογής (lag phase duration, λ), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (maximum specific growth rate, μ_{max}), ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (y_o) και ο μέγιστος τελικός μικροβιακός πληθυσμός (y_{end}).

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m} ln \left(1 + \frac{e^{m\mu maxA(t)} - 1}{e^{m(yend-y_0)}}\right)$$
(Baranyi και Roberts, 1994)

(Εξίσωση 2.2)

όπου,

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max}t} + e^{-ho} + e^{-\mu_{max}t - ho})$$

- y_{end} : ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού (log CFU/g),
- y_o : ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού,
- m : η παράμετρος καμπυλότητας για την μετάβαση από την εκθετική φάση στην στατική φάση της καμπύλης ανάπτυξης,
- h₀ : παράμετρος που χαρακτηρίζει το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον.

2.9 Στατιστική ανάλυση - Κατασκευή μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης ανάπτυξης μικροοργανισμών

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων με τις μεθόδους MSI και FTIR, συσχετίστηκαν με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα για την εύρεση μοντέλων πρόβλεψης της ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στα φιλέτα τσιπούρας και λαυρακιού. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square- Regression, PLS-R) η οποία συσχετίζει δύο σύνολα δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (εξαρτημένες μεταβλητές) γραμμικώς, βρίσκοντας ένα νέο σύνολο - χώρο ανεξαρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X-scores), με ορθογώνια διάταξη, και ορίζει έναν αριθμό κύριων συνιστωσών (Latent Variables, LVs) για το νέο αυτό χώρο (Panagou et al., 2014, Romia και Bernardez, 2009). Το λογισμικό PLS-R δίνει τη δυνατότητα εκπαίδευσης του μοντέλου και πρόβλεψης της σημαντικότητας κάθε παράγοντα, τη διασταυρούμενη επικύρωση (Cross Validation, CV), η οποία απαλλάσει από τις πολυάριθμες και συσχετιζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές που συνεπάγουν το overfitting (υπερμοντελοποίηση). Με τη διασταυρούμενη επικύρωση γίνεται διάκριση των δεδομένων σε ομάδες, από τις οποίες μετά από διαδοχική χρήση δημιουργούνται μοντέλα με τα δεδομένα που απομένουν. Αφού δημιουργηθεί ένα μοντέλο, καταμετρώνται οι διαφορές μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της μεταβλητής Υ και υπολογίζεται το άθροισμα των τετραγώνων αυτών των διαφορών, το οποίο δίνει μία εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου. Η επικύρωση κάθε μοντέλου πριν τη χρήση του για την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού είναι αναγκαία και θα πρέπει να γίνεται με ανεξάρτητα, αντιπροσωπευτικά δείγματα, εφόσον υπάρχουν. Ειδάλλως, υπάρχει η δυνατότητα επανεκτίμησης του μοντέλου μετά από τυχαιοποίηση των δεδομένων (Wold et al., 2001).

Το μοντέλο που εξάγεται εφαρμόζοντας την PLS-R, μπορεί να περιγραφεί από μία εξίσωση που έχει τη μορφή:

$$Y = B_o + B_1 X_1 + B_2 X_2 + \dots + B_i X_i + \epsilon_j$$

όπου,

B₁, B₂,, B_i : οι συντελεστές παλινδρόμησης οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους και εκφράζουν την αναμενόμενη μεταβολή της μεταβλητής Yi, όταν η Xi μεταβληθεί κατά μία μονάδα και οι υπόλοιπες μεταβλητές X παραμένουν σταθερές,

 B_{o} : ο σταθερός όρος (τιμή του Y για X=0),

ε_j : το σφάλμα που αντιστοιχεί στη διαφορά της τιμής που προβλέπεται από την ευθεία παλινδρόμησης για το δείγμα i και της πραγματικής τιμής που έχει το συγκεκριμένο δείγμα.

Οι παράγοντες συσχέτισης r (δειγματικός συντελεστής γραμμικής συσχέτισης, correlation coefficient, του Pearson) και το RMSE (Root Mean Square Error) υπολογίζονται αυτόματα κατά την εφαρμογή του λογισμικού. Το r εκφράζει τον βαθμό συσχέτισης των μεβλητών X και Y. Όταν r = ±1, η σχέση μεταξύ των ανεξάρτητων και των εξαρτημένων μεταβλητών είναι αιτιοκρατική και όχι πιθανοκρατική, καθώς γνωρίζοντας την τιμή της μίας μεταβλητής γνωρίζουμε και την τιμή της άλλης. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης συνδέεται άμεσα με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) αφού r= $\sqrt{R^2}$.

Ο συντελεστής προσδιορισμού (coefficient of determination, R²) αποτελεί δείκτη του πόσο μακριά ή κοντά βρίσκονται τα σημεία πάνω στην ευθεία ελαχίστων τετραγώνων και παίρνει τιμές από 0 έως 1. Όταν R² = 1 όλα τα σημεία βρίσκονται πάνω στην ευθεία και το μοντέλο είναι πλήρως γραμμικό, δηλαδή υπάρχει πλήρης γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών X και Y. Όσο πλησιέστερα βρίσκεται προς τη μονάδα τόσο καλύτερη είναι η ευθεία ελαχίστων τετραγώνων ας εκτίμηση της ευθείας παλινδρόμησης και τόσο περισσότερο γραμμικό είναι το μοντέλο. Όταν παρουσιάζεται στα αποτελέσματα βαθμονόμησης εκφράζει την ποιότητα προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο, ενώ όταν παρουσιάζεται στα αποτελέσματα της διασταυρούμενης επικύρωσης (R²_c), της διασταυρούμενης επικύρωσης (R²_{cν}) και της πρόβλεψης (R²_p) αποτελούν σημαντικούς στατιστικούς δείκτες αξιολόγησης (Fengou et al. 2018). Επιπλέον, θεωρείται πως ένα ικανοποιητικό μοντέλο θα πρέπει να διαθέτει υψηλή τιμή R², με το εύρος των τιμών μεταξύ του 0.66 και 0.81 να είναι αποδεκτό, ενώ οι τιμές από 0.82 και 0.90 και πάνω

Η απόκλιση της μέσης τετραγωνικής ρίζας (Root Mean Square Error, RMSE) εκφράζει την μέση απόκλιση ή σφάλμα μεταξύ προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η τιμή του τόσο ελαχιστοποιούνται οι διαφορές και το μοντέλο παρουσιάζει καλύτερη προβλεψιμότητα.

Η μέθοδος PLS-R επιλέχθηκε, διότι επιτρέπει την ανάλυση δεδομένων με πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές X και με πολύ "θόρυβο". Αντίθετα με άλλες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης, με την PLS-R διατηρείται η ασυμμετρία μεταξύ των προβλεπόμενων και των εξαρτημένων μεταβλητών (Abdi, H., 2003).

Η εφαρμογή της PLS-R πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος χημειομετρίας The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software As, Oslo, Norway) και κατασκευάστηκαν μοντέλα για την ανάπτυξη της OMX στα φιλέτα τσιπούρας και λαβρακιού, με διαφορετική προεπεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων, όπως αυτά προκύπτουν από την εφαρμογή των μεθόδων MSI και FTIR. Για το σκοπό αυτό, τα δεδομένα από το VideometerLab και το FTIR ορίστηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές X (input) ξεχωριστά, ενώ τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα της OMX ορίστηκαν ως εξαρτημένη μεταβλητή Y (output).

Η εφαρμογή της Ανάλυσης Διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA) για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Statgraphics.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

Τα φιλέτα τσιπούρας και λαβρακιού συσκευάστηκαν σε αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασίες 0, 4, 8 και 12 °C. Οι καμπύλες αύξησης της μικροχλωρίδας παριστάνονται με τη χρήση του μέσου όρου των δύο δειγμάτων κάθε ανάλυσης που εκφράστηκαν σε log colony forming units per gram (log CFU/g) και παρουσιάζονται στα σχήματα 3.1-3.4. Οι ομάδες μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στα δείγματα ήταν οι εξής: *Pseudomonas* spp., βακτήρια που παράγουν H₂S (*Shewanella* spp.), Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια (LAB) και ζύμες.

Κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ήταν ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp.. Επίσης, τα βακτήρια *Shewanella* spp. απαριθμήθηκαν σε υψηλούς πληθυσμούς και στις δύο συσκευασίες.

Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός των ψαριών ήταν κοντά στα 5 log CFU/g. Ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. κυμαίνονταν πολύ κοντά στην ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX) στα δείγματα τσιπούρας (5.06 και 4.37 log CFU/g για τη συσκευασία σε αέρα και MAP αντίστοιχα) και στα δείγματα λαβρακιού (4.68 και 5.09 log CFU/g για τη συσκευασία σε αέρα και MAP αντίστοιχα). Παρατηρώντας τα σχήματα 3.1-3.4 βλέπουμε ότι ο αρχικός πληθυσμός των *Shewanella* spp. εμφανίζεται κατά 1.3-1.7 λογαριθμικούς κύκλους χαμηλότερος από τον αρχικο πληθυσμό των *Pseudomonas* spp.. Επίσης, στην αρχική μικροχλωρίδα παρατηρήθηκε η παρουσία των ζυμών (στην τσιπούρα 4.05 και 2.5 log CFU/g και στο λαβράκι 3.34 και 3.65 log CFU/g σε αέρα και MAP αντίστοιχα), ενώ η παρουσία του *B. thermosphacta* ήταν πολύ μικρή (στην τσιπούρα 2.30 και 2.0 log CFU/g και στο λαβράκι 2.50 και 2.72 log CFU/g σε αέρα και MAP αντίστοιχα). Ο αρχικός πληθυσμός των Enterobacteriaceae ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο των γαλακτικών βακτηρίων, (2.5 και 3.4 log CFU/g για την τσιπούρα και το λαβράκι αντίστοιχα και στις δύο συσκευασίες), με εξαίρεση τον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων στο λαβρακι της συσκευασίας σε αέρα, που ήταν 2.77 log CFU/g.

Στα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού σε αέρα, κυριάρχησαν οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp. οι οποίοι εμφάνισαν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, όπως φαίνεται και στους πίνακες 3.1 και 3.3. Επιπλέον, τα Enterobacteriaceae κυριάρχησαν έναντι των ζυμών, των *B. thermosphacta* και των γαλακτικών βακτηρίων, ειδικότερα στις θερμοκρασίες των 8 και 12 °C. Στις θερμοκρασίες των 0, 4 και 8 °C στη συσκευασία MAP παρουσιάστηκε επιβράδυνση της μικροβιακής ανάπτυξης συγκριτικά με την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην αντίστοιχη συσκευασία σε αέρα, ενώ στους 12 °C η συσκευασία MAP δεν φαίνεται να είχε το ίδιο αποτέλεσμα, καθώς σημειώθηκε παρόμοια ανάπτυξη της OMX στις δύο συνθήκες.

Στις συσκευασίες MAP στις θερμοκρασίες συντήρησης 0, 4 και 8 °C παρατηρήθηκε επιβράδυνση της ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp., των Enterobacteriaceae, των βακτηρίων που παράγουν H_2 S και των *B. thermosphacta* σε σχέση με τους αντίστοιχους

πληθυσμούς στις συσκευασίες σε αέρα. Επιπλέον, στις τροποποιημένες ατμόσφαιρες ευνοήθηκαν σε μικρό βαθμό τα γαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες συγκριτικά με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες στις συσκευασίες σε αέρα, αν και ο πληθυσμός τους παρέμεινε γενικά σε χαμηλά επίπεδα.

Στους 0 °C στις συσκευασίες MAP, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ξεπέρασε τους 7 log CFU/g στις 401 και 305 ώρες, στην τσιπούρα και στο λαβράκι αντίστοιχα. Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων (Παράρτημα ΙΙΙ) έδειξε ότι τα δείγματα αυτά απορρίφθηκαν (βαθμολογίες ≥ 3 σε κλίμακα 0-5), στις 281 και 377 ώρες αντίστοιχα. Επίσης, στη συσκευασία σε αέρα στην ίδια θερμοκρασία, η ΟΜΧ έφτασε τους 7 log CFU/g στις 144 και 119 ώρες, ενώ η οργανοληπτική απόρριψη σημειώθηκε στις 258 και 215 ώρες, για την τσιπούρα και το λαβράκι αντίστοιχα. Συνεπώς, στη συσκευασία ΜΑΡ στους 0 °C, ο χρόνος διάρκειας ζωής του προϊόντος αυξήθηκε κατά 153 περίπου ώρες. Επιπρόσθετα, στη συσκευασία ΜΑΡ στους 4 και 8 °C, ο χρόνος διάρκειας ζωής αυξήθηκε αντίστοιχα κατά 120 και 33 περίπου ώρες. Αντίθετα, στους 12 °C ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ξεπέρασε τους 7 log CFU/g στις 54 ώρες, στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, με διαφορά 30 ωρών από την αντίστοιχη συσκευασία σε αέρα. Η οργανοληπτική απόρριψη των συσκευασιών ΜΑΡ στη θερμοκρασία των 12 °C, σημειώθηκε στις 71 και 95 ώρες, με διαφορά 5 και 37 ωρών από τις αντίστοιχες συσκευασίες σε αέρα, στην τσιπούρα και στο λαβράκι αντίστοιχα. Συνεπώς, παρατηρείται ότι στους 12 °C η συσκευασία ΜΑΡ δεν επηρέασε σημαντικά τη διάρκεια ζωής των δειγμάτων συγκριτικά με την αντίστοιχη συσκευασία σε αέρα.

Μετά από στατιστική ανάλυση, με την εφαρμογή Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Διακύμανσης (Multivariate Analysis of Variance) αποδείχθηκε ότι ο τύπος συσκευασίας, η θερμοκρασία και ο χρόνος συντήρησης είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στη μικροβιακή χλωρίδα, με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (Παράρτημα Ι).





Σχήμα 3.2 Καμπύλες μικροβιακής ανάπτυξης σε φιλέτα τσιπούρας στους 0, 4, 8 και 12 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας, για την OMX (-+), *Pseudomonas* spp. ($-\Box$), βακτήρια που παράγουν H₂S ($-\Delta$), Enterobacteriaceae (-x), *B. thermosphacta* (-*), LAB ($-\circ$) και ζύμες ($-\diamond$).





Σχήμα 3.4 Καμπύλες μικροβιακής ανάπτυξης σε φιλέτα λαβρακιού στους 0, 4, 8 και 12 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας, για την OMX (-+), *Pseudomonas* spp. ($-\Box$), βακτήρια που παράγουν H₂S ($-\Delta$), Enterobacteriaceae (-x), *B. thermosphacta* (-*), LAB ($-\circ$) και ζύμες ($-\diamond$).

3.2 Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής αύξησης

Τα πειραματικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν H₂S (*Shewanella* spp.), των Enterobacteriaceae, των *B. thermosphacta*, των LAB και των ζυμών προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi και Roberts (1994) και υπολογίστηκαν οι κινητικές τους παράμετροι. Στους πίνακες 3.1-3.4 παρουσιάζεται ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (maximum specific growth rate, μ_{max}), η φάση προσαρμογής (lag phase duration, λ), ο αρχικός πληθυσμός (y_o), ο τελικός πληθυσμός (y_{end}), η τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE, se(fit)) και ο συντελεστής συσχέτισης (R²) για τα δύο δείγματα κάθε πειράματος. Επιπλέον, στα σχήματα 3.5-3.6 παρουσιαζεται ενδεικτικά η γραφική απεικόνιση ορισμένων δεδομένων.

Παρατηρώντας τους πίνακες 3.1-3.4 συμπεραίνουμε ότι, σε όλες τις περιπτώσεις, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης παρουσίασε προοδευτική αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης, ενώ μεταξύ των δύο διαφορετικών συσκευασιών, χαμηλότερο ειδικό ρυθμό αύξησης εμφάνισαν οι μικροοργανισμοί στις συσκευασίες MAP. Η φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών ήταν αυξημένη στις συσκευασίες MAP που συντηρήθηκαν στους 0 °C συγκριτικά με τις συσκευασίες σε αέρα. Από τις τιμές του μ_{max} και του λ συμπεραίνουμε ότι παρουσιάστηκε μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης, σε όλους τους μικροοργανισμούς, κατά τη συντήρηση στους 0 °C και η παρεμπόδιση μειώθηκε αυξανομένης της θερμοκρασίας. Επιπλέον, στις συσκευασίες MAP παρουσιάστηκε μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών συγκριτικά με τις συσκευασίες Ο °C και η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Έπιπλέον, στις συσκευασίες MAP παρουσιάστηκε μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών συγκριτικά με τις συσκευασίες σι αέρα που αποθηκεύτηκαν στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας. Τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα. Το τυπικό σφάλμα προσαρμογής se(fit) ήταν μικρότερο του 1 και ο συντελεστής προσδιοριμού R² ήταν κοντά στο 1 στις περισσότερες περιπτώσεις.

Στις συσκευασίες σε αέρα, τα *Pseudomonas* spp. είχαν υψηλό ρυθμό αύξησης (0.044, 0.047, 0.067, 0.085 hours⁻¹ για την τσιπούρα και 0.020, 0.041, 0.066, 0.099 hours⁻¹ για το λαβράκι στους 0, 4, 8 και 12 °C αντίστοιχα), όμως στις υψηλότερες θερμοκρασίες ο μ_{max} των *Shewanella* spp. παρουσίασε μεγαλύτερη αύξηση (0.018, 0.056, 0.113, 0.129 hours⁻¹ για την τσιπούρα και 0.019, 0.041, 0.086, 0.120 hours⁻¹ για το λαβράκι, στους 0, 4, 8 και 12 °C αντίστοιχα). Στις συσκευασίες MAP, στις θερμοκρασίες των 8 και 12 °C, ευνοήθηκε η ανάπτυξη των Enterobacteriaceae (0.034, 0.067 hours⁻¹ για την τσιπούρα και 0.032, 0.057 hours⁻¹ για το λαβράκι) και των *Shewanella* spp. (0.034, 0.063 hours⁻¹ για την τσιπούρα και 0.032, 0.057 hours⁻¹ για το λαβράκι) και των *Shewanella* spp. (0.034, 0.063 hours⁻¹ για την τσιπούρα και 0.032, 0.057 hours⁻¹ για το λαβράκι) συγκριτικά με τους άλλους μικροοργανισμούς. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική παρεμπόδιση της ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp. στους 0 και 4 °C (0.009, 0.012 hours⁻¹ για την τσιπούρα και 0.007, 0.009 hours⁻¹ για το λαβράκι) στις συσκευασίες MAP, συγκριτικά με τις συσκευασίες σε αέρα (0.044, 0.047 hours⁻¹ για την τσιπούρα και 0.020, 0.041 hours⁻¹ για το λαβράκι).

Εφαρμόζοντας την Ανάλυση Διακύμανσης μίας μεταβλητής (One Way Analysis of Variance), στον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (rate), βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον μέσο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης μεταξύ των δειγμάτων, με επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζονται τα δείγματα που έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά, με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Τα δείγματα που περιέχουν Χ στο ίδιο επίπεδο σχηματίζουν μία ομάδα μεταξύ των οποίων δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Συνολικά σχηματίστηκαν 35 διαφορετικές ομάδες.

Οι χαμηλότεροι μέσοι ειδικοί ρυθμοί αύξησης, από 0.004 έως 0.027 h⁻¹, παρατηρήθηκαν στις συσκευασίες MAP στους 0 και 4 °C, για όλους τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, ενώ στους 8 °C οι μικροοργανισμοί *Shewanella* spp. και Enterobacteriaceae είχαν ταχύτερη ανάπτυξη, με ρυθμούς αύξησης από 0.032 έως 0.035 h⁻¹. Επίσης, στις ίδιες τιμές (0.004-0.027 h⁻¹) κυμαίνονταν οι ρυθμοί αύξησης στις συσκευασίες σε αέρα στη θερμοκρασία των 0 °C, για όλους τους μικροοργανισμούς, με εξαίρεση την OMX και τα *Pseudomonas* spp. στην τσιπούρα, που αναπτύχθηκαν ταχύτερα, με ρυθμούς αύξησης 0.031 και 0.044 h⁻¹ αντίστοιχα. Στις συσκευασίες σε αέρα που συντηρήθηκαν στους 4 °C, η OMX, τα *Pseudomonas* spp. και τα *Shewanella* spp. είχαν ρυθμούς αύξησης από 0.041 έως 0.056 h⁻¹, ενώ με πιο αργούς ρυθμούς αναπτύχθηκαν τα Enterobacteriaceae (0.029-0.033 h⁻¹) καθώς και τα *B. thermosphacta* και τα LAB (0.012-0.031 h⁻¹). Στις ίδιες συσκευασίες, στη θερμοκρασία των 8 °C, τα *Shewanella* spp. αναπτύχθηκαν γρήγορα, με ρυθμούς αύξησης 0.086 και 0.113 h⁻¹ για το λαβράκι και την τσιπούρα αντίστοιχα, ενώ πιο αργοί ήταν οι ρυθμοί ανάπτυξης της OMX, των *Pseudomonas* spp. και των Enterobacteriaceae (0.050-0.068 h⁻¹), των *B. thermosphacta* (0.036-0.050 h⁻¹) και των LAB (0.024-0.031 h⁻¹).

Οι συσκευασίες MAP είχαν ταχύτερη μικροβιακή ανάπτυξη στους 12 °C, με ρυθμούς αύξησης από 0.047 έως 0.067 h⁻¹ για την OMX, τα *Pseudomonas* spp., τα *Shewanella* spp. και τα Enterobacteriaceae, ενώ για τα *B. thermosphacta* και τα LAB, το μmax ήταν από 0.041 έως 0.047 h⁻¹. Στις συσκευασίες σε αέρα που συντηρήθηκαν στους 12 °C, η ταχύτερη μικροβιακή ανάπτυξη παρατηρήθηκε στα *Shewanella* spp., με μ_{max} από 0.120 έως 0.129 h⁻¹. Επίσης, υψηλούς ρυθμούς αύξησης είχαν η OMX με τα *Pseudomonas* spp. (0.085-0.103 h⁻¹) και τα Enterobacteriaceae (0.079-0.084 h⁻¹), ενώ τα *B. thermosphacta* και τα LAB αναπτύχθηκαν πιο αργά (0.022-0.031 h⁻¹).

Πίνακας 3.1 Κινητικές παράμετροι της μικροβιακής χλωρίδας στις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας που συσκευάστηκαν σε αέρα. Παρουσιάζονται και τα δύο δείγματα του πειράματος.

T (°C)	Microorganisms	rate (hours ⁻¹)	lag (hours ⁻¹)	y0 (log CFU/g)	yEnd (log CFU/g)	se(fit)	R^2
0	TVC	0.033	71.932	4.934	9.887	0.336	0.972
		0.029	76.017	5.280	9.526	0.361	0.957
	Pseudomonas spp.	0.038	91.737	5.103	9.825	0.479	0.944
		0.049	119.460	5.550	9.403	0.428	0.941
	Shewanella spp.	0.018	-	2.958	6.540	0.529	0.841
		0.018	-	2.743	6.624	0.630	0.811
	Enterobacteriaceae	0.010	-	2.267	-	0.306	0.926
		0.009	-	2.444	-	0.421	0.821
	B. thermosphacta	0.014	-	2.083	-	1.413	0.526
		0.014	-	2.263	-	0.964	0.806
	LAB	0.005	-	2.557	-	0.389	0.710
		0.006	-	2.544	-	0.556	0.584
	Yeasts	0.009	-	3.117	-	0.827	0.579
4	TVC	0.048	21.352	5.078	9.556	0.219	0.984
		0.060	26.884	4.710	9.386	0.242	0.984
	Pseudomonas spp.	0.040	-	4.729	9.633	0.321	0.964
		0.055	26.727	4.942	9.273	0.308	0.968
	Shewanella spp.	0.042	-	2.877	7.826	0.644	0.871
		0.069	42.677	3.960	7.544	0.344	0.953
	Enterobacteriaceae	0.029	-	2.292	-	0.502	0.912
		0.028	-	2.452	-	0.440	0.923
	B. thermosphacta	0.020	-	2.174	-	0.727	0.789
		0.022	-	1.639	-	0.505	0.930
	LAB	0.012	-	2.544	-	0.055	0.996
		0.010	-	2.688	-	0.605	0.560
8	TVC	0.062	-	4.812	9.553	0.288	0.971
		0.063	-	4.735	9.565	0.406	0.946
	Pseudomonas spp.	0.059	-	4.929	9.594	0.246	0.978
		0.074	16.365	5.267	9.524	0.315	0.966
	Shewanella spp.	0.106	32.105	3.894	8.025	0.384	0.957
		0.120	39.639	3.818	7.931	0.241	0.984
	Enterobacteriaceae	0.052	-	2.471	-	0.402	0.956
		0.047	-	2.805	-	0.453	0.942
	B. thermosphacta	0.033	-	3.019	-	0.659	0.750
		0.039	-	2.720	-	0.786	0.750
	LAB	0.024	-	2.628	-	0.321	0.872
		0.025	-	2.493	-	0.277	0.912
12	TVC	0.092	-	4.664	9.484	0.298	0.969
		0.082	-	4.882	9.400	0.289	0.967
	Pseudomonas spp.	0.088	-	4.826	9.521	0.317	0.965
		0.082	-	5.043	9.468	0.208	0.983
	Shewanella spp.	0.121	22.411	3.891	7.907	0.240	0.980
		0.136	21.239	3.699	7.761	0.450	0.935
	Enterobacteriaceae	0.082	-	2.383	8.222	0.438	0.957
		0.075	-	2.632	8.425	0.358	0.969
	B. thermosphacta	0.072	-	2.025	-	0.579	0.778
		0.086	-	2.195	-	0.338	0.939
	LAB	0.234	17.828	2.462	4.449	0.087	0.992
		0.039	-	2.558	-	0.402	0.673
	Yeasts	0.031	-	3.225	-	0.354	0.627

Πίνακας 3.2 Κινητικές παράμετροι της μικροβιακής χλωρίδας στις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας που συσκευάστηκαν σε ΜΑΡ. Παρουσιάζονται και τα δύο δείγματα του πειράματος.

O TVC 0.012 207.789 4.777 - 0.347 0.007 - 4.090 - 0.500 Pseudomonas spp. 0.010 255.422 4.955 8.077 0.275	0.923 0.842
0.007 - 4.090 - 0.500 Pseudomonas spp. 0.010 255.422 4.955 8.077 0.275	0.842
Pseudomonas spp. 0.010 255.422 4.955 8.077 0.275	0.012
	0.937
0.007 126.276 4.522 - 0.179	0.978
Shewanella spp 0.015 244 673 3 583 - 0.471	0.895
0.013 218.398 3.360 - 0.323	0.943
Enterobacteriaceae 0.015 313 594 3.175 - 0.281	0.922
	0.879
B. thermosphacta 0.020 287.842 1.998 7.479 0.003	1.000
0.011 166.897 1.891 - 0.195	0.987
IAB 0.006 - 2.205 - 0.320	0.933
0.006 - 2.380 - 0.304	0.933
Yeasts 0.003 - 3.110 - 0.404	0.732
0.005 - 2.572 - 0.380	0.865
4 TVC 0.011 - 4.460 - 0.544	0.898
	0.950
Pseudomonas spn 0 010 - 4 429 - 0 377	0.936
	0.944
Shewanella spp 0.020 - 2.822 8.592 0.554	0.929
0.020 - 2.912 8.727 0.630	0.917
Enterobacteriaceae 0.011 - 2.808 - 0.357	0.953
	0.555
B thermosphacta 0.017 - 1.927 6.791 0.149	0.994
	0.893
	0.000
	0.928
Yeasts 0.003 - 3.110 - 0.404	0.320
	0.865
8 TVC 0.024 - 4.401 8.926 0.392	0.944
0.024 - 4.278 9.055 0.438	0.937
Pseudomonas spp. 0.016 - 4.962 - 0.467	0.910
0.018 - 4.698 - 0.543	0.898
Shewanella spp. 0.030 - 3.557 8.825 0.457	0.945
0.038 - 3.176 8.620 0.634	0.903
Enterobacteriaceae 0.033 - 2.512 8.198 0.316	0.977
0.035 - 2.453 8.339 0.482	0.951
B. thermosphacta 0.017 - 2.618 - 1.034	0.777
0.017 - 2.463 - 1.258	0.689
LAB 0.035 - 2.255 7.191 0.022	1.000
0.019 - 2.503 - 0.782	0.889
Yeasts 0.020 - 2.514 - 0.539	0.955
0.020 - 2.533 - 0.845	0.918
12 TVC 0.052 - 4.095 9.752 0.538	0.934
0.046 - 4.213 9.695 0.437	0.952
Pseudomonas spp. 0.050 - 4.231 9.489 0.502	0.934
0.044 - 4.291 9.605 0.457	0.944
Shewanella spp. 0.063 - 2.825 8.317 0.542	0.931
0.062 - 2.985 8.567 0.703	0.891
Enterobacteriaceae 0.070 - 2.572 9.013 0.372	0.975
0.064 - 2.589 9.141 0.460	0.963
B. thermosphacta 0.022 - 2.895 - 1.211	0.574
0.021 - 2.949 - 1.262	0.521
Yeasts 0.031 - 2.958 - 1.124	0.773

Πίνακας 3.3 Κινητικές παράμετροι της μικροβιακής χλωρίδας στις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης των φιλέτων λαβρακιού που συσκευάστηκαν σε αέρα. Παρουσιάζονται και τα δύο δείγματα του πειράματος.

т (°С)	Microorganisms	rate (hours ⁻¹)	lag (hours ⁻¹)	y0 (log CFU/g)	yEnd (log CFU/g)	se(fit)	R^2
0	TVC	0.023	-	4.810	10.045	0.337	0.965
-		0.025	-	4.293	9.551	0.482	0.936
	Pseudomonas spp.	0.019	-	5.071	-	0.566	0.901
		0.020	-	4.542	-	0.687	0.877
	Shewanella spp.	0.019	-	3.863	-	0.590	0.905
		0.019	-	3.551	-	0.680	0.864
	Enterobacteriaceae	0.011	-	3.153	-	0.420	0.848
		0.010	-	2.868	-	0.411	0.862
	B. thermosphacta	0.017	-	2.469	-	0.520	0.931
		0.020	-	2.165	-	1.175	0.676
	LAB	0.007	-	2.941	-	0.233	0.922
		0.006	-	2.433	-	0.468	0.642
	Yeasts	0.017	-	2.649	-	0.821	0.833
		0.021	-	2.180	-	1.423	0.720
4	TVC	0.046	22,587	5.142	-	0.317	0.969
-		0.038	-	4.542	-	0.530	0.909
	Pseudomonas spp	0.042	-	4 554	-	0.516	0.926
	i seaacinenas sppi	0.040	-	4.314	-	0.503	0.926
	Shewanella spp.	0.045	-	3,295	-	0.252	0.986
	onen anen a opp.	0.038	-	3,183	-	0.535	0.908
	Enterobacteriaceae	0.039	46,541	3.637	-	0.264	0.959
	Enterobacteriaceae	0.027	-	2,769	-	0.495	0.858
	B. thermosphacta	0.028	-	2.776	-	0.435	0.919
	Di thermoophaota	0.035	-	2 088	-	0.625	0.897
	LAB	0.011	-	3.008	-	0.141	0.942
	E I B	0.019	-	2.381	-	0.163	0.976
	Yeasts	0.014	-	3.258	-	0.586	0.561
	. 60010	0.019	32,823	3,150	-	0.072	0.993
8	TVC	0.068	-	4.794	10.019	0.416	0.951
_		0.069	-	4.436	9.511	0.257	0.981
	Pseudomonas spp.	0.059	-	4.940	-	0.536	0.920
		0.074	-	4.251	9.131	0.137	0.994
	Shewanella spp.	0.085	-	2.810	7.932	0.436	0.954
		0.087	-	2.738	7.604	0.212	0.987
	Enterobacteriaceae	0.050	-	3.119	-	0.427	0.929
		0.055	-	2.947	-	0.195	0.987
	B. thermosphacta	0.047	-	2.825	-	0.605	0.842
		0.054	-	2.183	-	0.191	0.987
	LAB	0.027	-	2.771	-	0.307	0.873
		0.035	-	2.298	-	0.312	0.920
	Yeasts	0.023	-	3.287	-	0.280	0.861
		0.022	-	2.984	-	0.277	0.856
12	TVC	0.104	-	4.665	9.725	0.324	0.972
		0.101	-	4.222	9.722	0.494	0.947
	Pseudomonas spp.	0.104	-	4.441	9.722	0.391	0.963
		0.095	-	4.247	9.714	0.402	0.963
	Shewanella spp.	0.129	-	2.803	7.864	0.332	0.971
		0.111	-	3.081	7.913	0.400	0.954
	Enterobacteriaceae	0.086	-	3.027	8.559	0.621	0.915
		0.082	-	2.868	8.674	0.362	0.971
	B. thermosphacta	0.081	-	2.133	-	0.494	0.891
		0.085	-	2.116	-	0.361	0.945
	LAB	0.038	-	2.729	-	0.237	0.886
		0.045	-	2.379	-	0.356	0.828
	Yeasts	0.037	-	3.142	-	0.274	0.848
		0.038	-	2.947	-	0.263	0.863

Πίνακας 3.4 Κινητικές παράμετροι της μικροβιακής χλωρίδας στις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης των φιλέτων λαβρακιού που συσκευάστηκαν σε ΜΑΡ. Παρουσιάζονται και τα δύο δείγματα του πειράματος.

T (°C)	Microorganisms	rate	lag	y0	yEnd	se(fit)	R^2
		(hours-1)	(hours-1)	(log CFU/g)	(log CFU/g)	0.074	0 700
0	IVC	0.009	269.725	6.092	-	0.374	0.798
	a <i>i</i>	0.006	-	5.148	-	0.464	0.798
	Pseudomonas spp.	0.009	231.673	5.887	-	0.412	0.812
		0.005	-	5.339	-	0.409	0.773
	Shewanella spp.	0.006	-	4.513	-	0.513	0.768
		0.007	-	4.341	-	0.536	0.814
	Enterobacteriaceae	0.012	232.779	4.014	-	0.436	0.872
		0.012	232.779	4.014	-	0.436	0.872
	B. thermosphacta	0.007	-	2.858	-	0.613	0.857
		0.010	-	2.267	-	0.101	0.998
	LAB	0.006	-	3.282	-	0.313	0.932
		0.006	-	3.376	-	0.108	0.992
	Yeasts	0.004	-	3.830	-	0.732	0.567
		0.006	-	3.237	-	0.318	0.943
4	TVC	0.011	-	5.329	-	0.401	0.900
		0.011	-	5.098	-	0.502	0.867
	Pseudomonas spp.	0.009	-	5.383	-	0.430	0.847
		0.010	-	5.093	-	0.404	0.896
	Shewanella spp.	0.022	-	3.961	8.263	0.720	0.825
		0.025	-	3.708	7.685	0.456	0.906
	Enterobacteriaceae	0.023	-	3.353	6.489	0.408	0.892
		0.018	-	3.466	6.579	0.468	0.851
	B. thermosphacta	0.014	-	3.922	-	1.249	0.649
		0.016	-	2.782	-	0.850	0.859
	LAB	0.013	-	3.872	-	0.697	0.853
		0.014	-	3.523	-	0.348	0.969
	Yeasts	0.007	-	4.352	-	0.467	0.782
		0.008	-	3.735	-	0.837	0.537
8	TVC	0.019	-	5.689	9.199	0.310	0.942
		0.029	-	5.059	9.163	0.668	0.824
	Pseudomonas spp.	0.013	-	6.051	-	0.442	0.874
		0.028	-	4.940	8.788	0.562	0.852
	Shewanella spp.	0.032	-	4.309	8.203	0.456	0.902
		0.038	-	3.700	8.398	0.526	0.905
	Enterobacteriaceae	0.033	-	3.865	8.390	0.620	0.869
		0.032	-	3.827	8.650	0.615	0.886
	B. thermosphacta	0.018	-	3.687	-	0.954	0.825
		0.020	-	2.628	-	0.660	0.932
	LAB	0.012	-	4.277	-	1.048	0.600
	Yeasts	0.014	-	4.010	-	0.242	0.979
		0.016	-	3.455	-	0.360	0.966
12	TVC	0.057	35.917	5.880	8.975	0.410	0.912
		0.047	-	4.923	9.176	0.372	0.945
	Pseudomonas spp.	0.056	32.434	5.772	8.737	0.328	0.937
		0.041	-	5.125	9.014	0.384	0.930
	Shewanella spp.	0.048	-	4.108	8.189	0.522	0.894
		0.048	-	4.047	8.416	0.456	0.923
	Enterobacteriaceae	0.054	-	3.923	8.624	0.434	0.939
		0.061	-	3.524	8.761	0.381	0.961
	B. thermosphacta	0.030	-	3.382	_	0.397	0.965
		0.032	-	2.838	-	0.839	0.871
	LAB	0.024	-	3,989	-	0.717	0.842
		0.022	-	4,145	-	0.936	0.696
L							



Σχήμα 3.5 Καμπύλες προσαρμογής της μικροβιακής ανάπτυξης σε φιλέτα τσιπούρας για την ολική μικροβιακή χλωρίδα στους 0 °C (πάνω) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp. στους 4 °C (κάτω), σε αερόβιες συνθήκες (αριστερά) και σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (δεξιά), με τη βοήθεια των μοντέλων Barranyi et al. (1993).



Σχήμα 3.6 Καμπύλες προσαρμογής της μικροβιακής ανάπτυξης σε φιλέτα λαβρακιού για τους μικροοργανισμούς *Shewanella* spp. σε θερμοκρασία 8 °C (πάνω) και Enterobacteriaceae σε θερμοκρασία 12 °C (κάτω) σε αερόβιες συνθήκες (αριστερά) και σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (δεξιά), με τη βοήθεια των μοντέλων Barranyi et al. (1993).

3.3 Οργανοληπτικός έλεγχος

Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου παρουσιάζονται στο Παράρτημα ΙΙΙ. Τα φιλέτα αξιολογήθηκαν με βάση την οσμή και το χρώμα τους με βαθμολογίες από 0 για το φρέσκο έως 5 για το αλλοιωμένο. Στην κλίμακα βαθμολόγησης από 0 έως 5, ορίστηκε ως σημείο αλλοίωσης το κατώφλι του βαθμού 3, το οποίο συνοδεύεται με πληθυσμό ολικής μικροβιακής χλωρίδας μεγαλύτερο από 7 log CFU/g.

Τα δείγματα είχαν χαμηλότερες βαθμολογίες όσο η θερμοκρασία συντήρησης ήταν μικρότερη, με καλύτερη θερμοκρασία συντήρησης τους 0 °C. Με την αύξηση του χρόνου συντήρησης η αλλοίωση εμφανίστηκε πιο σύντομα στα φιλέτα που συσκευάστηκαν σε αέρα σε σχέση με τα φιλέτα που συσκευάστηκαν σε MAP. Η θετική επίδραση της συσκευασίας MAP παρουσιάστηκε κυρίως στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης των 0 και 4 °C, ενώ στις υψηλότερες θερμοκρασίες των 8 και 12°C δεν παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά στην οργανοληπτική αξιολόγηση μεταξύ των δύο συσκευασιών, όπως αναλύεται στην Ενότητα 3.1.

3.4 Αποτελέσματα μέτρησης pH

Οι μεταβολές των τιμών του pH κατά τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης, στα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού στις συσκευασίες σε αέρα και MAP για όλες τις θερμοκρασίες, παρουσιάζονται στα διαγράμματα του σχήματος 3.7.

Για τα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού που συσκευάστηκαν σε αέρα η αρχική τιμή pH ήταν 6.17 και 6.44 αντίστοιχα, ενώ η τελική τιμή ήταν 6.58, 6.65, 6.48, 6.60 και 6.72, 6.75, 6.40, 6.53 στους 0, 4, 8 και 12 °C αντίστοιχα. Επίσης, στα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού που συσκευάστηκαν σε MAP η αρχική τιμή pH ήταν 6.64 και 6.68 αντίστοιχα, ενώ η τελική τιμή ήταν 6.10, 6.44, 6.43, 6.65 και 6.68, 6.23, 6.32, 6.40, 6.40 στους 0, 4, 8 και 12 °C αντίστοιχα.

Οι τιμές του pH κυμαίνονταν από 6 έως 7, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συσκευασιών και θερμοκρασιών συντήρησης.



Σχήμα 3.7 Μετρήσεις μεταβολής της τιμής pH σε φιλέτα τσιπούρας (πάνω), καθώς και σε φιλέτα λαβρακιού (κάτω) που συσκευάστηκαν σε αέρα και MAP, σε θερμοκρασία 0 (—□), 4 (—Δ), 8 (— x) και 12 °C (— ○).

3.5 Αποτελέσματα μέτρησης αερίων

Στις συσκευασίες τροποιημένης ατμόσφαιρας μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των αερίων O₂ και CO₂ σε ποσοστό επί τοις εκατό (%), οι οποίες παρουσιάζονται στα διαγράμματα των σχημάτων 3.8-3.9 σε συνάρτηση με το χρόνο.

Η αρχική μέτρηση των αερίων στο χρόνο μηδέν έδειξε πως οι συγκεντρώσεις O₂ και CO₂ ήταν αντίστοιχα 22.6, 33.8% στη συσκευασία της τσιπούρας και 23.6, 31% στη συσκευασία του λαβρακιού. Το υπόλοιπο ποσοστό αερίων στις συσκευασίες πιθανόν αποτελείται από άλλα είδη αερίων που χρησιμοποιούνται στις συσκευασιες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (συνήθως αέριο άζωτο).

Η συγκέντρωση του CO₂ παρουσίασε αύξηση κατά την αλλοίωση των δειγμάτων, ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε η συγκέντρωση του O₂. Στην θερμοκρασία των 0 °C υπήρξε μικρή μεταβολή, ενώ στους 4 °C οι μεταβολές ήταν εμφανείς με την έναρξη της αλλοίωσης. Στις θερμοκρασίες των 8 και 12 °C, στο τέλος της συντήρησης, η συγκέντρωση του CO₂ ξεπέρασε το 50%, ενώ για το O₂ η μέτρηση ήταν μηδενική.



Σχήμα 3.8 Μετρήσεις της συγκέντρωσης (%) των αερίων CO₂ (•) και O₂ (•) στις συσκευασίες MAP των φιλέτων τσιπούρας που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 0, 4, 8 και 12 °C.



Σχήμα 3.9 Μετρήσεις της συγκέντρωσης (%) των αερίων CO₂ (•) και O₂ (•) στις συσκευασίες MAP των φιλέτων λαβρακιού που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 0, 4, 8 και 12 °C.

3.6 Αποτελέσματα δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης

Αντιπροσωπευτικά φάσματα των δειγμάτων, όπως προκύπτουν για τα 18 μήκη κύματος του Videometer-Lab, φαίνονται στα σχήματα 3.10-3.11. Τα φρέσκα δείγματα είναι εκείνα που λήφθηκαν στην αρχή του χρόνου συντήρησης, ενώ τα αλλοιωμένα λήφθηκαν προς το τέλος του χρόνου συντήρησης, στη θερμοκρασία των 12 °C και αντιστοιχούν σε OMX > 8 log CFU/ ml.

Από τα διαγράμματα συμπεραίνουμε ότι στην επιδερμίδα των φιλέτων υπάρχει πολύ μεγαλύτερη μεταβλητότητα στις τιμές της ανάκλασης για όλα τα μήκη κύματος, συγκριτικά με τη σάρκα των φιλέτων.



Σχήμα 3.10 Αντιπροσωπευτικά φάσματα MSI από την επιδερμίδα φρέσκων (—) και αλλοιωμένων (—) δειγμάτων φιλέτων τσιπούρας (Α) και λαβρακιού (Β) που συσκευάστηκαν σε αέρα (πάνω) και MAP (κάτω).



Σχήμα 3.11 Αντιπροσωπευτικά φάσματα MSI από τη σάρκα φρέσκων (—) και αλλοιωμένων (—) δειγμάτων φιλέτων τσιπούρας (Α) και λαβρακιού (Β) που συσκευάστηκαν σε MAP.

3.7 Αποτελέσματα δεδομένων FTIR

Στα σχήματα 3.12-3.13 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR με εύρος μηκών κύματος από 3100 έως 900 cm⁻¹, που λήφθηκαν από την επιδερμίδα και τη σάρκα των δειγμάτων τσιπούρας και λαβρακιού. Τα φρέσκα δείγματα είναι εκείνα που λήφθηκαν στην αρχή του χρόνου συντήρησης, ενώ τα αλλοιωμένα λήφθηκαν προς το τέλος του χρόνου συντήρησης στη θερμοκρασία των 12 °C και αντιστοιχούν σε OMX > 8 log CFU/ ml.

Παρατηρώντας τα διαγράμματα βλέπουμε ότι, τα φάσματα που λήφθηκαν από την επιδερμίδα και τη σάρκα των δειγμάτων είναι διαφορετικά, τόσο στην αρχή της δειγματοληψίας (φρέσκα δείγματα) όσο και κατά τη διάρκεια της συντήρησης (αλλοιωμένα δείγματα). Σε όλα τα διαγράμματα παρατηρείται μία κορυφή στον κυματαριθμό 1640 cm⁻¹ (δεσμοί Ο-Η) η οποία οφείλεται στο νερό και στο αμίδιο Ι. Στην κορυφή αυτή παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στην επιδερμίδα και αύξηση της απορρόφησης στη σάρκα κατά τη διάρκεια την επιδερμίδα και αύξηση της απορρόφησης στη σάρκα κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Επιπλέον, οι κορυφές στους κυματαριθμούς 2920, 2850, 1740 cm⁻¹ εμφανίζονται μόνο στα δείγματα που λήφθηκαν από την επιδερμίδα των δειγμάτων, στα οποία φαίνεται πως η απορρόφηση αυξάνεται στις κορυφές αυτές κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Σε αυτές τις περιοχές, και ειδικότερα στις περιοχές 1750-1705 και 2995-2860 cm⁻¹ απορροφούν οι αιθυλικές και οι καρβονυλικές ομάδες των εστέρων αντίστοιχα. Επίσης, στην φασματική περιοχή 1540-900 cm⁻¹ (αμίνες και αμίδια) παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης κατά τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης.

Στη συνέχεια, στις περαιτέρω αναλύσεις του πειράματος, χρησιμοποιούνται οι κυματαριθμοί 3100-2700 cm⁻¹ και 1800-900 cm⁻¹ του φάσματος FTIR, καθώς έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν τα δακτυλικά αποτυπώματα των ψαριών, όσον αφορά στον βαθμό φρεσκότητάς τους (Fengou et al. 2019).


Σχήμα 3.12 Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR από την επιδερμίδα φρέσκων (—) και αλλοιωμένων (—) δειγμάτων φιλέτων τσιπούρας (Α) και λαβρακιού (Β) που συσκευάστηκαν σε αέρα (πάνω) και ΜΑΡ (κάτω).



Σχήμα 3.13 Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR από τη σάρκα φρέσκων (—) και αλλοιωμένων (—) δειγμάτων φιλέτων τσιπούρας (Α) και λαβρακιού (Β) που συσκευάστηκαν σε ΜΑΡ.

3.8 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμισης με την μέθοδο των μερικων ελαχίστων τετραγώνων

Τα δεδομένα που λήφθηκαν με την εφαρμογή των MSI και FTIR, σε συνδυασμό με τα μικροβιολογικά δεδομένα, χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μεθόδου γραμμικής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares-Regression, PLS-R) με σκοπό την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού (OMX) σε κάθε κατηγορία δειγμάτων. Τα δεδομένα από το MSI και το FTIR χρησιμοποιήθηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές X (input) ενώ τα δεδομένα από τις μικροβιολογικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές Y (output). Το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης PLS-R ήταν το λογισμικό χημειομετρίας The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software As, Oslo, Norway).

Για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης PLS-R, προηγείται η εκπαίδευση (training) από μία ομάδα δεδομένων εκπαίδευσης (training set) και η επικύρωση (validation) από μία διαφορετική ανεξάρτητη ομάδα δεδομένων επικύρωσης (test set). Με τη διαδικασία της βαθμονόμησης (calibration), που αποτελεί στάδιο της μοντελοποιημένης διαδικασίας παλινδρόμησης, το κύριο σύνολο των δεδομένων όπου περιέχει μόνο το σύνολο των δειγμάτων βαθμονόμησης, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των παραμέτρων του μοντέλου. Η διασταυρούμενη επικύρωση (Cross Validation, CV) κατηγοριοποιεί τα δεδομένα σε ομάδες από τις οποίες, χρησιμοποιώντας την μία μετά την άλλη, δημιουργούνται εσωτερικά μοντέλα με τα δεδομένα που απομένουν κάθε φορά και παρουσιάζεται μία αρχική εικόνα για την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου. Η CV βοηθάει στην απαλλαγή από τις έντονα συσχετιζόμενες (συγγραμικότητα) και πολυάριθμες ανεξάρτητες μεταβλητές που είναι ικανές να οδηγήσουν σε υπερμοντελοποίηση (overfiting).

Χρησιμοποιώντας το λογισμικό The Unscrambler δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι προεπεξεργασίας και τελικά εφαρμόστηκαν αυτές με τα καλύτερα αποτελέσματα όπως οι SNV (Standard Normal Variate), Savitzky-Golay Derivatives, Norris-Gap Derivatives, Gap Segment Derivatives. Ο σκοπός ήταν να αφαιρεθούν οι άσχετες πληροφορίες από τα δεδομένα και να διευκολυνθεί η ερμηνεία τους.

Για την αξιολόγηση της καταλληλότητας του PLS-R χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διασταυρούμενης επικύρωσης Leave-One-Out Cross Validation (LOOCV). Με τη μέθοδο αυτή, αποκλείεται τυχαία ένα δείγμα κάθε φορά και υπολογίζεται η μεταβλητή απόκρισης του αφαιρεθέντος δείγματος χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο που δημιουργήθηκε με τα υπόλοιπα δείγματα. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου κάθε δείγμα εξαιρείται μία φορά (Picard and Cook, 1984).

Από τα φασματικά δεδομένα του Videometer, για την εφαρμογή της PLS-R, χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των 18 φασμάτων που λήφθηκαν. Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν από τα φασματικά δεδομένα του Videometer για την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού, δεν είχαν ικανοποιητική επίδοση για την επιδερμίδα των φιλέτων τσιπούρας και λαβρακιού τόσο για τη συσκευασία σε αέρα όσο και

για τη συσκευασία υπό ΜΑΡ (Πίνακας 3.5). Στις περιπτώσεις όπου μελετήθηκε η σάρκα των φιλέτων, τα μοντέλα είχαν καλύτερη επίδοση. Συγκεκριμένα, στην τσιπούρα, για την εκπαίδευση του μοντέλου επιλέχθηκαν τα δεδομένα από τις θερμοκρασίες 0, 4 και 12 °C (training set, n=86), ενώ η ενδιάμεση θερμοκρασία των 8 °C χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση του μοντέλου (prediction set, n=24). Στη συνέχεια, αφού εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός GAP-Segment Derivatives, αναπτύχθηκε ένα καλό μοντέλο με συντελεστή προσδιορισμού (R²) μεταξύ των παρατηρούμενων και των εκτιμώμενων μικροβιακών πληθυσμών 0.76, 0.66 και 0.74 για την βαθμονόμηση, τη διασταυρούμενη επικύρωση και την πρόβλεψη του μοντέλου αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες τιμές της απόκλισης της μέσης τετραγωνικής ρίζας (RMSE) ήταν 0.86, 1.04 και 0.74 (Σχήμα 3.14). Επιπλέον, στην περίπτωση της σάρκας των φιλέτων λαβρακιού, τα δεδομένα από το πρώτο δείγμα (Α) του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ως σετ εκπαίδευσης (training set, n=49) και τα δεδομένα από το δεύτερο δείγμα (B) ως σετ επικύρωσης (prediction set, n=49). Μετά την εφαρμογή μετασχηματισμού SNV, το μοντέλο που αναπτύχθηκε είχε συντελεστές R² 0.85, 0.80, 0.64, και RMSE 0.48, 0.57, 0.83 για την βαθμονόμηση του μοντέλου, τη διασταυρούμενη επικύρωση και την πρόβλεψη αντίστοιχα (Σχήμα 3.15).

Από τα φασματικά δεδομένα του FTIR χρησιμοποιήθηκαν οι κυματαριθμοί μεταξύ 3100-2700 και 1800-900 cm⁻¹. Τα δεδομένα αυτά συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκαν μαζί με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα με την εφαρμογή της PLS-R. Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν από τα φασματικά δεδομένα του FTIR για την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού, παρουσίασαν καλή απόδοση σε ορισμένες κατηγορίες δειγμάτων, όπως αποδεικνύεται από τους συντελεστές απόδοσης που αναφέρονται στον πίνακα 3.5. Αναλυτικότερα:

- Στην περίπτωση της επιδερμίδας τσιπούρας που συσκευάστηκε σε αέρα, για την εκπαίδευση του μοντέλου επιλέχθηκαν τα δεδομένα από τις θερμοκρασίες 0, 4 και 12 °C (training set, n=85), ενώ η ενδιάμεση θερμοκρασία των 8 °C χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση του μοντέλου (prediction set, n=28). Οι μεταβλητές X (φάσματα FTIR) διαιρέθηκαν με την τυπική απόκλισή τους (Stdev). Η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού (R²) μεταξύ των παρατηρούμενων και των εκτιμώμενων μικροβιακών πληθυσμών ήταν 0.84, 0.74 και 0.70 για την βαθμονόμηση του μοντέλου, τη διασταυρούμενη επικύρωση και την πρόβλεψη αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της απόκλισης της μέσης τετραγωνικής ρίζας (RMSE) ήταν 0.68, 0.86 και 0.88 (Σχήμα 3.16).
- Στην περίπτωση της επιδερμίδας λαβρακιού σε αέρα, τα δεδομένα από τις θερμοκρασίες 0, 4 και 12°C χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του μοντέλου (training set, n=74) ενώ η ενδιάμεση θερμοκρασία των 8 °C χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση του μοντέλου (prediction set, n=22). Για τη βελτίωση του μοντέλου εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμος με βάση τον αλγόριθμο Savitzky-Golay Derivatives (δεύτερη παράγωγος). Η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού (R²) μεταξύ των παρατηρούμενων και των εκτιμώμενων μικροβιακών πληθυσμών ήταν 0.95, 0.72 και 0.69 για την βαθμονόμηση του μοντέλου, τη διασταυρούμενη επικύρωση και την πρόβλεψη αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της απόκλισης της μέσης τετραγωνικής ρίζας (RMSE) ήταν 0.38, 0.95 και 0.96 (Σχήμα 3.17).

Στην περίπτωση της σάρκας τσιπούρας που συσκευάστηκε σε MAP, τα δεδομένα από το πρώτο δείγμα (A) του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ως σετ εκπαίδευσης (training set, n=56) και τα δεδομένα του δεύτερου δείγματος (B) ως σετ επικύρωσης (prediction set, n=56). Η τιμή του R² μεταξύ των παρατηρούμενων και των εκτιμώμενων μικροβιακών πληθυσμών ήταν 0.99, 0.66 και 0.66 για την βαθμονόμηση του μοντέλου, τη διασταυρούμενη επικύρωση και την πρόβλεψη αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της RMSE ήταν 0.14, 1.02 και 0.99 (Σχήμα 3.18).

FISH SAMPLE	INPUT	DATA SET	SLOPE	OFFSET	RMSE	R ²	OUTPUT / TRANFORMATIONS
		Calibration	0.68	2.54	0.94	0.68	Training set: 0,4,12 °C n=84
	VIDEOMETER	Cross-Validation	0.59	3.33	1.21	0.49	Prediction set: 8 °C n=28
Τσιπούρα Δέρας		Prediction	0.85	0.81	0.73	0.78	Transformation: SNV
Αερας Επιδερμίδα		Calibration	0.84	1.30	0.68	0.84	Training set: 0,4,12 °C n=85
	FTIR	Cross-Validation	0.80	1.62	0.86	0.74	Prediction set: 8 °C n=28
		Prediction	0.82	1.56	0.88	0.70	
		Calibration	0.59	3.10	1.13	0.59	Training set: B sample n=48
	VIDEOMETER	Cross-Validation	0.48	3.90	1.38	0.41	Prediction set: A sample n=48
Λαβράκι Δέρας		Prediction	0.44	4.20	1.31	0.44	Transformation: Norris Gap -2nd deriv.
Επιδερμίδα		Calibration	0.95	0.36	0.38	0.95	Training set: 0,4,12 °C n=74
	FTIR	Cross-Validation	0.75	1.97	0.95	0.72	Prediction set: 8 °C n=22
		Prediction	0.67	2.60	0.96	0.69	Transformation: S.Golay -2nd deriv.
		Calibration	0.60	2.73	1.11	0.60	Training set: 0,4,12 °C n=86
	VIDEOMETER	Cross-Validation	0.55	3.07	1.24	0.51	Prediction set: 8 °C n=24
Τσιπούρα ΜΑΡ		Prediction	0.50	3.50	1.18	0.33	
Επιδερμίδα		Calibration	0.92	0.57	0.51	0.92	Training set: 0, 4, 12 °C n=87
	FTIR	Cross-Validation	0.81	1.31	1.03	0.67	Prediction set: 8 °C n=24
		Prediction	0.75	1.56	1.17	0.34	
		Calibration	0.76	1.62	0.86	0.76	Training set: 0,4,12 °C n=86
	VIDEOMETER	Cross-Validation	0.72	1.94	1.04	0.66	Prediction set: 8 °C n=24
Τσιπούρα ΜΑΡ		Prediction	0.96	0.38	0.74	0.74	Transformation: DerivGap segment
τάρκα		Calibration	0.99	0.05	0.14	0.99	Training set: A sample n=56
	FTIR	Cross-Validation	0.73	1.89	1.02	0.66	Prediction set: B sample n=56
		Prediction	0.66	2.47	0.99	0.66	
		Calibration	0.64	2.65	0.75	0.64	Training set: A sample n=49
	VIDEOMETER	Cross-Validation	0.56	3.25	0.96	0.44	Prediction set: B sample n=49
Λαβράκι ΜΑΡ		Prediction	0.70	2.22	0.92	0.56	
Επιδερμίδα		Calibration	0.92	0.58	0.37	0.92	Training set: 0, 8, 12 °C n=76
	FTIR	Cross-Validation	0.82	1.35	0.87	0.59	Prediction set: 4 °C n=23
		Prediction	0.33	4.71	0.97	0.36	
		Calibration	0.85	1.09	0.48	0.85	Training set: A sample n=49
	VIDEOMETER	Cross-Validation	0.84	1.21	0.57	0.80	Prediction set: B sample n=49
Λαβράκι ΜΑΡ		Prediction	0.75	1.79	0.83	0.64	Transformation: SNV
Σάρκα		Calibration	0.86	1.08	0.50	0.86	Training set: 0, 8, 12 °C n=73
	FTIR	Cross-Validation	0.78	1.70	0.88	0.58	Prediction set: 4 °C n=24
		Prediction	0.34	4.49	1.03	0.26	

Πίνακας 3.5 Δείκτες επίδοσης των μοντέλων που αναπτύχθηκαν για τη βαθμονόμηση και την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού σε κάθε κατηγορία δειγμάτων.





Σχήμα 3.15 Διαγράμματα από την εφαρμογή PLS-R μοντέλων όπου συσχετίζεται η ολική μικροβιακή χλωρίδα με τα αποτελέσματα του Videometer, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που προέρχονται από τη συντήρηση στους 0, 4,8 και 12 °C του Α δείγματος (n=49) για την εκπαίδευση και τα δεδομένα από τις ίδιες θερμοκρασίες συντήρησης του Β δείγματος (n=49) για την πρόβλεψη του μοντέλου, στην περίπτωση της σάρκας φιλέτων λαβρακιού σε συσκευασία MAP. Στα διαγράμματα φαίνεται η γραμμή παλινδρόμησης (regression line) της βαθμονόμησης (—) επικύρωσης (—) (αριστερά) και πρόβλεψης (—) του μοντέλου (δεξιά).



Σχήμα 3.16 Διαγράμματα από την εφαρμογή PLS-R μοντέλων όπου συσχετίζεται η ολική μικροβιακή χλωρίδα με τα αποτελέσματα του FTIR, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που προέρχονται από τη συντήρηση στους 0, 4 και 12 °C (n=85) για την εκπαίδευση και τα δεδομένα από τους 8 °C (n=28) για την πρόβλεψη του μοντέλου, στην περίπτωση της επιδερμίδας φιλέτων τσιπούρας σε αέρα. Στα διαγράμματα φαίνεται η γραμμή παλινδρόμησης (regression line) της βαθμονόμησης (—) επικύρωσης (—) (αριστερά) και πρόβλεψης (—) του μοντέλου (δεξιά).



Σχήμα 3.17 Διαγράμματα από την εφαρμογή PLS-R μοντέλων όπου συσχετίζεται η ολική μικροβιακή χλωρίδα με τα αποτελέσματα του FTIR, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που προέρχονται από τη συντήρηση στους 0, 4 και 12 °C (n=74) για την εκπαίδευση και τα δεδομένα από τους 8 °C (n=22) για την πρόβλεψη του μοντέλου, στην περίπτωση της επιδερμίδας φιλέτων λαβρακιού σε αέρα. Στα διαγράμματα φαίνεται η γραμμή παλινδρόμησης (regression line) της βαθμονόμησης (--) επικύρωσης (--) (αριστερά) και πρόβλεψης (--) του μοντέλου (δεξιά).



Σχήμα 3.18 Διαγράμματα από την εφαρμογή PLS-R μοντέλων όπου συσχετίζεται η ολική μικροβιακή χλωρίδα με τα αποτελέσματα του FTIR, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που προέρχονται από τη συντήρηση στους 0, 4,8 και 12 °C του Α δείγματος (n=56) για την εκπαίδευση και τα δεδομένα από τις ίδιες θερμοκρασίες συντήρησης του Β δείγματος (n=56) για την πρόβλεψη του μοντέλου, στην περίπτωση της σάρκας φιλέτων τσιπούρας σε συσκευασία MAP. Στα διαγράμματα φαίνεται η γραμμή παλινδρόμησης (regression line) της βαθμονόμησης (—) επικύρωσης (—) (αριστερά) και πρόβλεψης (—) του μοντέλου (δεξιά).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροβιακής αύξησης σε φιλέτα τσιπούρας και λαβρακιού σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης και συσκευασίας, καθώς και η ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης της μικροβιακής αλλοίωσης, χρησιμοποιώντας φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από το FTIR και το VideometerLab.

Από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, ο πληθυσμός των βακτηρίων Pseudomonas spp. εκπροσωπούσε την ολική μικροβιακή χλωρίδα, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία συντήρησης, ακολουθούμενος από τα βακτήρια που παράγουν H₂S (Shewanella spp.), στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε ατμοσφαιρικό αέρα. Επιπρόσθετα, με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης, ο πληθυσμός των Enteobacteriaceae αυξήθηκε και πλησίασε τον πληθυσμό των Shewanella spp. Οι Gram et al. (1996), αναφέρουν ότι στα ψάρια που συντηρούνται σε αερόβιες συνθήκες υπό ψύξη, η μικροβιακή χλωρίδα αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από Pseudomonas spp. και Shewanella spp.. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροβιακή χλωρίδα σε ψάρια γόπας που αλιεύτηκαν από νερά της Μεσογείου και συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασίες των 0, 3, 7 και 10 °C (Koutsoumanis και Nychas, 1999). Είναι γνωστό πως τα βακτήρια που παράγουν H₂S αποτελούνται κυρίως από είδη Shewanella spp. σε ψάρια που έχουν αλιευτεί από τη Μεσόγειο θάλασσα (Tryfinopoulou et al., 2007). Το Shewanella putrefaciens έχει αναφερθεί ότι συνεισφέρει σημαντικά στην αλλοίωση νωπών ιχθυηρών συντηρημένων σε αέρα, ενώ επίσης έχει διαπιστωθεί ότι ανάγει το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) παράγοντας τριμεθυλαμίνη (TMA) που οδηγεί σε οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Gram et al., 1996).

Η χαμηλή θερμοκρασία και οι τροποποιημένες συνθήκες ατμόσφαιρας συνέβαλαν στην αύξηση του χρόνου συντήρησης των ψαριών, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (DeWitt και Oliveira, 2016, Doulgeraki et al., 2012). Στις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην αύξηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, η οποία ξεπέρασε τους 7 log CFU/g στις 17 και 13 ημέρες, με διαφορά 11 και 8 ημερών από τις συσκευασίες σε αέρα, στην τσιπούρα και στο λαβράκι αντίστοιχα, στη θερμοκρασία των 0 °C. Ο πληθυσμός των βακτηρίων Pseudomonas spp. εκπροσωπούσε την ολική μικροβιακή χλωρίδα, μαζι με τα Shewanella spp.. Επίσης ο πληθυσμός των Enterobacteriaceae πλησίαζε τις τιμές της ολικής μικροβιακής χλωρίδας προς το τέλος του χρόνου συντήρησης, ιδίως στις θερμοκρασίες των 8 και 12 °C. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει πως η προσθήκη αερίου CO_2 στη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας ψαριών οδηγεί στη μείωση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στην τσιπούρα (Goulas et al., 2007), και στο λαβράκι (Parlapani et al., 2015). Επίσης έχει αποδειχθεί πως το αέριο CO₂ έχει αντιβακτηριοστατική δράση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και δρα παρατείνοντας τη φάση προσαρμογής και μειώνοντας το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης (Farber, 1991). Πράγματι, στις συσκευασίες ΜΑΡ στους 0 °C, η φάση προσαρμογής των Pseudomonas spp., Shewanella spp. και Enterobacteriaceae αυξήθηκε κατά 164, 245, 314 hours⁻¹ αντίστοιχα σε σχέση με τις συσκευασίες σε αέρα, στα δείγματα

τσιπούρας, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κυμαίνονταν σε χαμηλά επίπεδα (0.01-0.02 hours⁻¹).

Επιπλέον, στις συσκευασίες ΜΑΡ παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην ανάπτυξη του πληθυσμού των B. thermosphacta, ενώ οι πληθυσμοί των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών μεταβλήθηκαν ελάχιστα ή καθόλου στις δύο διαφορετικές συσκευασίες. Παρόλα αυτά, η βιβλιογραφία αναφέρει πως σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ο κύριος μικροοργανισμός αλλοίωσης της τσιπούρας είναι το βακτήριο B. thermosphacta (Drosinos και Nychas, 1997) και ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) αποτελούν μία από τις κυρίαρχες κατηγορίες μικροοργανισμών αλλοίωσης των ψαριών στις συνθήκες αυτές (Drosinos et al., 1997). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκλίνουν από τα παραπάνω, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, ιδίως τη θερμοκρασία και τη σύνθεση της συσκευασίας ΜΑΡ, οι οποίες επηρεάζουν τη σύνθεση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (Dalgaard, 2003). Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα αρχικά επίπεδα του CO₂ ήταν 33.8-31% και του O₂ 22.6-23.6% για τη τσιπουρα και το λαβράκι αντίστοιχα. Συνεπώς, η περιεκτικότητα σε CO2 στις συσκευασίες MAP ήταν μετρίως υψηλή και η περιεκτικότητα σε Ο₂ ήταν παραπλήσια με αυτήν του ατμοσφαιρικού αέρα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να μην παρεμποδιστεί αρκετά η ανάπτυξη των αερόβιων Pseudomonas spp. αλλά και των υπόλοιπων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και κατά συνέπεια δεν ευνοήθηκε η ανάπτυξη των θετικών κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιων B. thermosphacta και LAB, καθώς και των ζυμών. Αποτέλεσμα της συγκεκριμένης σύνθεσης αερίων στη συσκευασία ΜΑΡ, ήταν η καθυστέρηση της μικροβιακής ανάπτυξης συνολικά, χωρίς όμως να μεταβληθεί η σύνθεση της μικροχλωρίδας των φιλέτων.

Παρόμοια μελέτη, με διαφορετική σύνθεση αερίων της συσκευασίας ΜΑΡ πραγματοποιήθηκε από την Parlapani et al. (2015) όπου εκσπλαχνισμένες τσιπούρες συντηρήθηκαν στους 2 °C, σε συνθήκες MAP (CO₂:60%, O₂:10%, N₂:30%) και ατμοσφαιρικού αέρα και μελετήθηκαν οι μικροβιολογικές αλλαγές και η διάρκεια ζωής του τροφίμου. Κυρίαρχοι μικροοργανισμοί και στις δύο κατηγορίες συσκευασιών ήταν οι *Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp., ενώ στη συσκευασία MAP ευνοήθηκε η ανάπτυξη των *B*.thermosphacta και LAB συγκριτικά με τη συσκευασία σε αέρα.

Στη θερμοκρασία των 12 °C η επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στην ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν ελάχιστη, καθώς η ολική μικροβιακή χλωρίδα ξεπέρασε τους 7 log CFU/g με διαφορά μόνο 30 ωρών από τις αντίστοιχες συσκευασίες σε αέρα. Η τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι λιγότερο αποτελεσματική σε θερμοκρασίες υψηλότερες της συνιστώμενης, λόγω της ελάττωσης της περιεκτικότητας του CO_2 στο τρόφιμο και συνεπώς την ελάττωση της ανάσχεσης της μικροβιακής ανάπτυξη (Sivertsvik et al., 2002).

Οι χαμηλές θερμοκρασίες καθυστέρησαν αισθητά την οργανοληπτική αλλοίωση των δειγμάτων, όσον αφορά την οσμή και το χρώμα της επιδερμίδας. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης έδειξαν καθυστέρηση της οργανοληπτικής αλλοίωσης των φιλέτων στις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, συγκριτικά με τις αντίστοιχες συσκευασίες σε αέρα (αύξηση της διάρκειας ζωής κατά 5, 7, 1, 2 ημέρες στις θερμοκρασίες 0, 4, 8, 12 °C αντίστοιχα). Η υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οφείλεται κυρίως στη βακτηριακή ανάπτυξη και σε προϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων,

καθώς επίσης στην αυτόλυση και στη χημική οξείδωση των λιπιδίων (Tryfinopoulou et al., 2001). Οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (Specific Spoilage Organisms, SSO) είναι εκείνοι που συμβάλουν κατά κύριο λόγο στην αλλοίωση (Gram et al., 1996). Χαρακτηριστικό της αλλοίωσης από τους μικροοργανισμούς Pseudomonas spp. είναι η παραγωγή γλοιώδους υγρού (Ellis και Goodacre, 2001) και δύσοσμων ενώσεων με οσμή σήψης (Koutsoumanis et al., 2008). Επιπρόσθετα, το βακτήριο B. thermosphacta παράγει οργανικά οξέα μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης, με αποτέλεσμα να παράγονται βουτυρικές ή υπόξινες οσμές (Koutsoumanis et al., 2008, Stanborough et al., 2017). Ωστόσο, τα τελικά προϊόντα των B. thermosphacta καθώς και των γαλακτικών βακτηρίων είναι λιγότερο δύσοσμα σε σχέση με τους μεταβολίτες των Pseudomonas spp. (Nychas et al., 1998, Skandamis και Nychas, 2001). Σύμφωνα με τους DeWitt et al. (2016), πολλές σημαντικές ποιοτικές αλλαγές που παρατηρούνται στα θαλασσινά που συντηρούνται σε συσκευασία ΜΑΡ, σχετίζονται άμεσα με τη μικροβιακή αλλοίωση, που μπορεί να οδηγήσει σε οσμές, μαλάκωμα των μυών, αποχρωματισμό και αύξηση του μυϊκού εξιδρώματος κατά τη συντήρηση του τροφίμου. Οι ποιοτικές αλλαγές μπορεί επίσης να προέρχονται από την ενσωμάτωση του CO2 στην υδατική φάση του τροφίμου, η οποία προκαλεί μείωση του pH των μυών και της ικανότητας συγκράτησης νερού από τις πρωτείνες, προκαλώντας αύξηση της απώλειας νερού κατά τη διάρκεια της συντήρησης του τροφίμου. Η υποβάθμιση της υφής των προϊόντων ΜΑΡ μπορεί επίσης να συμβεί λόγω της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας, η οποία μπορεί να αυξηθεί με τη μείωση του pH των μυών που προκαλείται από το CO₂ (DeWitt et al., 2016).

Οι τιμές του pH δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών συσκευασιών και θερμοκρασιών συντήρησης, ενώ κυμαίνονταν από 6 έως 7. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως πολλοί και διαφορετικοί παράγοντες επηρεάζουν την τιμή του pH. Η αύξηση του pH κατά την περίοδο συντήρησης σε αέρα μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή βασικών ενώσεων όπως αμμωνία, τριμεθυλαμίνη, καθώς και άλλων βιογενών αμίνων από αλλοιωγόνα βακτήρια (Boskou και Debevere, 2000, Kyrana et al., 1997, Masniyom et al., 2002, Ruiz-Capillas και Moral, 2001). Η κύρια αιτία μείωσης του pH στα συσκευασμένα σε ΜΑΡ ψάρια είναι η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Επιπρόσθετα, στις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με παρουσία CO2, η μείωση του pH είναι συνέπεια της διαλυτότητας του CO₂ στους ιστούς, σχηματίζοντας ανθρακικό οξύ. Επιπλέον, μείωση του pH προκαλείται από την αντιμικροβιακή δράση του CO2 αποτρέποντας τη συσσώρευση βασικών προϊόντων του μικροβιακού μεταβολισμού (Babic Milijasevic et al., 2019). Στην παρούσα μελέτη, οι μη μεταβολές των τιμών του pH μεταξύ των διαφορετικών συσκευασιών πιθανό να οφείλονται στη σύνθεση των αερίων της συσκευασίας ΜΑΡ, η οποία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν οδήγησε σε μεταβολή της σύνθεσης της μικροβιακής χλωρίδας.

Η ανασταλτική δράση του CO₂ στη μικροβιακή ανάπτυξη εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του, η οποία όσο υψηλότερη είναι τόσο υψηλότερη είναι και η ανασταλτική δράση που παρατηρείται. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα του CO₂ σχετίζεται με την υψηλή διαλυτότητά του, τόσο στην υδατική φάση όσο και στα λιπίδια των μυϊκών τροφίμων. Όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο μεγαλύτερη είναι η διαλυτότητα του CO₂ (DeWitt et al., 2016). Η συντηρητική επίδραση του CO₂ στην αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι μια περίπλοκη διαδικασία που δεν μπορεί να εξηγηθεί αποκλειστικά είτε από την αλλαγή του pH που προέρχεται από τη διαλυτότητα του αερίου στο προϊόν, είτε από τη μετατόπιση κάποιου ή όλου του διαθέσιμου οξυγόνου για τον βακτηριακό μεταβολισμό (DeWitt et al., 2016).

Στις συσκευασίες MAP, με την πάροδο του χρόνου και με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης, σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ και μειώση της συγκέντρωσης του O₂ στα δείγματα. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση των αερίων CO₂ και O₂ στις συσκευασίες MAP πιθανώς οφείλονται στη βακτηριακή αναπνοή των μικροοργανισμών των δειγμάτων, η οποία οδηγεί σε μεταβολή των αερίων της συσκευασίας, καθώς και στα χαρακτηριστικά διαπερατότητας της μεμβράνης συσκευασίας η οποία ελέγχει την κίνηση των αερίων.

Αναφορικά με τα τυπικά φάσματα ανάκλασης που λήφθηκαν με τη μέθοδο πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) από την επιφάνεια και τη σάρκα των δειγμάτων, παρατηρήθηκε ότι στην επιδερμίδα υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα στις τιμές των φασμάτων για όλα τα μήκη κύμματος συγκριτικά με τη σάρκα των δειγμάτων. Το γεγονός αυτό εξηγείται από το ομοιογενές και σταθερό χρώμα της σάρκας (λευκό) σε σχέση με το χρώμα της επιδερμίδας (ασημί-γκρι) των υπό μελέτη ψαριών (Fengou et al. 2019).

Στα φάσματα που λήφθηκαν από το φασματοφωτόμετρο FTIR από την επιδερμίδα και από τη σάρκα των ψαριών, υπήρξαν διαφορές μεταξύ των φρέσκων και των αλλοιωμένων δειγμάτων. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1640 cm⁻¹ περίπου είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο νερό (δεσμοί Ο-Η). Στα φάσματα που λήφθηκαν από την επιδερμίδα και από τη σάρκα των αλλοιωμένων δειγμάτων παρατηρείται μείωση και αύξηση αντίστοιχα της απορρόφησης στα 1640 cm⁻¹. Αυτή η διαφορετική απόκριση μπορεί να είναι ενδεικτική της αντίστροφης μετατόπισης της υγρασίας στις δύο επιφάνειες των δειγμάτων που μελετήθηκαν (Fengou et al., 2019). Οι κορυφές στους κυματαριθμούς 2920, 2850, 1740 cm⁻¹ εμφανίστηκαν μόνο στα φάσματα που λήφθηκαν από την επιδερμίδα των δειγμάτων, στα οποία παρατηρήθηκαν υψηλότερες κορυφές στα αλλοιωμένα δείγματα. Έχει αποδειχθεί πως οι κορυφές στις φασματικές περιοχές 1750-1705 cm⁻¹ και 2995-2860 cm⁻¹ σχετίζονται με τις δονήσεις των λειτουργικών ομάδων των εστέρων, όπως οι καρβονυλικές και αιθυλικές ομάδες αντίστοιχα (Socrates, 2001). Δεδομένου ότι τα Pseudomonas spp. είναι οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στα δείγματα, η αύξηση της απορρόφησης στις κορυφές αυτών των περιοχών μπορεί να αποτελεί ένδειξη της παραγωγής μικροβιακών μεταβολιτών, όπως οι αιθυλεστέρες, οι οποίοι σχετίζονται με τη μεταβολική δραστηριότητα των Pseudomonas spp. (Fengou et al. 2018). Στα φάσματα που λήφθηκαν από τη σάρκα των ψαριών, η αύξηση της απορρόφησης στα αλλοιωμένα δείγματα, στη φασματική περιοχή 1540-900 cm⁻¹, η οποία σχετίζεται με τις αμίνες και τα αμίδια, δείχνει ότι αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων και των ελεύθερων αμινοξέων ως αποτέλεσμα της αυτολυτικής ή/ και της μικροβιακής πρωτεόλυσης (Fengou et al. 2019). Η υδρόλυση των πρωτεϊνών υποδεικνύει την παραγωγή μεταβολιτών που σχετίζονται με την αλλοίωση, όπως η αμμωνία και οι πτητικές αμίνες (Saraiva et al., 2017).

Η δημιουργία μοντέλων για την εκτίμηση της αλλοίωσης των φιλέτων ψαριών χρησιμοποιώντας τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (VideometerLab) δεν ήταν αποτελεσματική για την επιδερμίδα των φιλέτων τσιπούρας και λαβρακιού, τόσο για τη

συσκευασία σε αέρα όσο και για τη συσκευασία σε MAP. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τη φύση των ληφθέντων μηκών κύματος, τα περισσότερα από τα οποία ανήκουν στην ορατή περιοχή (Fengou et al., 2019). Αντίθετα, τα μοντέλα που εφαρμόστηκαν για τη σάρκα των δειγμάτων στις συσκευασίες MAP είχαν καλύτερη επίδοση, με ικανοποιητικούς συντελεστές απόδοσης (R², RMSE) (Πίνακας 3.5). Η καλύτερη επίδοση του μοντέλου που βασίζεται σε δεδομένα MSI δειγμάτων που λήφθηκαν από τη σάρκα σε σύγκριση με εκείνη που βασίζεται σε δείγματα που λήφθηκαν από την επιδερμίδα του ψαριού, μπορεί να αποδοθεί στη μεγαλύτερη διακύμανση των τιμών φασματικής ανάκλασης της επιδερμίδας συγκριτικά με τη σάρκα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Fengou et al., 2019).

Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν για την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού στα δείγματα χρησιμοποιώντας τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από το FTIR παρουσίασαν καλή απόδοση με ικανοποιητικούς συντελεστές απόδοσης (R², RMSE) (Πίνακας 3.5) στις περιπτώσεις των φασμάτων που λήφθηκαν από την επιδερμίδα των φιλέτων που συσκευάστηκαν σε αέρα. Χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από τη συντήρηση στους 0,4 και 12 °C για τη βαθμονόμηση και επικύρωση του μοντέλου και τα δεδομένα από τη συντήρηση στους 8 °C για την πρόβλεψη. Ένα ακόμα μοντέλο αναπτύχθηκε στην περίπτωση της σάρκας των φιλέτων τσιπούρας που συσκευάστηκαν σε ΜΑΡ χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από το πρώτο δείγμα του πειράματος για την εκπαίδευση και τα δεδομένα από το δεύτερο δείγμα για την επικύρωση του μοντέλου, για όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Τα μοντέλα PLS-R που αναπτύχθηκαν μπορούν να παρέχουν αξιόπιστες εκτιμήσεις της ολικής μικροβιακής χλωρίδας με βάση τα φάσματα FTIR της επιδερμίδας των φιλέτων που συσκευάστηκαν σε αέρα αλλά και της σάρκας των φιλέτων σε συσκευασία ΜΑΡ, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Η ανάπτυξη χημειομετρικών προσεγγίσεων ανεξάρτητων από τη θερμοκρασία συντήρησης είναι πολύ σημαντική δεδομένου ότι οι εφαρμοζόμενες συνθήκες συντήρησης μπορούν να επηρεάσουν όχι μόνο τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς αλλοίωσης, αλλά και τη μεταβολική τους δραστηριότητα (Nychas et al., 2007). Το δέρμα είναι η περιοχή των ψαριών (μαζί με τα βράγχια και τα σπλάχνα στην περίπτωση των ολόκληρων ψαριών) με την υψηλότερη βακτηριακή μόλυνση (Gram και Huss, 1996). Παρόλο που η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί επίσης να λάβει χώρα στη σάρκα των ψαριών (Carrascosa et al., 2016), ο ακριβής ρόλος της στις βιοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται μπορεί να μην είναι εύκολα διακριτός από το ρόλο των αυτολυτικών διεργασιών που αναμένεται να είναι εκτεταμένες στους μυες των ψαριών (Ghaly et al., 2010, Sone et al., 2011). Στα φιλέτα ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, το υψηλό μικροβιακό φορτίο που παρατηρήθηκε στη σάρκα μπορεί να οφείλεται στη διαδικασία της φιλετοποίησης. Κατά τη φιλετοποίηση των ψαριών υπάρχει πιθανός βιολογικός κίνδυνος επιμόλυνσης από τους χειριστές ή και τον εξοπλισμό. Συμπεραίνεται ότι, στα δείγματα υπάρχει υψηλή μικροβιακή συμβολή στις βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν τόσο στη σάρκα όσο και στο δέρμα των φιλέτων.

Υπάρχουν πολύ περιορισμένα ερευνητικά δεδομένα σχετικά με τη χρήση της φασματοσκοπίας FTIR στον χαρακτηρισμό της φρεσκάδας των ψαριών, με τις περισσότερες από τις δημοσιευμένες μελέτες να σχετίζονται με ζητήματα ελέγχου ταυτότητας και νοθείας

(Hassoun και Karoui, 2017). Μία μελέτη που αναφέρεται στο δυναμικό της φασματοσκοπίας FTIR ως μέσου ποσοτικής παρακολούθησης της μικροβιολογικής αλλοίωσης των ψαριών είναι αυτή που διεξήχθη από τους Saraiva et al. (2017). Οι ερευνητές αυτοί ανέπτυξαν ένα μοντέλο PLS-R που επιτρέπει την εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας φιλέτων σολομού βάσει μικροβιολογικών και υπέρυθρων φασματικών δεδομένων που συλλέχθηκαν κατά τη συντήρηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ατμόσφαιρες συσκευασίας. Επιπλέον, οι Fengou et al. (2019) ανέπτυξαν ένα μοντέλο PLS-R που επιτρήηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ατμόσφαιρες συσκευασίας. Επιπλέον, οι Fengou et al. (2019) ανέπτυξαν ένα μοντέλο PLS-R που επιτρέπει την εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας μικροβιολογικών και υπέρυθρων φασματικών δεδομένων κατά την αποθήκευση σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Έτσι, αποδείχθηκε ότι η φασματοσκοπία FTIR είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης της τσιπούρας, με βάση τα υπέρυθρα φάσματα του δέρματος των ψαριών.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η φασματοσκοπία FTIR θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη και μη επεμβατική αξιολόγηση της μικροβιακής αλλοίωσης των φιλέτων τσιπούρας ή λαυρακιού, με λήψη φάσματος από την επιδερμίδα, στα προϊόντα που συσκευάζονται σε ατμοσφαιρικό αέρα, καθώς και από τη σάρκα στα προϊόντα που συσκευάζονται σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες, με θερμοκρασίες συντήρησης από 0 έως 12 °C. Επιπλέον, μη επεμβατική εκτίμηση της μικροβιακής ποιότητας των φιλέτων που συσκευάζονται σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες μπορεί να εφαρμοστεί με τη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης, με το μηχάνημα VideometerLab, λαμβάνοντας πολυφασματικές εικόνες από τη σάρκα των φιλέτων, με θερμοκρασίες συντήρησης από 0 έως 12 °C.

Η πρόοδος στην εφαρμογή της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας για την παράταση της διάρκειας ζωής των μυϊκών τροφίμων συμβαίνει με γρήγορα βήματα. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια επικεντρώνεται όλο και περισσότερο σε μια πιο εξελιγμένη προσέγγιση που βασίζεται σε συστήματα για την ανάπτυξη και αξιολόγηση του ΜΑΡ στα αλιευτικά προϊόντα. Απαιτείται περισσότερη έρευνα για να κατανοηθεί πλήρως πώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συσκευασία ΜΑΡ, η θερμοκρασία συντήρησης, καθώς και άλλοι παράγοντες, ώστε να ευνοηθούν οι ευεργετικοί μικροοργανισμοί του τροφίμου, όπως οι γαλακτοβάκιλλοι, σε βάρος των πιο επιβλαβών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως οι ψευδομονάδες, προκειμένου να προστατεύεται η ποιότητα του προϊόντος, αλλά επίσης και για τον καλύτερο έλεγχο των επικίνδυνων παθογόνων (DeWitt et al., 2016).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdi, H., 2003. Partial Least Squares Regression (PLS regression). Encyclopedia for research methods for the social sciences 6, 792-795.
- Adams, M.R., Nicolaides, L., 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control 8*, 227-239.
- Álvarez, A., García García, B., Garrido, M.D., Hernández, M.D., 2008. The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture 284*, 106-114.
- Anderson, M.L., Ravesi, E.M., 1969. Reactions of free fatty acids with protein in cod muscle frozen and stored at -26 °C after aging in ice. *Journal of Fisheries Research* 26, 2727-2736.
- Ashie I.N.A., Smith J.P., Simpson B.K., 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 36, 87-121.
- Babic Milijasevic, J., Milijasevic, M., Djordjevic, V., 2019. Modified atmosphere packaging of fish - An impact on shelf life. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 333*.
- Banks, H., Nickelson, R. & Finne, G., 1980. Shelf-life studies on carbon dioxide packaged finfish from the Gulf of Mexico. *Journal of Food Science* 45, 157-162.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10, 43-59.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International journal of Food Microbiology 23, 277-294.
- Baranyi J., Roberts, 1994. Mathematics of predictive food microbiology, International Journal of Food Microbiology 26, 199-218.
- Boddy L., Wimpenny J.W.T., 1992. Ecological concepts in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 73*, 23S-38S.
- Boskou, G., Debevere, J., 2000. Shelf-life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmosphere. *Food Additives and Contaminants 17*, 17-25.
- Carrascosa, C., Saavedra, P., Millán, R., Jaber, J.R., Montenegro, T., Raposo, A., Sanjuán, E., 2016. Microbial growth models in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Journal of Aquatic Food Product Technology 25*, 307-322.
- Carstensen, J.M., Hansen, J.F., 2003. An apparatus and a method of recording an image of an object. *Patent family EP1051660, patent application filed 1998*.
- Chaix, E., Couvert, O., Guillaume, C., Gontard, N., Guillard, V. 2015. Predictive microbiology coupled with gas (O₂/CO₂) transfer in food/ packaging systems: How to develop an efficient decision support tool for food packaging dimensioning. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 14*, 1-21.
- Cheng, J., Sun, D., 2015. Recent applications of spectroscopic and hyperspectral imaging techniques with chemometric analysis for rapid inspection of microbial spoilage in muscle foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 478-490.

- Codex Alimentarius Commission, 2020. Code of practice for fish and fishery products (CAC/CXC52-2003). FAO and WHO Rome. <u>https://doi.org/10.4060/cb0658en</u> [ανάκτηση 12/10/2020].
- Cooksey, K., 2013. Modified atmosphere packaging of meat, poultry and fish. Innovations in Food Packaging second edition.
- Dainty R.H., 1971. The control and evaluation of spoilage. Journal of Food Technology 6, 209.
- Dainty R.H., 1996. Chemical/ biochemical detection of spoilage. International Journal of Food Microbiology 33, 19-33.
- Dalgaard, P., Gram L., Huss H., 1993. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International journal of Food Microbiology 19*, 283-294.
- Dalgaard P., 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. International journal of Food Microbiology 26, 319-333.
- Dalgaard P., 2003. Spoilage of seafood. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Ed.), Encyclopedia of Food Science and Nutrition, *Academic Press*, London 2462-2472.
- Daniel. J.A., Krishnamurthi, R., Rizvi, S.S.H., 1985. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection 48*, 532-537.
- Daugaard, S.B., Adler-Nissen, J., Carstensen, J.M., 2010. New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat. *Food Control 21*, 626-632.
- Davies A.R., 1997. Modified atmosphere packaging of fish and fish products. In: Hall, G.M. (ed.) Fish processing technology. 2nd edition, *Blackie Academic & Professional*, London, 200-223.
- DeWitt, C. A. M., Oliveira, A., 2016. Modified atmosphere systems and shelf life extension of fish and fishery products. *Foods 5*, 48-75.
- Dissing, B.S., Papadopoulou, O.S., Tassou, C., Ersboll, B.K., Carstensen, J.M., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2013. Using multispectral imaging for spoilage detection of pork meat. *Food Bioprocess Technology* 6, 2268-2279.
- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J.E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal* of Food Microbiology 157, 130-141.
- Drosinos E.H., Board R.G., 1994. Metabolic activities of Pseudomonads in batch cultures in extract of minced lamb. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 613-620.
- Drosinos E.H., Nychas G.-J.E., 1996. Brochothrix thermosphacta a dominant organism in Mediterranean fresh fish (Sparus aurata) stored under modified atmosphere. Italian Journal of Food Science 4, 323-330.
- Drosinos, E.H., Nychas, G.-J.E., 1997. Production of acetate and lactate in relation to glucose content during modified atmosphere storage of gilt-head seabream (*Sparus aurata*) at 0 ± 1 °C. *Food Research International 30*, 711-717.
- Ellis, D.I., Goodacre, R., 2001. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science and Technology* 12, 414-424.

- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F., 2006. Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4663-4671.
- Estelles-Lopez, L., Ropodi, A., Pavlidis, D., Fotopoulou, J., Gkousari, C., Peyrodie, A., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., Mohareb, F., 2017. An automated ranking platform for machine learning regression models for meat spoilage prediction using multispectral imaging and metabolic profiling. *Food Research International 99*, 206-215.
- FAO, 1986. Fisheries Technical Papers-T142. The production of fish meal and oil. Fisheries Industries Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <u>http://www.fao.org/3/X6899E/X6899E00.htm</u> [ανάκτηση 12/10/2020].
- Farber J.M., 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology - A review. Journal of Food Protection 54, 58-70.
- Fengou, L.-C., Lianou, A., Tsakanikas ,P., Gkana, E., Panagou, E.Z., Nychas G.-J.E., 2019. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy and multispectral imaging as means of estimating the microbiological spoilage of farmed sea bream. *Food Microbiology 79*, 27-34.
- Finne G., 1982. Modified and controlled atmosphere storage of muscle foods. Food Technology 36, 128-133.
- Frankel, E.N., 1985. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. Progress in Lipid Research 23, 197-221.
- Fraser O., Sumar S., 1998. Compositional changes and spoilage in fish. Nutrition and Food Science 5, 275-279.
- Gallart-Jornet L., Rustad T., Barat J.M., Fito P., Escriche I., 2007. Effect of superchilled storage on the freshness and salting behavior of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Food Chemistry 103*, 1268-1281.
- Gardner, G.A., 1981. Brochothrix thermosphacta (Microbacterium thermosphactum) in the spoilage of meats: A review. In: Roberts T.A., Hobbs G., Christian J.H.B., Skovgaard N. (ed.), Psychotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity, Academic Press, London, 211-223.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Budge, S., Brooks, M.S., 2010. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: Review. *American Journal of Applied Sciences 7*, 859-877.
- Cheng C.-M., Doyle M.P., Luchansky J.B., 1995. Identification of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from raw pork and chicken that produce siderophores antagonistic towards foodborne pathogens. *Journal of Food Protection 58*, 1340-1344.
- Gibson A.M., Bratchell N., Roberts T.A., 1988. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology 6*, 155-178.
- Goulas, A.E., Kontominas, M.G., 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (Sparus aurata): biochemical and sensory attributes. Food Chemistry 100, 287-296.
- Gucoglu, N., 2020. Innovations in seafood packaging technologies: A review. Food Reviews International.

- Gram, L., Trolle, G., Huss, H.H, 1987. Detection of spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 4, 65-72.
- Gram, L., Wedell-Neegaard, C., Huss, H.H., 1990. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victoria Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology 10*, 303-316.
- Gram L., Fonnesbech Vogel B., 2000. Shewanella. In: R. Robinson, C. Batt, and P. Patel (ed.), Encyclopedia of food microbiology. *Academic Press*, Inc., San Diego, Calif. 2008-2015
- Gram L., Huss H.H., 2000. Fresh and processed fish and shellfish. In: The Microbiological Safety and Quality of Foods, Lund, B.M., A.C. Baird-Parker and G.W. Gould (ed.). Chapman and Hall, London. 472-506
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology 13, 262-266.
- Grigorakis K., Taylor K.D.A., Alexis M.N., 2003. Seasonal patterns of spoilage of icestored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry 81*, 263-268.
- Gregersen, Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology 33, 121-137.
- Gucoglu, N., 2020. Innovations in seafood packaging technologies: A review. Food Reviews International.
- ✤ Haaland H., Njaa L.R., 1988. Ammonia (NH₃) and total volatile nitrogen (TVN) in preserved and unpreserved stored, whole fish. *Journal of The Science of Food and Agriculture 44*, 335.
- Hansen T.L., Gill T., Rontved S.D., Huss H.H., 1996. Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International 29*, 181-186.
- Hassoun, A., Karoui, R., 2017. Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and non destructive instrumental methods: advantages and limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57*, 1976-1998.
- Huis in't Veld H.J.J., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. International Journal of Food Microbiology 33, 1-18.
- Huis in't Veld J.H.J., Mulder R.W.A.W., Snijders, J.M.A., 1994. Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of meat: monitoring and control. *Meat Science 36*, 123-154.
- Hultin, H.O., 1994. Oxidation of lipids in seafoods. In: Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality, Shahidi, F. and J.R. Botta (ed.), first ed., *Blackie* Academic and Professional, London, UK. 49-74.
- Huss H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper 348. Technological Laboratory, Ministry of Agriculture and Fisheries, Denmark. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Hussain, A.M., Ehlerman, D., Diehl. J.F., 1976. Effect of radurization on microbial flora of vacuum-packaged trout (*Salmo gairdneri*). Arch. Lebensmittelhyg. 27, 223-225.
- Jorgensen B.R., Gibson D.M., Huss H.H., 1988. Microbiological quality and shelf-life prediction of chilled fish. International Journal of Food Microbiology 6, 295-307.

- Karoui, R., Mouazen, E., Dufour, E., Pillonel, L., Schaller, E., Baerdemaeker, J., Bosset, J.-O., 2005. Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *International Dairy Journal 16*, 1211-1217.
- Kawai, T., 1996. Fish flavor. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 36, 257-298.
- Khayat, A., Schwall D., 1983. Lipid oxidation in seafood. Food Technology 37, 130-140.
- King, F.J., Anderson M.L., Steinberg M.A., 1962. Reaction of cod actomyosin with linoleic and linolenic acids. *Journal of Food Science 27*, 363-366.
- King, A., Nagel, C., 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Food Science 27*, 362-366.
- Koutsoumanis, K., Nychas, G-J.E., 1999. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean Boque (Boops boops) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10 °C. Applied Environmental Microbiology 65, 698-706.
- Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E., 2000. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology 60*, 171-184.
- Koutsoumanis, K.P., Stamatiou A.P., Drosinos E.H., Nychas G.-J.E., 2008. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology 25*, 915-921.
- Kyrana, V.R., Lougovois, V.P., Valsamis, D.S., 1997. Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal* of Food Science and Technology 32, 339-347.
- Laine M.H., Karwoski M.T., Raaska L.B., Mattila-Sandholm T.-M., 1996. Antimicrobial activity of *Pseudomonas spp*. against food poisoning bacteria and moulds. *Letters in applied microbiology* 22,214-218.
- Leisner, J.J., Millan, J.C., Huss, H.H., Larsen, C.M., 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged sugarsalted fish. *Journal of Applied Bacteriology 76*, 417-423.
- Leisner J.J., Gram L., 1999. Spoilage of fish. Encyclopedia of Food Microbiology, ed. by Robinson RK, Batt CA and Patel PD. Academic Press, San Diego, CA. 813-820.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M., 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology 6*, 41-46.
- Lilly, T., Kautter, D., 1990. Outgrowth of naturally occurring *Clostridium botulinum* in vacuum-packaged fresh fish. *Journal Association of Official Analytical Chemists*.
- Liston, J., 1960. The bacterial flora of fish caught in the Pacific. Journal of Applied Bacteriology 23, 469-470.
- Liston, J., 1980. Microbiology in fishery science. In: Connel, J.J., Ed., Advances in Fishery Science and Technology, *Fishing New Books*, Farnham, 138-157.
- Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2002. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture 82*, 873–880.

- McClure, P.J., Blackburn, C, Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, J.D., Ogden, I.D., Peck, K.M.W., Roberts, T.A., Sutherland, J.P. Walker, S.J., 1994b. Modeling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. *Journal of Food Microbiology 34*, 265-275.
- McDonald Karl, Sun Da-Wen, 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. International Journal of Food Microbiology 52, 1-27.
- McMillin, K. W., 2008. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science 80*, 43-65.
- Mehmood, T., Liland, K.H., Snipen, L., Sæbø, S., 2012. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 118*, 62-69.
- Miller A., Scanlan R.A., Lee J.S., Libbey L.M., 1973. Volatile compounds produced in ground muscle tissue of canary rockfish (*Sebastes pinniger*) stored on ice. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada 29*, 1125-1129.
- Nagarajarao, R.C., 2016. Recent advances in processing and packaging of fishery products: A review. Aquatic Procedia.
- Nychas, G.-J.E., Arkoudelos J.S., 1991. The influence of *Brochothrix thermosphacta* on the quality of minced meat. *Agricultural Research 15*, 103-115.
- Nychas, G.-J.E., Drosinos, E.H., Board, R.G., 1998. Chemical changes in stored meat, Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Nychas, G.-J.E., Marshall, D.L., Sofos, J.N., 2007. Food microbiology: fundamentals and frontiers. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (ed.), Meat, Poultry and Seafood, third ed. ASM Press, Washington, DC, 105-140.
- Nychas, G.-J.E., Skandamis, P.N., Tassou N., Chrysoula C., Koutsoumanis, K. P. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science 78*, 77-89.
- Panagou, E.Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J.M., Nychas, G.-J.E., 2014. Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International journal* of food microbiology 174, 1-11.
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., F.F., 2003. Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology 20*, 411-420.
- Parry, R., 1993. Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods. Springer US, 1-18.
- Parlapani, F.F., Mallouchos, A., Haroutounian, S.A., Boziaris, I.S., 2014. Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189, 153-163.
- Parlapani, F.F., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E., Boziaris, I.S., 2015. Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C. Food Microbiology 50, 44-53.
- Parlapani, F.F., Boziaris, I.S., 2016. Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea

bream stored at various temperatures. LWT - *Food Science and Technology 66,* 553-559.

- Pastoriza L., Sampedro G., Herrera J.R., Cabo M.L., 1996. Effect of modified atmosphere packaging on shelf-life of iced fresh hake slices. *Journal of the Science of Food Agriculture 71*, 541-547.
- Perkins, W.D., 1986. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. Part 1. Instrumentation. Topics in Chemical Instrumentation. Ed. Frank A. Settle, Jr. Journal of Chemical Education 63, A5-A10.
- Pruit, K.M., DeMuth, R.E., Turner, M.E., 1979. Practical application of generic growth theory and the significance of the growth curve parameters. *Growth* 43, 19-35.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Applied Bacteriology* 154, 1222-1226.
- Romia, M.B., Bernardez, M.A., 2009. Multivariate Calibration of Quantitative Analysis. In: Sun D.W. (ed.) Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Oxford: *Elsevier Inc*.
- Ropodi, A., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2013. Assessment of microbiological quality and authenticity of minced meat using multispectral image analysis. In: 8th International Conference on Predictive Modelling in Food, Paris, France, 16-19 September 2013.
- Ropodi, A.I., Pavlidis, D.E., Mohareb, F., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2015. Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. *Food Research International 67*, 12-18.
- Ropodi, A.I., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2016. Data mining derived from food analyses using non-invasive/ non-destructive analytical techniques; determination of food authenticity, quality & safety in tandem with computer science disciplines. *Trends in Food Science and Technology 50*, 11-25.
- Ropodi, A.I., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2018. Rapid detection of frozen-thenthawed minced beef using multispectral imaging and Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat Science 135*, 142-147.
- Ruiz-Capillas, C., Moral A., 2001. Residual effect of CO₂ on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology* 212, 413-420.
- Saraiva, C., Vasconcelos, H., de Almeida, J.M.M.M., 2017. A chemometrics approach applied to Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for monitoring the spoilage of fresh salmon (*Salmo salar*) stored under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology 241*, 331-339.
- Shewan, J.M., Hobbs, G., Hodgkiss, W., 1960. The Pseudomonas and Achromobacter groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *Journal of Applied Bacteriology*.
- Shewan J.M., 1962. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. *Recent Advances in Food Science 1*, 167-193.
- Shewan, J. M., 1971. The microbiology of fish and fishery products a progress report. *Journal of Applied Bacteriology*.

- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T., 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 107-127.
- Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology 91*, 1011-1022.
- Socrates, G., 2001. Infrared and Raman characteristic group frequencies, third ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Sone, I., Olsen, R.L., Dahl, R., Heia, K., 2011. Visible/ near-infrared spectroscopy detects autolytic changes during storage of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal* of Food Science 76, S203-S209.
- Stanborough T., Fegan N., Powell S. M., Tamplin M., Chandry P. S., 2017. Insight into the genome of *Brochothrix thermosphacta*, a problematic meat spoilage bacterium. *Applied and Environmental Microbiology 83*.
- Theophanides T., 2002. Introduction to infrared spectroscopy. Infrared Spectroscopy. *Materials Science, Engineering and Technology*. (ed.), InTech, 1-10 <u>https://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-and-technology/introduction-to-infrared-spectroscopy</u> [ανάκτηση 26/11/2020].
- Tryfinopoulou, P., Drosinos, E.H., Nychas, G.-J.E., 2001. Performance of Pseudomonas CFC-selective medium in the fish storage ecosystems. *Journal of Microbiological Methods* 47, 243-247.
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J.E., 2002. Characterization of *Pseudomonas spp.* associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology 68*, 65-72.
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Vancanneyt, M., Hoste, B., Swings, J., Nychas, G.-J.E., 2007. Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. *Journal of Applied Microbiology* 103, 711-721.
- Truelstrup Hansen, L., Gill, T., Huss, H.H., 1995. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International 28*, 123-130.
- Truelstrup Hansen, L., Gill, T., Drewes Røntved, S., Huss, H.H., 1996. Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International 29*, 181-188.
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Nychas, G.-J.E., 2015. High throughput multispectral image processing with applications in food science. Plos One DOI 10.1371/ journal. pone. 0140122.
- Tsironi T., Gogou E., Velliou E., Taoukis P.S., 2008. Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) on shelf life optimization of vacuum packed chilled tuna. *International Journal of Food Microbiology 128*, 108-115.
- Wold, S., Sjostrom, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58,109-130.
- Wolfe, S., 1980. Use of CO and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish and produce. *Food Technology 34*, 55-58, 63.

- Yorkowski M., Brockerhoft H., 1965. Lyso lecthinase of cod muscle. Journal of Fish Research, 22, 643-652.
- Young, L.L., Reviere, R.D., Cole, A.B., 1988. Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres. *Food Technology* 42, 65-69.
- Zwietering, M.H., Jongenburg, I., Rombouts, F.M. and Van'T Reit, K. 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology 56*, 1875-1881.
- Wold, S., Sjostrom, M., Eriksson, L., 2001. PLS regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 58*, 109-130.
- Γεωργάκης Σ., Βαρελτζής Κ., Αμβροσιάδης Ι., 2000. Τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης (εκτός γάλακτος και των προϊόντων του). Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών Άρθρα 92 & 93.
- Παπαϊωάννου Δ., 1990. Τεχνολογία & ποιοτικός έλεγχος αλιευμάτων, Τόμος Α'. Εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα.
- Χώτος Γ., Ρογδάκης Ι., 1992. Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών Λαυράκι και Τσιπούρα (Τεχνικές της αναπαραγωγής και της πάχυνσης, Εκδόσεις ΊΩΝ.
- http://species-identification.org/
- https://videometer.com/
- https://www.camo.com/
- https://www.combase.cc/index.php/en/
- http://www.fao.org/fishery/resources/en
- http://www.fao.org/fishery/statistics/en
- http://www.fao.org/fishery/species/search/en
- https://www.jasco-global.com/
- https://www.statgraphics.com/

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Αποτελέσματα από την εφαρμογή Γενικών Γραμμικών Μοντέλων και ΜΑΝΟVΑ στα δεδομένα από τις μικροβιολογικές αναλύσεις και το pH. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Statgraphics.

General Linear Models

Number of dependent variables: 10 Number of categorical factors: 3 A=Species B=Package C=Temperature Number of quantitative factors: 1 D=Time

Analysis of Variance for TVC

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	291.002	9	32.3336	23.60	0.0000
Residual	184.968	135	1.37013		
Total (Corr.)	475.97	144			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	4.66861	1	4.66861	3.41	0.0671
Package	55.5318	1	55.5318	40.53	0.0000
Temperature	75.4818	3	25.1606	18.36	0.0000
Time	261.11	1	261.11	190.57	0.0000
Package*Temperature	43.9766	3	14.6589	10.70	0.0000
Residual	184.968	135	1.37013		
Total (corrected)	475.97	144			

R-Squared = 61.1388 percent R-Squared (adjusted for d.f.) = 58.548 percent Standard Error of Est. = 1.17053Mean absolute error = 0.943963Durbin-Watson statistic = 1.70793 (P=0.0000)

Analysis of Variance for Pseudomonas spp.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	255.302	9	28.3669	20.08	0.0000
Residual	190.726	135	1.41278		
Total (Corr.)	446.028	144			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	3.50085	1	3.50085	2.48	0.1178
Package	52.1363	1	52.1363	36.90	0.0000
Temperature	71.3222	3	23.7741	16.83	0.0000
Time	222.043	1	222.043	157.17	0.0000
Package*Temperature	44.4495	3	14.8165	10.49	0.0000
Residual	190.726	135	1.41278		
Total (corrected)	446.028	144			

R-Squared = 57.239 percent

R-Squared (adjusted for d.f.) = 54.3883 percent Standard Error of Est. = 1.18861Mean absolute error = 0.956852Durbin-Watson statistic = 1.72578 (P=0.0494)

Analysis of Variance for Shewanella spp.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	356.029	9	39.5588	25.47	0.0000
Residual	209.712	135	1.55342		
Total (Corr.)	565.742	144			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	15.7007	1	15.7007	10.11	0.0018
Package	12.0412	1	12.0412	7.75	0.0061
Temperature	87.2833	3	29.0944	18.73	0.0000
Time	294.41	1	294.41	189.52	0.0000
Package*Temperature	35.1805	3	11.7268	7.55	0.0001
Residual	209.712	135	1.55342		
Total (corrected)	565.742	144			

 $\begin{array}{l} \text{R-Squared} = 62.9314 \text{ percent} \\ \text{R-Squared (adjusted for d.f.)} = 60.4602 \text{ percent} \\ \text{Standard Error of Est.} = 1.24636 \\ \text{Mean absolute error} = 1.0017 \\ \text{Durbin-Watson statistic} = 1.78104 (P=0.0942) \end{array}$

Analysis of Variance for Enterobacteriaceae

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	387.013	9	43.0014	31.31	0.0000
Residual	185.402	135	1.37334		
Total (Corr.)	572.414	144			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	18.9635	1	18.9635	13.81	0.0003
Package	0.407726	1	0.407726	0.30	0.5867
Temperature	163.871	3	54.6235	39.77	0.0000
Time	255.052	1	255.052	185.72	0.0000
Package*Temperature	51.6904	3	17.2301	12.55	0.0000
Residual	185.402	135	1.37334		
Total (corrected)	572.414	144			

 $\begin{array}{l} R-Squared = 67.6106 \ percent\\ R-Squared (adjusted for d.f.) = 65.4513 \ percent\\ Standard Error of Est. = 1.1719\\ Mean absolute error = 0.895641\\ Durbin-Watson statistic = 1.82287 \ (P=0.1439) \end{array}$

Analysis of Variance for Brochothrix thermosphacta

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	338.148	9	37.572	33.23	0.0000
Residual	152.618	135	1.1305		
Total (Corr.)	490.766	144			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	25.3545	1	25.3545	22.43	0.0000
Package	7.9456	1	7.9456	7.03	0.0090
Temperature	83.9071	3	27.969	24.74	0.0000
Time	269.038	1	269.038	237.98	0.0000
Package*Temperature	28.5707	3	9.52358	8.42	0.0000
Residual	152.618	135	1.1305		
Total (corrected)	490.766	144			

 $\begin{array}{l} R-Squared = 68.9022 \ percent\\ R-Squared (adjusted for d.f.) = 66.829 \ percent\\ Standard Error of Est. = 1.06325\\ Mean absolute error = 0.850635\\ Durbin-Watson statistic = 1.656 (P=0.0190) \end{array}$

Analysis of Variance for LAB

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	260.008	9	28.8897	39.75	0.0000
Residual	98.1193	135	0.72681		
Total (Corr.)	358.127	144			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	14.235	1	14.235	19.59	0.0000
Package	15.0919	1	15.0919	20.76	0.0000
Temperature	61.1148	3	20.3716	28.03	0.0000
Time	123.622	1	123.622	170.09	0.0000
Package*Temperature	23.3665	3	7.78884	10.72	0.0000
Residual	98.1193	135	0.72681		
Total (corrected)	358.127	144			

 $\begin{array}{l} \text{R-Squared} = 72.6021 \text{ percent} \\ \text{R-Squared (adjusted for d.f.)} = 70.7756 \text{ percent} \\ \text{Standard Error of Est.} = 0.852531 \\ \text{Mean absolute error} = 0.631214 \\ \text{Durbin-Watson statistic} = 1.90193 (P=0.2783) \end{array}$

Analysis of Variance for Yeasts

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	165.371	9	18.3745	19.08	0.0000
Residual	129.985	135	0.962849		
Total (Corr.)	295.355	144			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	7.32957	1	7.32957	7.61	0.0066
Package	0.0213563	1	0.0213563	0.02	0.8818
Temperature	32.1623	3	10.7208	11.13	0.0000
Time	110.118	1	110.118	114.37	0.0000
Package*Temperature	31.0147	3	10.3382	10.74	0.0000
Residual	129.985	135	0.962849		
Total (corrected)	295.355	144			

 $\begin{array}{l} R-Squared = 55.9904 \ percent\\ R-Squared (adjusted for d.f.) = 53.0564 \ percent\\ Standard Error of Est. = 0.981249\\ Mean absolute error = 0.736038\\ Durbin-Watson statistic = 2.11024 \ (P=0.7456) \end{array}$

Analysis of Variance for pH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1.37893	9	0.153215	3.89	0.0002
Residual	5.31356	135	0.0393597		
Total (Corr.)	6.6925	144			

Type III Sums of Squares

V 1 1					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Species	0.847935	1	0.847935	21.54	0.0000
Package	0.0331714	1	0.0331714	0.84	0.3602
Temperature	0.0610506	3	0.0203502	0.52	0.6712
Time	0.143509	1	0.143509	3.65	0.0583
Package*Temperature	0.180209	3	0.0600696	1.53	0.2106
Residual	5.31356	135	0.0393597		
Total (corrected)	6.6925	144			

 $\begin{array}{l} R-Squared = 20.6042 \ percent \\ R-Squared (adjusted for d.f.) = 15.3111 \ percent \\ Standard Error of Est. = 0.198393 \\ Mean absolute error = 0.153274 \\ Durbin-Watson statistic = 2.0774 \ (P=0.6786) \\ Durbin-Watson statistic = 2.06429 \ (P=0.6474) \end{array}$

MANOVA for A

Wilks' lambda = 0.44218 F = 20.1844 P-value = 4.44089E-16Pillai trace = 0.55782 F = 20.1844 P-value = 4.44089E-16Hotelling-Lawley trace = 1.26152 F = 20.1844 P-value = 4.44089E-16Roy's greatest root = 1.26152 s = 1 m = 3.0 n = 63.0

MANOVA for B

Wilks' lambda = 0.29492 F = 38.252 P-value = 2.22045E-16Pillai trace = 0.70508 F = 38.252 P-value = 2.22045E-16Hotelling-Lawley trace = 2.39075 F = 38.252 P-value = 2.22045E-16Roy's greatest root = 2.39075 s = 1 m = 3.0 n = 63.0

MANOVA for C

Wilks' lambda = 0.414352 F = 5.49958 P-value = 4.75175E-14Pillai trace = 0.641177 F = 4.41709 P-value = 1.24906E-10Hotelling-Lawley trace = 1.28162 F = 6.76409 P-value = 1.44329E-15Roy's greatest root = 1.17276 s = 3 m = 2.0 n = 63.0

MANOVA for D

Wilks' lambda = 0.326352 F = 33.0269 P-value = 3.33067E-16Pillai trace = 0.673648 F = 33.0269 P-value = 3.33067E-16Hotelling-Lawley trace = 2.06418 F = 33.0269 P-value = 3.33067E-16Roy's greatest root = 2.06418 s = 1 m = 3.0 n = 63.0

MANOVA for B*C

Wilks' lambda = 0.610044 F = 2.87842 P-value = 0.0000113749Pillai trace = 0.443409 F = 2.81836 P-value = 0.0000164692Hotelling-Lawley trace = 0.554793 F = 2.92807 P-value = 0.00000780475Roy's greatest root = 0.347256 s = 3 m = 2.0 n = 63.0



Εικόνα 1 Η αλληλεπίδραση της συσκευασίας με τη θερμοκρασία και η επίδρασή της στα μικροβιολογικά δεδομένα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Αποτελέσματα από την εφαρμογή One Way Analysis of Variance στον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης των δειγμάτων (rate) για όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών, με το πρόγραμμα Statgraphics.

One-Way ANOVA - Rate by Sample Dependent variable: Rate

Factor: Sample

Number of observations: 215 Number of levels: 109

ANOVA Table for Rate by Sample

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.166	108	0.00153	56.64	0.0000
Within groups	0.00287	106	0.0000271		
Total (Corr.)	0.168	214			

Multiple Range Tests for Rate by Sample

Method: 95.0 percent Bonferroni

Sample	Count	Mean	Homogeneous Groups
SM0Y	2	0.00405	X
DM0Y	2	0.00536	XX
SM0L	2	0.00567	XX
SA0L	2	0.00572	XX
DM0L	2	0.00573	XX
DM0S	2	0.00642	XX
DA0L	2	0.00649	XX
DM0P	2	0.00707	XXX
DM4Y	2	0.00715	XXXX
SM4Y	2	0.00731	XXXX
DM0TVC	2	0.0077	XXXX
SM4L	2	0.00827	XXXXX
SM0P	2	0.00856	XXXXX
DM0BR	2	0.00866	XXXXX
SA0Y	1	0.00894	XXXXXXXXX
DM4P	2	0.0094	XXXXXX
SM0TVC	2	0.00942	XXXXXX
SA0E	2	0.00972	XXXXXXX
DA0E	2	0.0105	XXXXXXX
SA4L	2	0.0108	XXXXXXXX
DM4TVC	2	0.0109	XXXXXXXX
DM8L	2	0.0109	XXXXXXXX
SM4P	2	0.0116	XXXXXXXX
DM0E	2	0.012	XXXXXXXXX
SM4E	2	0.0122	XXXXXXXXX
SM4TVC	2	0.0123	XXXXXXXXX
DM4L	2	0.0135	XXXXXXXXXX
SM4BR	2	0.0138	XXXXXXXXXX
SA0BR	2	0.0143	XXXXXXXXXX
SM0S	2	0.0143	XXXXXXXXXX
DM4BR	2	0.0147	XXXXXXXXXX
DM8Y	2	0.0148	XXXXXXXXXX
DA4L	2	0.0151	XXXXXXXXXX
SM0E	2	0.0152	XXXXXXXXXX
SM0BR	2	0.0156	XXXXXXXXXX
DA4Y	2	0.0165	XXXXXXXXXXX
SM8BR	2	0.0166	XXXXXXXXXXX
SM8P	2	0.017	XXXXXXXXXXXX
SA0S	2	0.0178	XXXXXXXXXXXXX
DA0BR	2	0.0183	XXXXXXXXXXXXXX
DA0Y	2	0.0188	XXXXXXXXXXXXX
DA0S	2	0.019	XXXXXXXXXXXXX
DM8BR	2	0.019	XXXXXXXXXXXXXX
DA0P	2	0.0195	XXXXXXXXXXXXXXX
SM4S	2	0.02	XXXXXXXXXXXXXX
DM8P	2	0.0206	XXXXXXXXXXXXXXX
DM4E	2	0.0207	XXXXXXXXXXXXXXX

SA4BR	2	0.0207	XXXXXXXXXXXXXXX
SM12BR	2	0.022	XXXXXXXXXXXXXXX
DA8Y	2	0.0229	XXXXXXXXXXXXXXX
DM12L	2	0.023	XXXXXXXXXXXXXXX
DM4S	2	0.0236	XXXXXXXXXXXXXXXX
DM8TVC	2	0.0239	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
SM8TVC	2	0.0241	*****
DA0TVC	2	0.0242	*****
SA8L	2	0.0243	*****
SM12L	2	0.0248	*****
SM8L	2	0.0268	*****
SM8Y	2	0.0268	****
SA4E	2	0.0285	*****
DA8L	2	0.0309	*****
SA0TVC	2	0.0309	*****
DM12BR	2	0.031	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
SM12Y	1	0.031	*****
SA12Y	1	0.0313	*****
DA4BR	2	0.0314	*****
DM8E	2	0.0322	*****
DA4E	2	0.0333	****
SM8S	2	0.034	*****
SM8E	2	0.0341	****
DM8S	2	0.0351	****
SA8BR	2	0.0361	XXXXXXXXXXXXXXXXXX
DA12Y	2	0.0376	XXXXXXXXXXXXXXXXX
DA4P	2	0.0408	*****
DA4S	2	0.0414	XXXXXXXXXXXXXXXX
DA12L	2	0.0414	XXXXXXXXXXXXXXX
DA4TVC	2	0.0424	XXXXXXXXXXXXXXX
SAOP	2	0.0436	*****
SM12P	2	0.0472	XXXXXXXXXXXXXX
SA4P	2	0.0473	XXXXXXXXXXXXXXX
SA12L	2	0.0475	XXXXXXXXXXXXXX
DM12S	2	0.0481	XXXXXXXXXXXX
DM12P	2	0.0486	XXXXXXXXXXX
SM12TVC	2	0.0487	XXXXXXXXXX
SA8E	2	0.0496	XXXXXXXXX
DA8BR	2	0.0504	XXXXXXXXX
DM12TVC	2	0.052	XXXXXXXX
DA8E	2	0.0522	XXXXXXXX
SA4TVC	2	0.0538	XXXXXXX
SA4S	2	0.0557	XXXXXXX
DM12E	2	0.0574	XXXXXX
SA8TVC	2	0.0626	XXXXXX
SM12S	2	0.0628	XXXXXX
DA8P	2	0.0664	XXXXXX
SA8P	2	0.0665	XXXXXX
SM12E	2	0.0668	XXXXX
DA8TVC	2	0.0681	XXXX
SA12E	2	0.0786	XXXX
SA12BR	2	0.079	XXXX
DA12BR	2	0.083	XXX
DA12E	2	0.0838	XXX
SA12P	2	0.085	XXX
DA8S	2	0.0862	XXX
SA12TVC	2	0.0872	XX
DA12P	2	0.0992	XX
DA12TVC	2	0.103	XX
SA8S	2	0.113	XX
DA12S	2	0.12	XX
SA12S	2	0.129	Х

Επεξήγηση συμβολισμών

1° ψηφίο: είδος ψαριού (S = τσιπούρα, D = λαβράκι)

2° ψηφίο: συσκευασία συντήρησης (Α = αέρας, Μ = ΜΑΡ)

3° ψηφίο: θερμοκρασία συντήρησης (0, 4, 8, 12 °C)

 4° ψηφίο: κατηγορία μικροοργανισμού (TVC = ολική μικροβιακή χλωρίδα, P = Pseudomonas spp., S = Shewanella spp., E = Enterobacteriaceae, B = Brochothrix thermosphacta, L = γαλακτικά βακτήρια, Y = ζύμες)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ





8°C



Σχήμα 1 Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης, σε κλίμακα 0-5, ως προς την οσμή (▲) και το χρώμα (■), των φιλέτων τσιπούρας που συσκευάστηκαν σε αέρα και συντηρήθηκαν στους 0, 4, 8 και 12 °C. Με το βέλος (+) υποδεικνύεται το χρονικό σημείο όπου η ΟΜΧ ξεπερνάει τους 7 log CFU/g.







Σχήμα 2 Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης,σε κλίμακα 0-5, ως προς την οσμή (▲) και το χρώμα (■), των φιλέτων τσιπούρας που συσκευάστηκαν σε MAP και συντηρήθηκαν στους 0, 4, 8 και 12 °C. Με το βέλος (↔) υποδεικνύεται το χρονικό σημείο όπου η OMX ξεπερνάει τους 7 log CFU/g.

104







Σχήμα 3 Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης,σε κλίμακα 0-5, ως προς την οσμή (▲) και το χρώμα (■), των φιλέτων λαβρακιού που συσκευάστηκαν σε αέρα και συντηρήθηκαν στους 0, 4, 8 και 12 °C. Με το βέλος (→) υποδεικνύεται το χρονικό σημείο όπου η ΟΜΧ ξεπερνάει τους 7 log CFU/g.





4°C



Σχήμα 4 Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης,σε κλίμακα 0-5, ως προς την οσμή (▲) και το χρώμα (■), των φιλέτων λαβρακιού που συσκευάστηκαν σε ΜΑΡ και συντηρήθηκαν στους 0, 4, 8 και 12 °C. Με το βέλος (★) υποδεικνύεται το χρονικό σημείο όπου η ΟΜΧ ξεπερνάει τους 7 log CFU/g.

106