



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
I) ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
II) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή

Εφαρμογή των σύγχρονων μη επεμβατικών μεθόδων, FTIR, Videometer, Fresh Detect και E-nose, στην εκτίμηση της ποιότητας των ιχθύων και της νοθείας στα προϊόντα τους

Δήμητρα Ι. Τσολιάκου

Επιβλέπων καθηγητής:

Γιώργος – Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Εφαρμογή των σύγχρονων, μη επεμβατικών μεθόδων, FTIR, Videometer, Fresh Detect και E-nose, στην εκτίμηση της ποιότητας των ιχθύων και της νοθείας στα προϊόντα τους

“Application of contemporary, non-invasive methods, FTIR, Videometer, Fresh Detect and E-nose, in assessing the quality of fish and the adulteration in their products”

Δήμητρα Ι. Τσολιάκου

Εξεταστική Επιτροπή:

Γιώργος – Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Εφαρμογή των σύγχρονων μη επεμβατικών μεθόδων, FTIR, Videometer, Fresh Detect και E-nose, στην εκτίμηση της ποιότητας των ιχθύων και της νοθείας στα προϊόντα τους

ΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιχθύες είναι ένα ευαλλοίωτο τρόφιμο που χαρακτηρίζεται από σύντομη διάρκεια ζωής. Η αλλοίωση, συχνά, επιταχύνεται λόγω λανθασμένων πρακτικών, όπως είναι η μη τήρηση της ψυκτικής αλυσίδας κατά τον χειρισμό, την επεξεργασία και την συντήρηση των ιχθύων μετά τη αλίευση. Εκτός από την αλλοίωση, η ποιότητα ενός προϊόντος ιχθύος υποβαθμίζεται με δόλιες πρακτικές, όπως είναι η σκόπιμη προσθήκη ή υποκατάσταση ενός είδους με ένα φθηνότερο, μη-αναγραφόμενο είδος. Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή ταχέων, μη επεμβατικών μεθόδων για την εκτίμηση της μικροβιακής αλλοίωσης των ιχθύων υπό μεταβαλλόμενα θερμοκρασιακά προγράμματα και της νοθείας σε μπιφτέκια ιχθύων.

Κατά το πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας, διεξήχθησαν δύο ανεξάρτητα πειράματα αλλοίωσης σε δείγματα τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) ιχθυοτροφείου σε τρία διαφορετικά θερμοκρασιακά προγράμματα (διακύμανση μεταξύ 2 - 15 °C). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ολόκληροι ιχθύες και φιλέτα ιχθύων που συντηρήθηκαν στον αέρα καθώς και φιλέτα ιχθύων υπό τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασία (MAP, CO₂:O₂:N₂ 28,4:0,3:71,3 και 25,7:0,6:73,7 % v/v για τσιπούρα και λαβράκι, αντίστοιχα). Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ανά 24 ώρες και οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων. Ακόμη, τα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού αναλύθηκαν με τις μεθόδους Πολυφασματική Απεικόνιση (MSI), Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και την Ηλεκτρονική μύτη (Enose). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μεθόδους αξιοποιήθηκαν για την δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης της μικροβιακής αλλοίωσης με γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) και τη διακριτική ανάλυση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Κατά το δεύτερο μέρος του πειράματος, παρασκευάστηκαν μπιφτέκια από σάρκα τσιπούρας και παγκάσιους (*Pangasius hypophthalmus*), δημιουργώντας 7 κατηγορίες νοθευμένων μπιφτεκιών τσιπούρας από παγκάσιους σε διάφορες αναλογίες (0, 10, 20, 30, 40, 50 and 100 % (w/w) νοθεία). Τα δείγματα παρασκευάζονταν φρέσκα σε δύο επαναλήψεις πριν την εφαρμογή των μεθόδων MSI, FTIR και της φασματοσκοπίας φθορισμού (Fresh Detect). Η μέθοδος PLS-DA εφαρμόστηκε για την ταξινόμηση των φασματικών δεδομένων που πρόεκυψαν από τα δείγματα στα 7 παραπάνω επίπεδα νοθείας.

Από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα φάνηκε ότι οι επικρατέστεροι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί στα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού και στις δύο συνθήκες συντήρησης ήταν οι *Pseudomonas* spp. και τα βακτηρία που παράγουν H₂S. Η διάρκεια ζωής των φιλέτων λαβρακιού στα διάφορα θερμοκρασιακά προγράμματα που εφαρμόστηκαν, σύμφωνα με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά προσδιορίστηκε στις 6 ημέρες στον αέρα και στις 5 ημέρες υπό MAP, ενώ για τα φιλέτα τσιπούρας στις 4 ημέρες στον αέρα και στις 5 ημέρες υπό MAP. Από τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν από τα δεδομένα των MSI, FTIR και Enose καλύτερη επίδοση εμφάνισε η μέθοδος FTIR για τους ολόκληρους ιχθύες και τα φιλέτα ιχθύων στον αέρα και υπό MAP. Όσον αφορά τη νοθεία, σε αντίθεση με τη μέθοδο FTIR, τα PLS-DA μοντέλα από το MSI και το Fresh Detect έδωσαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αναγνώριση των νοθευμένων μπιφτεκιών από παγκάσιους (73,9 και 82,8 %, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αμιγώς

μπιφτέκια τσιπούρας (96,7 και 83,3 %, αντίστοιχα). Ωστόσο, τα μοντέλα αδυνατούσαν να κατηγοριοποιήσουν τα νοθευμένα μπιφτέκια στις σωστές κατηγορίες νοθείας.

Επιστημονική περιοχή: Ποιότητα προϊόντων ιχθύων

Λέξεις κλειδιά: ιχθύς, μικροβιακή αλλοίωση, νοθεία, ταχείες μέθοδοι

Application of contemporary, non-invasive methods, FTIR, Videometer, Fresh Detect and E-nose, in assessing the quality of fish and the adulteration in their products

*MSc Food Science and Technology
Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Food*

ABSTRACT

Fishes are perishable food products characterized by short shelf life. Spoilage is often accelerated due to improper practices, including non-compliance with the cold chain during handling, processing and storage of fishes after their capture. In addition to spoilage, the quality of a fish product is debased by fraudulent practices, as is the intentional addition or replacement of fish species by low-priced, undeclared species. The objective of this work was to evaluate the microbial deterioration of fishes stored under dynamic temperature profiles and the adulteration of fish burgers by using rapid, non-invasive methods.

In the first part of the experimental procedure, two independent spoilage experiments were performed on sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) samples stored in three different dynamic temperature profiles (range between 2 - 15 °C). In particular, aerobically packaged whole fishes and their fillets were used as well as fillets under modified atmosphere packaging conditions (MAP, CO₂:O₂:N₂ 28,4:0,3:71,3 and 25,7:0,6:73,7 % v/v for sea bream and sea bass, respectively). Microbiological analysis and sensory evaluation were performed every 24 hours. In parallel, samples were subjected to Multispectral imaging (MSI), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Electronic nose (Enose). The acquired data were used to create Partial Least Square – Regression (PLS-R) and Partial Least Square – Discriminant Analysis (PLS-DA) models for the prediction of microbial spoilage. In the second part, patties of sea bream and pangasius flesh (*Pangasius hypophthalmus*) were prepared, creating 7 categories of adulterated sea bream burgers in different proportions (0, 10, 20, 30, 40, 50 and 100 % (w/w) adulteration). Fresh duplicate of samples were prepared before the application of MSI, FTIR and fluorescence spectroscopy (Fresh Detect). The PLS-DA method was applied to classify the spectral data obtained from the samples into the above 7 levels of adulteration.

The microbiological results revealed that *Pseudomonas* spp. and H₂S-producing bacteria were the dominant spoilage microorganisms in the sea bream and sea bass samples in both storage conditions. Based on sensory evaluation, the shelf life of sea bass fillets stored under different temperature profiles was determined at 6 days in the air and 5 days under MAP, while for sea bream fillets in the air at 4 days and 5 days under MAP. Among the models developed by MSI, FTIR and Enose data, the FTIR method had better performed for whole fish and fish fillets in air and under MAP. Regarding adulteration, unlike FTIR method, the PLS-DA models obtained by MSI and Fresh Detect gave quite satisfactory results in the identification of adulterated burgers (73.9 and 82.8%, respectively) in relation to pure sea bream burgers (96.7 and 83.3%, respectively). However, the models were unable to categorize adulterated burgers into the corresponding adulteration categories. More data are needed to increase the sensors efficiency.

Scientific area: Quality of fish products

Keywords: fish, microbial spoilage, adulteration, rapid methods

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της μεταπτυχιακής μου εργασίας, κ. Γεώργιο - Ιωάννη Νυχά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Ευστάθιο Πανάγου, καθηγητή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για το ενδιαφέρον και τις συμβουλές του στη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Ευχαριστίες οφείλουν να δοθούν και στον κ. Χρήστο Παππά, Αναπληρωτής Καθηγητής του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, για το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη της εργασίας και τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ερευνητική ομάδας του κ. Νυχά και κυρίως την μεταδιδάκτορα Μαρία Γκόβαρη για την βοήθεια που μου προσέφερε, την υπομονή και την ανοχή σε όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως, την κ. Πασχαλίτσα Τρυφίνοπούλου, μέλος του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού του εργαστηρίου, για τις συμβουλές και τη συνεχή στήριξη κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη στην οικογένεια μου που με τη συνεχή στήριξη τους κατάφερα να ολοκληρώσω αυτό το σημαντικό κομμάτι της ζωής μου.

Με την άδεια μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Ιχθύες.....	10
1.1.1. Σημασία για την υγεία.....	10
1.1.2. Σημασία για την οικονομία.....	10
1.2. Εμφάνιση και εξέλιξη υδατοκαλλιέργειας.....	11
1.2.1. Υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα.....	11
1.2.2. Παγκόσμια Υδατοκαλλιέργεια.....	12
1.3. Βιολογικά χαρακτηριστικά ιχθύων.....	13
1.3.1. Τσιπούρα.....	13
1.3.2. Λαβράκι.....	14
1.3.3. Παγκάσιους.....	15
1.4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ιχθύων.....	16
1.5. Φαινόμενο νεκρικής ακαμψίας.....	17
1.6. Αλλοίωση ιχθύων.....	18
1.6.1. Μικροβιακή αλλοίωση.....	19
1.6.1.1. Ειδικοί αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί (SSO).....	20
1.6.1.2. Μεταβολίτες των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών των ιχθύων της Μεσογείου	20
1.6.2. Αλλοίωση μέσω ενζυμικής αυτόλυσης.....	24
1.6.3. Οξειδωτική αλλοίωση.....	25
1.7. Μέθοδοι παράτασης της διάρκειας ζωής των ιχθύων.....	26
1.7.1. Συντήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία.....	26
1.7.2. Τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασία (MAP).....	26
1.7.2.1. Μίγμα αερίων.....	26
1.7.2.2. Επίδραση της MAP συσκευασίας στην μικροβιακή αλλοίωση.....	27
1.7.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην αποτελεσματικότητα της MAP συσκευασίας.....	28
1.7.3. Νοθεία.....	29
1.7.3.1. Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας.....	29
1.8. Ταχείες μέθοδοι εκτίμησης της μικροβιακής αλλοίωσης και της ανίχνευσης της νοθείας στα προϊόντα ιχθύων.....	30
1.8.1. Μέθοδος Πολυφασματικής Απεικόνισης.....	30
1.8.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier.....	32
1.8.2.1. Φασματικές περιοχές IR.....	32

1.8.2.2. Όργανο FTIR.....	33
1.8.3. Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fresh Detect).....	35
1.8.3.1. Φθορίζουσες ουσίες.....	37
1.8.3.2. Όργανο Fresh Detect BFD 100.....	37
1.8.4. Ηλεκτρονική μύτη (E-nose).....	38
1.8.4.1. Αρχή λειτουργίας.....	39
1.9. Σκοπός μελέτης.....	40
2. Υλικά και μέθοδοι.....	41
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	41
2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων ιχθύων.....	41
2.1.2. Συνθήκες συντήρησης.....	41
2.1.3. Προετοιμασία νοθευμένων μπιφτεκιών.....	41
2.2. Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	42
2.2.1. Δειγματοληψία.....	42
2.2.2. Υπόστρωμα και επώαση.....	42
2.3. Οργανοληπτικός έλεγχος.....	43
2.4. Προσδιορισμός pH.....	44
2.5. Μέτρηση αερίων.....	44
2.6. Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	44
2.6.1. Πολυφασματική Απεικόνιση (MSI).....	44
2.6.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	45
2.6.3. Ηλεκτρονική μύτη (E-nose).....	45
2.6.4. Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fresh Detect).....	47
2.7. Στατιστική ανάλυση.....	47
2.7.1. Μοντέλα εκτίμησης της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square - Regression, PLS-R).....	47
2.7.2. Μοντέλα εκτίμησης της νοθείας και της αλλοίωσης στα προϊόντα ιχθύων με τη διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square - Discriminant Analysis, PLS-DA).....	48
3. Αποτελέσματα.....	49
3.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων.....	49
3.1.1. Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού: Δείγματα τσιπούρας.....	49
3.1.2. Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού: Δείγματα λαβρακιού.....	52
3.2. Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης.....	54
3.3. Αποτελέσματα μέτρησης pH.....	55
3.4. Αποτελέσματα μέτρησης αερίων.....	56
3.5. Αποτελέσματα φυσικοχημικών αναλύσεων.....	58
3.5.1. Συσχέτιση των φασμάτων της Πολυφασματικής Απεικόνισης (MSI) με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα.....	58

3.5.2. Συσχέτιση των φασμάτων της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα.....	63
3.5.3. Συσχέτιση των δεδομένων της Ηλεκτρονικής μύτης (E-nose) με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα.....	66
3.5.4. Αποτελέσματα νοθείας.....	69
3.5.4.1. Πολυφασματική Απεικόνιση (MSI).....	69
3.5.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	71
3.5.4.3. Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fresh Detect).....	73
4. Συζήτηση.....	75
4.1. Μικροβιολογικά αποτελέσματα.....	75
4.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	76
4.3. Αποτελέσματα pH.....	77
4.4. Εκτίμησης της μικροβιακής αλλοίωσης: MSI, FTIR, E-nose.....	78
4.5. Προσδιορισμός νοθείας: MSI, FTIR, Fresh Detect.....	79
4.6. Ανακεφαλαίωση.....	81
Βιβλιογραφία.....	83

1. Εισαγωγή

1.1. Ιχθύες

1.1.1. Σημασία για τη υγεία

Οι ιχθύες είναι μια εξαιρετική πηγή ζωικής πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας και απαραίτητων λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (LCPUFA) και μικροθρεπτικών συστατικών. Αυτά τα στοιχεία εντοπίζονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στους ιχθύες από ότι στα άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Beveridge et al., 2013). Στον γενικό πληθυσμό, η κατανάλωση ιχθύων είναι ευεργετική για την ανάπτυξη του ανθρώπου, ενώ η κατανάλωση ορισμένων ιχθύων (ειδικότερα λιπαρών ιχθύων) σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, καρδιακών παθήσεων και εγκεφαλικού (FAO-WHO, 2011). Οι άνθρωποι γενικά ενθαρρύνονται να αυξήσουν την κατανάλωση λιπαρών ιχθύων δύο έως τρεις φορές τη βδομάδα προκειμένου να λάβουν επαρκείς ποσότητες LCPUFAs (Surette, 2008, Jenkins et al., 2009, FAO-WHO, 2011). Η μελέτη των Gibson et al. (2003) έδειξε ότι τα άτομα που τρέφονταν με δίαιτες που περιείχαν σημαντικά περισσότερους ιχθύες είχαν χαμηλότερες περιπτώσεις αναιμίας και κοινών λοιμώξεων από τα άτομα που είχαν στην διατροφή τους χαμηλές ποσότητες ιχθύων.

Επίσης, οι ιχθύες συμβάλλουν καθοριστικά στην επιβίωση και την υγεία ενός σημαντικού τμήματος του παγκόσμιου πληθυσμού. Είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Σε ορισμένες από τις φτωχότερες χώρες της Ασίας (Μπαγκλαντές, Καμπότζη) οι άνθρωποι προσλαμβάνουν έως και το 75 % της ημερήσιας πρωτεΐνης τους από τους ιχθύες. Στη Δυτική Αφρική, οι ιχθύες αντιπροσωπεύουν το 30 % της πρόσληψης ζωικής πρωτεΐνης και ο αριθμός αυτός θα ήταν μεγαλύτερος εάν υπήρχε η οικονομική δυνατότητα να στηρίξουν περισσότερες αγορές που περιλαμβάνουν προϊόντα ιχθύων (www.aquafind.com).

1.1.2. Σημασία για την οικονομία

Δισεκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο, ιδιαίτερα οι φτωχότερες περιοχές, βασίζονται στους ωκεανούς ως πηγή θέσεων εργασίας και τροφής. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (OECD), οι ωκεανοί συνεισφέρουν 1,5 τρισεκατομμύρια δολάρια ετησίως σε προστιθέμενη αξία στη συνολική οικονομία (www.worldbank.org).

Ο FAO εκτιμά ότι περίπου 60 εκατομμύρια άνθρωποι απασχολούνται παγκοσμίως στην αλιεία (39 εκατομμύρια) και στην ιχθυοκαλλιέργεια (20,5 εκατομμύρια). Οι περισσότεροι βρίσκονται σε αναπτυσσόμενες χώρες και είναι μικρής κλίμακας, βιοτέχνες αλιείς και ιχθυοκαλλιεργητές. Το 2018, η παγκόσμια αλιεία και υδατοκαλλιέργεια ανήλθε σε περίπου 179 εκατομμύρια τόνους, με αξία «πρώτης πώλησης» που εκτιμάται σε 401 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ, δημιουργώντας εξαγωγές άνω των 164 δισεκατομμυρίων δολαρίων, εκ των οποίων το 60 % από τις αναπτυσσόμενες χώρες. Το 2017, οι ιχθύες

παρείχαν σε περίπου 3,3 δισεκατομμύρια ανθρώπους σχεδόν το 20 % της μέσης πρόσληψης ζωικής πρωτεΐνης, με ένα ακόμη υψηλότερο ποσοστό σε πολλές φτωχές χώρες (www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture).

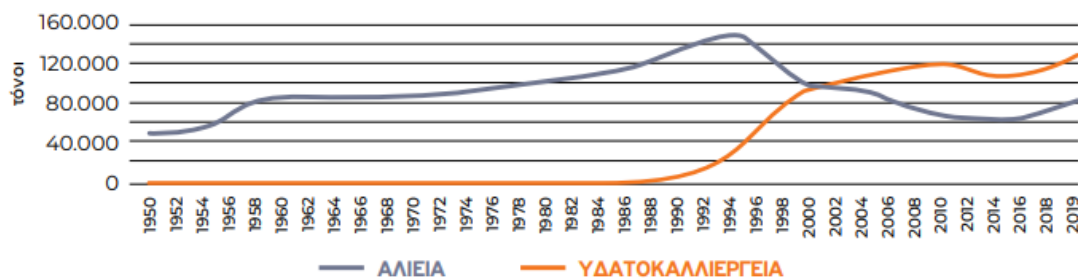
Τα ιχθυαποθέματα που αξιοποιούνται πέρα από τα βιολογικά βιώσιμα επίπεδα αυξήθηκαν από 10 % το 1974 σε 34,2 % το 2017, ενώ την ίδια χρονιά περίπου το 60 % των ιχθυαποθεμάτων αλιεύονταν σε μέγιστα βιώσιμα επίπεδα (πλήρης εκμετάλλευση). Η βελτιωμένη διαχείριση της αλιείας, οι επενδύσεις στη βιώσιμη υδατοκαλλιέργεια και η προστασία βασικών οικοτόπων θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην αποκατάσταση της παραγωγικότητας των ωκεανών και να δημιουργήσουν οφέλη δισεκατομμυρίων δολαρίων στις αναπτυσσόμενες χώρες, διασφαλίζοντας παράλληλα μελλοντική ανάπτυξη, επισιτιστική ασφάλεια και θέσεις εργασίας για τις παράκτιες κοινότητες (www.worldbank.org).

1.2. Εμφάνιση και εξέλιξη της υδατοκαλλιέργειας

1.2.1. Υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

Η υδατοκαλλιέργεια αφορά στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών όπως τους ιχθύες, τα μαλάκια, τα καρκινοειδή και τα υδρόβια φυτά (FGM, 2021). Η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί στην Ελλάδα έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα ζωικής παραγωγής λόγω της συμβολής της στην οικονομική ανάπτυξη και την κοινωνική συνοχή της χώρας (FGM, 2020). Αν και η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών είναι γνωστή στην Ελλάδα αιώνες τώρα, η υδατοκαλλιέργεια γνώρισε ταχύτατη ανάπτυξη στις αρχές τις δεκαετίας του 1980 με την παραγωγή τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (FGM, 2001). Η εκτροφή ιχθύων ιχθυοκαλλιέργειας είναι μια παραγωγική διαδικασία που αντιγράφει τους μηχανισμούς της φύσης. Διαρκεί περίπου 16 - 18 μήνες μέχρι ο ιχθύς να φτάσει το επιθυμητό εμπορικό μέγεθος των 400 g και απαιτεί επιστημονική κατάρτιση και εξειδικευμένη τεχνογνωσία. Ενδεικτικά, αναφέρεται πως το 1980 μόλις το 2% της εγχώριας προσφοράς αλιευτικών προϊόντων προερχόταν από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 98% από τη συλλεκτική αλιεία. Η αναλογία αυτή άρχισε να μεταβάλλεται και σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του FAO (2019a), το 63% της εγχώριας παραγωγής προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 37% από τη συλλεκτική αλιεία (Εικόνα 1.1). Η δραστηριότητα αυτή έχει αναδειχθεί σε μια από τις πλέον ανταγωνιστικές για την Ελλάδα, η οποία διατηρεί μια από τις ηγετικές θέσεις στην παραγωγή μεσογειακών ειδών σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο (FGM, 2020).

Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία, η τσιπούρα και το λαβράκι αντιπροσωπεύουν το 25,3% του όγκου και το 27,7% της αξίας παραγωγής ιχθύων υδατοκαλλιέργειας της Ε.Ε. και παράγονται κυρίως από 7 μεσογειακές χώρες (Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Γαλλία, Κροατία, Πορτογαλία, Κύπρος). Η Ελλάδα βρίσκεται στις δύο πρώτες χώρες παραγωγής ιχθύων μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας, αντιπροσωπεύοντας το 22,2% της παραγωγής τους διεθνώς το 2018. Η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού το 2019 στην Ε.Ε. ήταν 204.023 τόνοι και η Ελλάδα αντιπροσώπευε το 59% της παραγωγής το 2019 (FGM, 2020).

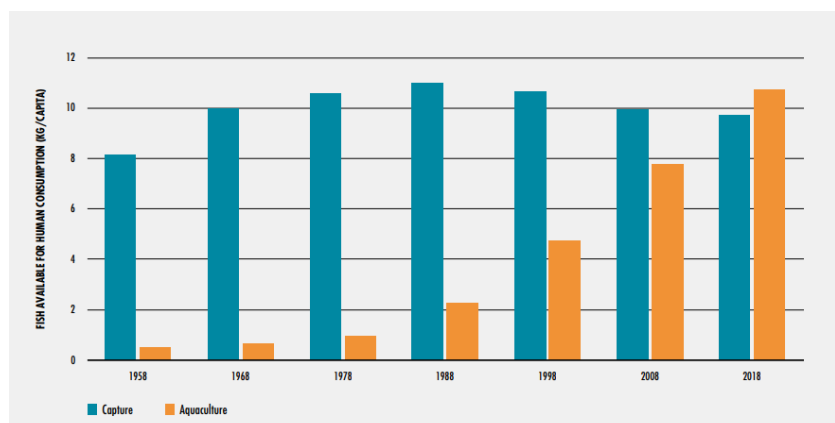


Εικόνα 1.1 Παραγωγή αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα την περίοδο 1950-2019 (FGM, 2020).

1.2.2. Παγκόσμια Υδατοκαλλιέργεια

Σε παγκόσμιο επίπεδο, από το 2016, η υδατοκαλλιέργεια είναι η κύρια πηγή ιχθύων που διατίθεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Εμφάνισε μια αξιοσημείωτη αύξηση δεδομένου ότι το ποσοστό αυτό ήταν μόνο 4 % το 1950, 9 % το 1980 και 19 % το 1990. Το 2018, το ποσοστό ανήλθε σε 52 % και αναμένεται να συνεχίσει να αυξάνεται μακροπρόθεσμα (Εικόνα 1.2). Οι επτά κορυφαίες χώρες παραγωγής παγκόσμιων αλιευτικών αλιευμάτων αντιπροσώπευαν σχεδόν το 50% των συνολικών αλιευμάτων, με την Κίνα να παράγει το 15% του συνόλου, ακολουθούμενη από την Ινδονησία (7 %), το Περού (7 %), την Ινδία (6 %), τη Ρωσική Ομοσπονδία (5 %), Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (5 %) και Βιετνάμ (3 %) (FAO, 2020).

Η ιχθυοκαλλιέργεια του παγκάσιους, ξεκίνησε από τη δεκαετία του 1960 και η παραγωγή του έχει αυξηθεί δραματικά από τα τέλη της δεκαετίας του 1990 (Phuong & Oanh, 2010). Η συνολική παραγωγή του εκτρεφόμενου παγκάσιους στο Βιετνάμ αναμενόταν να υπερβεί τους 1,3 εκατομμύρια τόνους το 2018, σημειώνοντας αύξηση κατά 6 % σε σύγκριση με το 2017. Αυτός ο αριθμός αντιπροσωπεύει περίπου το ήμισυ της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής (FAO, 2019b). Η εκτροφή του παγκάσιους διαρκεί από 6 έως 8 μήνες ως ότου φτάσει το εμπορικό βάρος των 0,8 – 1,3 κιλά (Ahmed et al., 2013). Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας και Αγροτικής Ανάπτυξης του Βιετνάμ, οι συνολικές εξαγωγές παγκάσιους στις ΗΠΑ είχαν εισφορά 2,26 δισεκατομμύρια δολάρια, ενώ η ΕΕ ήταν η τρίτη μεγαλύτερη εξαγωγική αγορά για το Βιετνάμ το 2018 (FAO, 2019b).



Εικόνα 1.2 Συνεισφορά της υδατοκαλλιέργειας και της αλιείας στην διάθεση των ιχθύων προς ανθρώπινη κατανάλωση (FAO, 2020).

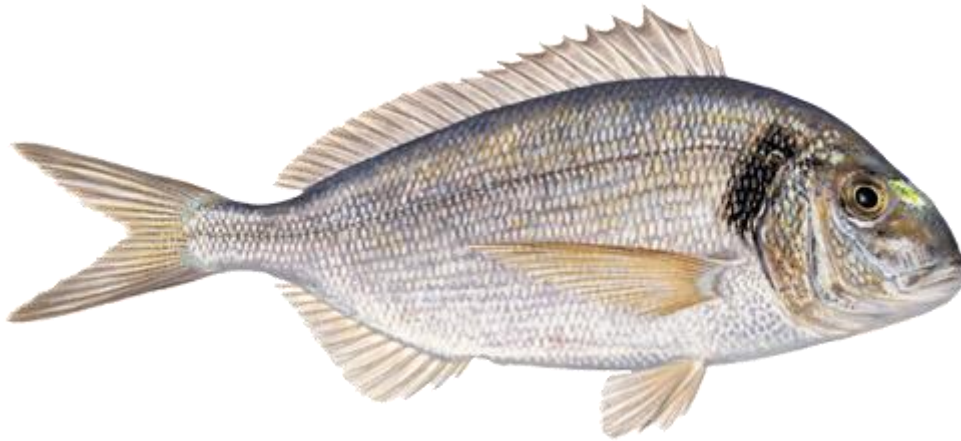
1.3. Βιολογικά χαρακτηριστικά ιχθύων

1.3.1. Τσιπούρα

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι ιχθύς της οικογένειας Σπαρίδων (*Sparidae*) που ανήκει στην τάξη των Περκόμορφων (*Perciformes*) και στην ομοιοταξία των Ακτινοπτερύγιων (*Actinopterygii*) ιχθύων. Εξωτερικά έχει ασημί χρώμα με μία μαύρη κηλίδα στο τέλος του βραγχιακού επικαλύμματος και ένα χρυσό τόξο που ενώνει τα μάτια, το οποίο είναι εντονότερο στους ενήλικους ιχθύς (Bauchot and Hureau, 1990). Το ραχιαίο πτερύγιο είναι μπλε-γκρι με μια μαύρη γραμμή στη μέση, ενώ το ουραίο πτερύγιο είναι γκριζοπράσινο με λευκές και μαύρες άκρες. Το σώμα της τσιπούρας έχει οβάλ σχήμα, πλευρικά συμπιεσμένο, με έντονη κυρτή κεφαλή που διαθέτει μικρά μάτια. Το μήκος της κυμαίνεται από 30 – 70 cm με πιο σύνηθες να εντοπίζεται στα 30 – 35 cm. Παρόλο που τα μάγουλα καλύπτονται με λέπια, το προοφθαλμικό οστό δεν διαθέτει. Στο στόμα η κάτω γνάθος είναι πιο κοντή από την άνω γνάθο. Η άνω γνάθος διαθέτει 2 – 4 σειρές από δόντια όπου τα 4 – 6 δόντια είναι μεγαλύτερα, ενώ η κάτω έχει 3 – 4 σειρές από δόντια εκ των οποίων 1 – 2 είναι μεγαλύτερα (FAO, 2009). Στην Εικόνα 1.3 διακρίνεται η εξωτερική όψη της τσιπούρας.

Η τσιπούρα εντοπίζεται κυρίως στη Μεσόγειο και στην ακτή του Ατλαντικού, από την Μεγάλη Βρετανία έως την Σενεγάλη. Σπανιότερα συναντάται στα νερά της Μαύρης Θάλασσας. Πιο συγκεκριμένα, απαντάται τόσο σε θαλάσσια όσο και σε υφάλμυρα νερά, όπως παράκτιες λιμνοθάλασσες και εκβολές ποταμών, ιδιαίτερα κατά τα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής του. Η τσιπούρα βρίσκεται συνήθως σε βραχώδεις βυθούς και βυθούς με φύκια, αλλά συχνά αλιεύεται και σε αμμώδη εδάφη. Τα νεαρά ψάρια παραμένουν σε χαμηλό βάθος (έως 30 m), ενώ τα ενήλικα μπορούν να φτάσουν σε βαθύτερα νερά (μέγιστο βάθος 150 m) (FAO, 2009).

Η τσιπούρα περιγράφεται ως πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος, αφού γεννιέται πρώτα και παραμένει ως αρσενικό μέχρι το πρώτο ή δεύτερο έτος της ηλικίας του και μετά κατά το δεύτερο ή τρίτο έτος της ηλικίας του κάνει αναστροφή ως θηλυκό. Έτσι, τα αρσενικά φτάνουν σε μήκος 20 – 30 cm και βάρος 350 – 400 g και τα θηλυκά σε μήκος 33 – 40 cm και βάρος τουλάχιστον 600 g. Η τσιπούρα αναπαράγεται από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο και μπορούν να γεννήσουν 20.000 – 80.000 αυγά σε καθημερινή βάση στην διάρκεια αυτής της περιόδου. Ο γόνος μετακινείται από την ανοιχτή θάλασσα στα ασφαλέστερα παράκτια νερά όπου βρίσκει άφθονη τροφή. Η παραμονή του εκεί συνεχίζεται έως τον επόμενο Οκτώβρη που θα λάβει μέρος στην αναπαραγωγική διαδικασία (www.fishbase.org).



Εικόνα 1.3 Εξωτερική όψη τσιπούρας (*Sparus aurata*).

1.3.2. Λαβράκι

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είναι ιχθύς της οικογένειας των Μορονίδων (*Moronidae*) που ανήκει στην τάξη των Περκόμορφων (*Perciformes*) και στην ομοιοταξία των Ακτινοπτερύγιων (*Actinopterygii*) ιχθύων. Διαθέτει ένα ασημί επίμηκες και συμπιεσμένο σώμα (πιο σκούρο στη ράχη, γκρι-ασημί στα πλαϊνά και λευκό-ασημί στην κοιλία) που μπορεί να φτάσει έως και τα 100 cm (συνήθως έχει μήκος 50 cm). Στο οφθαλμικό οστό υπάρχει ένα σκούρο σημείο. Οι νεαροί ιχθύες εμφανίζουν χαρακτηριστικές μικρές σκούρες κηλίδες στο μπροστινό μέρος ή μόνο στο κεφάλι, οι οποίες εξαφανίζονται στους ενήλικους ιχθύς. Στο ραχιαίο τμήμα βρίσκονται δύο διακριτά πτερύγια με το πρώτο να έχει 8 - 10 αγκαθωτές ακτίνες και το δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο 12 - 13 ακτίνες εκ των οποίων η πρώτη είναι ακανθώδης. Το πρωκτικό πτερύγιο έχει 3 αγκαθωτές ακτίνες και 10 - 12 μαλακές ακτίνες. Επίσης, το ουραίο πτερύγιο είναι ήπια διχαλωτό και στο σώμα του εντοπίζεται μια σκούρα γραμμή (FAO, 1999). Στην Εικόνα 1.4 διακρίνεται η εξωτερική όψη του λαβρακιού.

Το λαβράκι εντοπίζεται στη Μεσόγειο Θάλασσα, τη Μαύρη Θάλασσα και κατά μήκος των ακτών του Ανατολικού Ατλαντικού, από τη Μεγάλη Βρετανία έως τη Σενεγάλη. Το είδος των υδάτων που προτιμά ποικίλει λόγω της ανοχής στην αλατότητα και στη διακύμανση της θερμοκρασίας. Έτσι, βρίσκεται σε θαλάσσια έως ελαφρώς υφάλμυρα περιβάλλοντα, όπως παράκτιες λιμνοθάλασσες και εκβολές ποταμών με προτίμηση σε αμμώδεις ή βραχώδεις βυθούς (FAO, 1999). Οι ενήλικοι ιχθύς παρόλο που τείνουν να βρίσκονται στον πάτο παράκτιων υδάτων που φτάνουν σε βάθος έως και τα 100 μέτρα, πιο συχνά παρατηρούνται στα ρηχά νερά. Το καλοκαίρι εισέρχονται στα παράκτια ύδατα και τις εκβολές ποταμών και κατά τη διάρκεια του χειμώνα μεταναστεύουν σε βαθιά νερά στα ανοιχτά των βορειότερων περιοχών που έχουν ψυχρότερες θερμοκρασίες (www.fishbase.org).

Στα λαβράκια συναντώνται δύο ξεχωριστά φύλα, θηλυκό και αρσενικό, με το θηλυκό να διαθέτει μακρύτερο μυτερό κεφάλι και προ-ραχιαία και προ-πρωκτικά μήκη (FAO, 1999). Η σεξουαλική ωριμότητα λαμβάνει χώρα νωρίτερα στα αρσενικά και νωρίτερα στους πληθυσμούς του Νότου. Στη Μεσόγειο, η πρώτη σεξουαλική ωριμότητα εμφανίζεται

γενικά μεταξύ 2 - 4 ετών, ενώ στον Ατλαντικό η σεξουαλική ωριμότητα συμβαίνει λίγο αργότερα (αρσενικά: 4-7 ετών και θηλυκά: 5-8 ετών) (www.fishbase.org). Η αναπαραγωγική περίοδος είναι μία φορά τον χρόνο, συνήθως τον χειμώνα (Δεκέμβριο έως Μάιο), ωστόσο στις νότιες περιοχές ενδέχεται να πραγματοποιηθεί την άνοιξη (έως τον Ιούνιο) (FAO, 1999). Τα λαβράκια τρέφονται με γαρίδες, μαλάκια και άλλους ιχθύες. Οι νεαροί ιχθύες τρέφονται με ασπόνδυλα και σταδιακά αυξάνεται η κατανάλωση σε ιχθύες καθώς ωριμάζουν (www.fishbase.org). Οι ιχθύες που ξεπερνούν το μήκος των 20 cm περιλαμβάνουν κυρίως στην διατροφή τους γαρίδες και καβούρια (FAO, 1999).



Εικόνα 1.4 Εξωτερική όψη λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*).

1.3.3. Παγκάσιους

Το *Pangasius* ταξινομείται στην οικογένεια των Πανγκασιδών (*Pangasiidae*), στην τάξη των Σιλουριφόρμων (*Siluriformes*) και στην ομοιοταξία των Ακτινοπτερύγιων (*Actinopterygii*) ιχθύων. Συνολικά ανήκουν 21 είδη στο γένος *Pangasius*. Χαρακτηρίζεται από 4 υπο-γένη, ένα εκ των οποίων είναι το υπο-γένος *Pangasianodon* στο οποίο ανήκει το *Pangasianodon hypophthalmus* (*Pangasius hypophthalmus* ή *Pangasius sutchi*) (Roberts & Vidthayanon, 1991). Οι ενήλικες ιχθύς του είδους *Pangasius hypophthalmus* φτάνουν έως 130 cm και μέγιστο βάρος έως 44 κιλά. Παρόλο που χαρακτηρίζονται από ένα λαμπερό, ιριδίζον χρώμα, οι ενήλικοι ιχθύς μεγάλου μεγέθους εμφανίζουν ένα ομοιόμορφο γκρι χρώμα. Τα πτερύγια που διαθέτουν είναι σκούρα γκρι ή μαύρα, ενώ το κεφάλι είναι μετρίως πλατύ με μυτερή όψη στα πλάγια (www.fishbase.org). Η εξωτερική όψη του *Pangasius hypophthalmus* διακρίνεται στην Εικόνα 1.5.

Το *Pangasius hypophthalmus* κατοικεί σε μεγάλα ποτάμια και συγκεκριμένα εντοπίζεται στον ποταμό Chao Phraya της Ταϊλάνδης και χαμηλότερα στον ποταμό Mekong. Ζουν μόνο στο τροπικό κλίμα και προτιμούν νερό με pH 6,5 – 7,5 και θερμοκρασία μεταξύ 22 – 26 °C. Είναι παμφάγο που τρέφεται με ψάρια, καρκινοειδή καθώς και με απομείναντα φυτά. Είναι μεταναστευτικό είδος που κινείται σε περιοχές ανοδικά του ποταμού Mekong για να γεννήσει την περίοδο Μάιο – Ιούλιου και επιστρέφει την περίοδο Σεπτέμβρη – Δεκέμβριο. Οι μεταναστευτικοί ιχθύες οδηγούνται σε πλημμυρισμένες πεδιάδες κατά την περίοδο των πλημμύρων. Έτσι, χαμηλότερα του ποταμού Mekong συγκεντρώνονται οι νέοι ιχθύες που συλλέγονται για εκτροφή σε πλωτά κλουβιά, ενώ οι μεγαλύτεροι εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό τμήμα του ποταμού (www.fishbase.org).



Εικόνα 1.5 Εξωτερική όψη *Pangasius hypophthalmus*.

1.4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ιχθύων

Ο ιχθύς είναι μια σημαντική πηγή ζωικής πρωτεΐνης και περιέχει βιταμίνες. Οι ιχθύες καταναλώνονται ευρέως σε πολλά μέρη του κόσμου από τον άνθρωπο, επειδή έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, χαμηλά κορεσμένα λιπαρά και επίσης περιέχουν ωμέγα λιπαρά οξέα που είναι γνωστό ότι υποστηρίζουν την καλή υγεία. Τα θαλάσσια προϊόντα είναι πολύ πλούσιες πηγές μεταλλικών στοιχείων. Η συνολική περιεκτικότητα σε μέταλλα στην ακατέργαστη σάρκα των ιχθύων και ασπόνδυλων κυμαίνεται μεταξύ 0,6 - 1,5% υγρού βάρους. Τα μεταλλικά στοιχεία, όπως νάτριο, κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρος, φώσφορος και ιώδιο είναι σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου (Sikorski et al., 1990). Η περιεκτικότητα σε νάτριο (Na), κάλιο (K), ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg) και φώσφορο (P) είναι έως 1 mg/100 g, ενώ εκείνες σε σίδηρο (Fe), ψευδάργυρος (Zn) και (Ιώδιο) I είναι μικρότερες από 1 mg/100 g (Kietzmann et al., 1969).

Τα τέσσερα κύρια συστατικά της βρώσιμης μερίδας των ιχθύων είναι η υγρασία, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια (λίπος) και η τέφρα. Όσον αφορά τη συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια, γενικά, οι ιχθύες χωρίζονται σε ομάδες ως εξής: άπαχα (< 2 %), χαμηλά λιπαρά (2 - 4 %), μέτρια λιπαρά (4 - 8 %) και πλούσια σε λιπαρά (> 8 %). Επιπλέον, οι ιχθύες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη πρέπει να περιέχουν περισσότερο από 15% πρωτεΐνη (Stansby, 1976). Τα δεδομένα για την σύνθεση των συστατικών των ιχθύων μπορούν να προσδιοριστούν μόνο κατά προσέγγιση και όχι ως απόλυτες τιμές. Οι βασικοί λόγοι σχετίζονται με το είδος, την εποχή αλίευσης, το περιβάλλον, τη διατροφή, την ηλικία, το φύλο (Boran and Karacam, 2011) ακόμα και με τα πρόσθετα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται στην συσκευασία (Karl et al., 2010). Ορισμένα είδη είναι αποκλειστικά θαλάσσια, ενώ άλλα περιορίζονται στα γλυκά ύδατα. Μερικά είδη, από την άλλη, επιβιώνουν τόσο σε θαλάσσια όσο και σε περιβάλλοντα γλυκού νερού. Ορισμένα θαλάσσια είδη μεταναστεύουν στο γλυκό νερό για ωοτοκία, ενώ πολλά είδη γλυκού νερού εισέρχονται στη θάλασσα για τον ίδιο λόγο. Αυτές οι διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες θερμοκρασίας, αλατότητας, πίεσης και διαθεσιμότητας τροφής έχουν βαθιά επίδραση στη βιοχημική σύνθεση (Schormüller, 1968).

Η διακύμανση της συγκέντρωσης των στοιχείων των ιχθύων τσιπούρας (*S. aurata*), λαβρακιού (*D. labrax*) και παγκάσιους (*P. hypophthalmus*) φαίνεται στον Πίνακα 1.1. Από

τις διαθέσιμες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε τσιπούρες και λαβράκια επιβεβαιώνεται η διακύμανση των στοιχείων των ιχθύων ανάλογα με την προέλευση και τις συνθήκες ανάπτυξης. Αναλυτικότερα, η σύσταση της τσιπούρας κυμαίνεται στα 63,52 – 74,74 % για την υγρασία, στα 18,8 – 22,31 % για την συνολική πρωτεΐνη, στα 3,9 – 15,11 % για το λίπος και στα 1,27 – 1,57 % για την τέφρα. Αντίστοιχα για το λαβράκι η σύσταση είναι 70,71 – 76,72 % υγρασία, 8,25 – 20,35 % πρωτεΐνη, 4,81 – 10,37 % λίπος και 1,22 – 1,66 % τέφρα (Grigorakis, Taylor, and Alexis, 2002, Huidobro et al., 2001, Alasalvar et al., 2001, Grigorakis et al., 2004, Erkan and Odzen, 2007 και Kyrana and Lougounis, 2002). Η σύσταση της τσιπούρας που προήλθε από εκτροφεία της Μεσογείου στην περιοχή της Τουρκίας την περίοδο Ιούνιο - Ιούλιο ήταν 63,52 % υγρασία, 19,81 % συνολική πρωτεΐνη, 15,5 % ολικό λίπος και 1,35 % τέφρα, ενώ για του λαβρακιού της ίδιας περιοχής και περιόδου ήταν 70,71 % υγρασία, 20,35 % συνολική πρωτεΐνη, 6,10 % ολικό λίπος και 1,66 % τέφρα (Erkan and Odzen, 2007). Βέβαια, αυτό το ποσοστό του λίπους στην τσιπούρα (15,5 %) εμφανίζει μεγάλη απόκλιση από άλλες αναφορές (3,9 %, 5,18 % και 6,53 % όπως αναφέρουν οι Grigorakis, Taylor and Alexis (2002), Huidobro et al. (2001) και Alasalvar et al. (2001), αντίστοιχα. Αντίθετα, η σύσταση που μετρήθηκε από το καλλιεργούμενο λαβράκι σε ελληνικά ύδατα (Ιόνιο) τον μήνα Ιούλιο ήταν 69,91 % υγρασία, 8,25 % πρωτεΐνη, 10,37 % λίπος και 1,22 % τέφρα (Grigorakis et al., 2004).

Σχετικά, με τα συσκευασμένα φιλέτα παγκάσιους η αντίστοιχη σύσταση ήταν: 83,83 – 85,59 % υγρασία, 12,51 – 14,52 % συνολική πρωτεΐνη, 1,09 – 1,65 % ολικό λίπος και 0,76 – 2,38 % τέφρα (Guimarães et al., 2016). Στην περίπτωση του παγκάσιους έχει επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι οι διαφορετικές δίαιτες έχουν ως αποτέλεσμα την διακύμανση της σύνθεσης τους που διαμορφώνεται σε 74,10 – 79,15 % υγρασία, 15,50 – 16,60 % πρωτεΐνη, 4,08 – 8,08 % λιπίδια και 1,20 – 1,24 % τέφρα (Mushahida-Al-Noor et al., 2012). Επίσης, έχει καταγραφεί μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υγρασία και χαμηλότερη σε πρωτεΐνη στα φιλέτα *P. hypophthalmus* με προσθήκη πολυφωσφορικού σε σύγκριση με τα φιλέτα χωρίς προσθήκη (Karl et al., 2010).

Πίνακας 1.1 Η διακύμανση στη σύσταση (%) της τσιπούρας, του λαβρακιού και του παγκάσιους.

Σύσταση (%)	<i>S. aurata</i>	<i>D. labrax</i>	<i>P. hypophthalmus</i>
Υγρασία	63,5 - 74,7	70,7 - 76,7	83,8 - 85,6
Πρωτεΐνη	18,8 - 22,3	8,3 - 20,4	12,5 - 14,5
Λίπος	3,9 - 15,1	4,8 - 10,4	1,1 - 1,7
Τέφρα	1,3 - 1,6	1,2 - 1,7	0,8 - 2,4

1.5. Φαινόμενο νεκρικής ακαμψίας

Μετά το θάνατο ενός ιχθύ, σημειώνονται σημαντικές αλλαγές στο σώμα του. Οι αλλαγές ποικίλλουν ανάλογα με το μέγεθος, το είδος των ιχθύων, τη φυσική κατάσταση, την εποχή και την κατάσταση θανάτου. Μετά το θάνατο των ιχθύων, ο εγκεφαλικός έλεγχος καθώς και η κυκλοφορία του αίματος σταματά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία

σύνθεσης ATP καθώς και της μεταφοράς διαφόρων μορίων που είναι απαραίτητα για την λειτουργία των κύτταρων. Η μεταθανάτια σκλήρυνση του μυϊκού ιστού, που αναφέρεται ως νεκρική ακαμψία, συμβαίνει είτε αργά είτε γρήγορα καθώς η γλυκόλυση σχηματίζει ορισμένα οργανικά οξέα με αποτέλεσμα τη μείωση του pH. Συγκεκριμένα, το γλυκογόνο αποδομείται σε γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα το pH του μυϊκού ιστού να πέφτει από τις αρχικές φυσιολογικές τιμές 7,2 - 7,4 στο τελική τιμή pH 6,0 ή μικρότερες από αυτή. Ο ρυθμός μείωσης του pH εξαρτάται σημαντικά από την αρχική περιεκτικότητα της σάρκας σε γλυκογόνο. Όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε γλυκογόνο, τόσο χαμηλότερες είναι οι τιμές του pH. Η κύρια πηγή παροχής ATP στις μυϊκές ίνες χάνεται μετά το θάνατο των ιχθύων, καθώς το γλυκογόνο δεν μπορεί πλέον να οξειδωθεί πλήρως σε CO₂ και H₂O. Ωστόσο, για κάποιο χρονικό διάστημα μετά το θάνατο, η ATP διατηρείται σε ένα φυσιολογικό επίπεδο στους μυς εξαιτίας της κινάσης της κρεατίνης (CP), μια δεξαμενή ενέργειας που φυσιολογικά υπάρχει στον μυ για να παράγει ATP από το ADP. Το επίπεδο ATP αρχίζει να πέφτει όταν το 70% ή περισσότερο της CP έχει υποβαθμιστεί. Μετά την ολοκλήρωση της ακαμψίας, ο μυϊκός ιστός χάνει την ακαμψία, ακολουθούμενο από αυτόλυση σχηματίζοντας αμινοξέα και άλλες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας αυτές ενώσεις που υπάρχουν πριν και μετά την αυτόλυση. Κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης από μικροοργανισμούς σχηματίζονται ορισμένες ουσίες που προκαλούν την υποβάθμιση της ποιότητας του ιχθύ, όπως η τριμεθυλαμίνη και η ισταμίνη (Nowsad, 2007).

Η νεκρική ακαμψία εξαρτάται, επιπλέον, από τον χειρισμό, τη βιολογική κατάσταση των ιχθύων και τη θερμοκρασία συντήρησης πριν από την ακαμψία. Η πιο κοινή εμπορική μέθοδος θανάτωσης της τσιπούρας και του λαβρακιού είναι η τοποθέτηση σε πάγο μετά την συγκομιδή (de la Rosa et al., 2021). Η νεκρική ακαμψία αποτελεί ένδειξη της ποιότητας των ιχθύων. Για παράδειγμα, οι ιχθύες που έχουν υποστεί στρες πριν από το θάνατο παρουσιάζουν ένα σημαντικό διάκενο, δηλαδή τα μυοτόμα χωρίζονται το ένα από το άλλο (Suzuki, 1981). Αυτό συμβαίνει επειδή οι ενδιάμεσες ίνες του συνδετικού ιστού σπάνε προκαλώντας σχισμές ή τρύπες στο φιλέτο. Επίσης, η κατάσταση της νεκρικής ακαμψίας διαρκεί τουλάχιστον μία μέρα ανάλογα με το είδος του ιχθύ, αποτελώντας ένδειξη της φρεσκότητας (Hwang et al., 1991).

1.6. Αλλοίωση ιχθύων

Μετά την συλλογή των ιχθύων, η αλλοίωση αρχίζει γρήγορα και η νεκρική ακαμψία είναι υπεύθυνη για τις αλλαγές στον ιχθύ μετά το θάνατό του (Tavares et al., 2021). Στις υψηλές θερμοκρασίες των τροπικών περιοχών η αλλοίωση μπορεί να ξεκινήσει εντός 12 ωρών (Berkel et al., 2004). Κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης των ιχθύων, υπάρχει διάσπαση διαφόρων συστατικών και σχηματισμός νέων ενώσεων. Αυτές οι νέες ενώσεις είναι υπεύθυνες για τις αλλαγές στην οσμή, τη γεύση και την υφή της σάρκας του ιχθύ. Η αλλοίωση των ιχθύων προκύπτει από τρεις βασικούς μηχανισμούς: την ενδογενή ενζυμική δραστηριότητα (αυτόλυση), την χημική οξείδωση των λιπιδίων και την μικροβιακή ανάπτυξη (Ghaly et al., 2010).

1.6.1. Μικροβιακή αλλοίωση

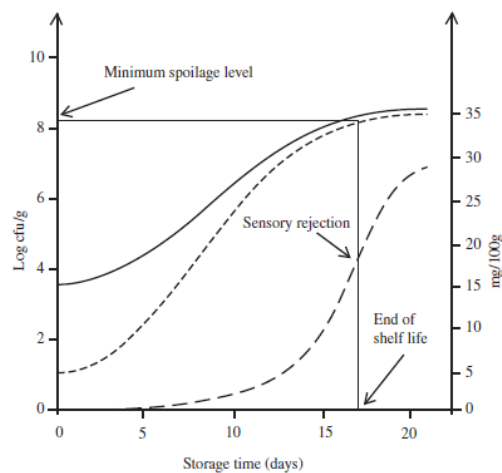
Η μικροβιακή ανάπτυξη είναι ο κυριότερος παράγοντας αλλοίωσης των ιχθύων επηρεάζοντας την ποιότητα του προϊόντος. Εξαιτίας των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών, υψηλή ενεργότητα ύδατος ($a_w = 0,98 - 0,99$), χαμηλή οξύτητα ($pH > 6$), υψηλή ποσότητα μη πρωτεϊνούχων ενώσεων (π.χ. ΤΜΑΟ, οξείδιο της τριμεθυλαμίνης), ο ιχθύς αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Comi, 2017).

Οι μύες των ιχθύων είναι απαλλαγμένοι από μικροοργανισμούς, αλλά μολύνονται μετά την θανάτωση του ιχθύ από τον μικροβιακό πληθυσμό που υπάρχει στο δέρμα του (Comi, 2017). Εκτός από το δέρμα, οι μικροοργανισμοί εντοπίζονται στα βράγχια και την γαστρεντερική οδό λόγω της επαφής με το νερό (Novoslavskij et al., 2015). Το είδος των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν επηρεάζεται από το κλίμα της περιοχής που εδρεύει ο ιχθύς. Οι ιχθύες ψυχρών εύκρατων υδάτων του Βόρειου Ατλαντικού ή της Βόρειας Θάλασσας περιέχουν κυρίως ψυχρόφιλους και ψυχρότροφους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, όπως *Photobacterium*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, ενώ οι ιχθύες από τα θερμά νερά των εύκρατων ζωνών, όπως η Μεσόγειος Θάλασσα, περιέχουν τα ίδια γένη, αλλά όχι τους ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς, όπως το *Photobacterium*. (Koutsoumanis and Nychas, 1999, Parlapani et al., 2013). Οι ιχθύες τροπικών υδάτων περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό θετικών κατά Gram σε σύγκριση με τους ιχθύες από εύκρατες ζώνες. Οι ιχθύες από γλυκά νερά περιέχουν κυρίως *Pseudomonas*, *Aeromonas* και διάφορα άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια (Gram, 2009). Επίσης, η περίοδος αλιείας, η μέθοδος σύλληψης, ο χειρισμός κατά την αλίευση και οι τεχνολογικές διαδικασίες και διαδικασίες πώλησης είναι μερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την μικροχλωρίδα των ιχθύων. Για παράδειγμα, η απομάκρυνση των εντόσθιων και το φιλετάρισμα είναι ένας τρόπος επιμόλυνσης (Comi, 2017). Η εξωγενής μικροχλωρίδα σχηματίζεται από βακτήρια, ιούς, ζυμομύκητες και μούχλα χερσαίας προέλευσης. Αποτελείται από παθογόνα για τον άνθρωπο (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp., *C. botulinum*, εντεροτοξικό *E. coli*, εντεροτοξικά στελέχη *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και ιούς) (Comi and Iacumin, 2012).

Η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας εξαρτάται και από το είδος της συντήρησης. Σε διατηρημένους με απλή ψύξη ιχθύες που συντηρούνται αερόβια, η αλλοιωγόνος μικροχλωρίδα περιέχει γένη που μπορεί να αναπτύσσονται γρήγορα αερόβια σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως *Pseudomonas* και *Shewanella*, ενώ σε μειωμένο οξυγόνο και αυξημένο διοξείδιο του άνθρακα (συσσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, MAP), συνήθως, κυριαρχούν οι *Photobacterium*, Γαλακτικά βακτήρια (LAB) και *Brochothrix thermosphacta*. Διαδικασίες όπως το αλάτισμα, η οξίνιση και το κάπνισμα αλλάζουν τις εγγενείς ιδιότητες των θαλασσινών, όπως το pH και το a_w , επιβάλλουν διάφορα εμπόδια στη μικροβιακή ανάπτυξη και αναπόφευκτα επηρεάζουν την επικράτηση της μικροχλωρίδας αλλοίωσης. Τα επεξεργασμένα θαλασσινά συνήθως κυριαρχούνται από LAB και ζυμομύκητες και άλλους μικροοργανισμούς ανθεκτικούς σε οξύ ή αλάτι ανάλογα με το προϊόν (Bozariis and Parlapani, 2017).

1.6.1.1. Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (SSO)

Μεταξύ των μικροοργανισμών που κυριαρχούν στη μικροχλωρίδα, εκείνοι που θα έχουν την ικανότητα να παράγουν μεταβολίτες σε επαρκείς ποσότητες για να προκαλέσουν οργανοληπτική απόρριψη θεωρούνται ως η κύρια αιτία της αλλοίωσης και ονομάζονται ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (Specific spoilage organism, SSO). Οι SSOs αποτελούν ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροχλωρίδας που αναπτύσσεται γρήγορα υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες συντηρησης και φτάνει σε υψηλούς αριθμούς. Έτσι, γίνεται το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού και παράγει μεταβολίτες που προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόν. Ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσουν τα SSOs στο ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, που συμπίπτει με τη συγκέντρωση των μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν αισθητηριακή απόρριψη, καθορίζει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων (Gram and Huss, 1996, Gram and Dalgaard, 2002).



Εικόνα 1.6 Μικροβιακή αλλοίωση και ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (SSO). Συνολικός μικροβιακός πληθυσμός: (—), ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί: (---) και μικροβιακοί μεταβολίτες(—·—)(Boziaris and Parlapani, 2017).

1.6.1.2. Μεταβολισμός των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών των ιχθύων της Μεσογείου

Γενικά, η ποσότητα των μικροοργανισμών που υπάρχουν στους ιχθύες είναι μεταβλητή και κυμαίνεται μεταξύ 10^2 - 10^5 CFU/cm² στο δέρμα και μεταξύ 10^3 - 10^7 CFU/cm² στα βράγχια (Abgrall, 1988). Στην συγκεκριμένη υπο-ενότητα παρουσιάζονται οι πιο αντιπροσωπευτικοί ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται στους ιχθύες της Μεσογείου και η μεταβολική τους δραστηριότητα που οδηγεί στην αλλοίωση. Στον Πίνακα 1.3 συνοψίζονται οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται και τα προϊόντα του μεταβολισμού τους.

1. *Pseudomonas spp.*

Οι *Pseudomonas spp.* είναι υποχρεωτικά αερόβια και αρνητικά κατά Gram βακτήρια σε σχήμα ράβδου που δεν σχηματίζουν σπόρια. Έχουν την ικανότητα να κινούνται εξαιτίας ενός ή περισσοτέρων μαστιγίων που διαθέτουν. Ανήκουν στην κατηγορία των

ψυχρότροφων μικροοργανισμών, δηλαδή είναι ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες, ωστόσο η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται γύρω στους 20 °C (Morita, 1975). Πράγματι, οι *Pseudomonas spp.* έχουν χαρακτηριστεί ως οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί στους ιχθύες και στα οστρακοειδή που προέρχονται από τα νερά της Μεσογείου και ήταν συντηρημένα σε χαμηλές θερμοκρασίες υπό αερόβιες συνθήκες (Koutsoumanis and Nychas, 1999, Tryfinopoulou et al., 2002). Έχει φανεί, επίσης, ότι οι φθορίζουσες *Pseudomonas* αυξάνονται γρήγορα κατά τα αρχικά στάδια αλλοίωσης, παράγοντας πολλά πρωτεολυτικά και υδρολυτικά ένζυμα (Shewan, 1961). Τα κύρια προϊόντα που σχηματίζονται είναι αμμωνία, κετόνες, αλδεΐδες, εστέρες και υποξανθίνη. Παρόλο που δεν παράγουν σημαντικές ποσότητες H₂S, παράγουν CH₃SH και (CH₃)₂S από το αμινοξύ μεθειονίνη (Dalgaard et al., 1993). Η αμμωνία είναι αποτέλεσμα της απαμίνωσης των αμινοξέων και του νουκλεοτιδικού καταβολισμού (Malle and Poumeyrol, 1989). Οι *Pseudomonas spp.* είναι ένα από τα είδη βακτηριών που εμπλέκονται στην αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων και έτσι μετατρέπονται σε βιογενείς αμίνες, οι οποίες είναι τοξικές για τον άνθρωπο. Οι αλδεΐδες σχηματίζονται κυρίως από τον καταβολισμό αμινοξέων (Filipiak et al., 2012), ενώ οι κετόνες από καταβολισμό της γλυκόζης (Casaburi et al., 2015). Ωστόσο, οι εστέρες είναι από τις κυρίαρχες ενώσεις που παρουσιάζονται στα θαλασσινά. Ο σχηματισμός τους συνδέεται με την εστεροποίηση των αλκοολών και των καρβοξυλικών οξέων, καθώς και με τη δράση της μικροβιακής εστεράσης. Ανάμεσα από τους εστέρες που είναι ικανοί να παράγουν, ο αιθανικός αιθυλεστέρας είναι ο πιο συχνά ανιχνεύσιμος στους ιχθύες (Duflos et al., 2006) Με αυτόν τον τρόπο, η ανάπτυξη των *Pseudomonas spp.* παράγει χαρακτηριστικές φρουτώδεις, σάπιες καθώς και θειούχες μυρωδιές και γεύσεις. Οι φρουτώδεις μυρωδιές που παράγονται από το *Pseudomonas fragi* προέρχονται από μονοάμινο-μονοκαρβοξυλικά αμινοξέα (Herbert and Shewan, 1976).

2. Βακτήρια που παράγουν H₂S – *Shewanella putrefaciens*

Εκτός των *Pseudomonas spp.*, τα βακτήρια που παράγουν H₂S ανήκουν στους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς. Τόσο κατά την συντήρηση των ιχθύων σε χαμηλές θερμοκρασίες και αερόβιες συνθήκες (Tryfinopoulou et al., 2007) όσο και σε τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασία (MAP) με συγκέντρωση 10 % O₂ (Parlapani et al., 2014). Τα βακτήρια που παράγουν H₂S παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των ιχθύων και έχουν χαρακτηριστεί ως ο κύριος οργανισμός αλλοίωσης στον μπακαλιάρο της Βόρειας Θάλασσας (Ευρώπη) κατά την αερόβια συντήρηση (Gram and Dalgaard 2002). Οι Fonnesbech-Vogel et al. (2005) χαρακτήρισε τη *Shewanella baltica* ως το κύριο είδος στην μικροχλωρίδα των ιχθύων της Βαλτικής που παράγει H₂S, ενώ στην μικροβιακή χλωρίδα των ιχθύων της Μεσογείου ειδικότερα έχει εντοπιστεί η *Shewanella putrefaciens* (Tryfinopoulou et al. 2007).

Η *Shewanella putrefaciens* είναι ψυχρότροφο και αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο αναπτύσσεται τόσο παρουσία όσο απουσία οξυγόνου, όντας προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Ως προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός έχει την δυνατότητα να πραγματοποιεί αναπνοή χρησιμοποιώντας ως τελικό δεκτή ηλεκτρονίων άλλα μόρια αντί του οξυγόνου. Έτσι, σε μία αναερόβια αναπνοή εκμεταλλεύεται το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) παράγοντας τριμεθυλαμίνη (TMA), κύρια ένωση που ανήκει στις

βιογενείς αμίνες, συμβάλει στην αλλοίωση των ιχθύων και προσδίδει την αρνητικά χαρακτηριστική μυρωδιά «ψαριού» (Dalgaard et al., 1993). Κατά τη διάρκεια της αερόβιας ανάπτυξης, το *S. putrefaciens* χρησιμοποιεί τον κύκλο του Krebs για να παράγει ηλεκτρόνια που στη συνέχεια διοχετεύονται μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Αντίθετα, κατά την αναερόβια αναπνοή χρησιμοποιεί μόνο μέρος του κύκλου του Krebs και τα ηλεκτρόνια παράγονται από ένα άλλο μεταβολικό μονοπάτι, το μονοπάτι της σερίνης (Scott και Neelson, 1994). Η *S. putrefaciens* μπορεί να αξιοποιήσει μια ποικιλία πηγών άνθρακα ως υπόστρωμα στην αναερόβια αναπνοή που εξαρτάται από το ΤΜΑΟ, συμπεριλαμβανομένων του μυρμηκικού και του γαλακτικού. Ενώσεις, όπως το οξικό και το ηλεκτρικό που χρησιμοποιούνται στην αναπνοή οξυγόνου δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν το ΤΜΑΟ είναι τερματικός δέκτης ηλεκτρονίων (DiChristina and DeLong, 1994). Εκτός από το ΤΜΑ, προϊόν της αναερόβιας αναγωγής του ΤΜΑΟ είναι και το οξικό (Scott και Neelson, 1994). Όμοια με τους *Pseudomonas* spp., η *S. putrefaciens* παράγει CH_3SH και $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ από την μεθειονίνη ή την κυστεΐνη (Varlet and Fernandez, 2010), αλλά και υποξανθίνη από ινοσίνη ή μονοφωσφορική ινοσίνη (Surette et al., 1988).

Το *S. putrefaciens* κυριαρχεί, συνήθως, έναντι του *Pseudomonas* στους ιχθύες προερχόμενοι από τις βόρειες θάλασσες, αλλά δεν μπορεί να κυριαρχήσει έναντι του *Pseudomonas* στους ιχθύες των ελληνικών υδάτων. Αυτή η αδυναμία αποδίδεται στη χαμηλότερη περιεκτικότητα ΤΜΑΟ στους ιχθύες των ελληνικών υδάτων έναντι των ιχθύων από τις Βόρειες Θάλασσες. Πράγματι, η ανάπτυξη τριμεθυλαμίνης (ΤΜΑ) δεν είναι έντονη στα ψάρια από τα ύδατα της Μεσογείου σε σύγκριση με άλλα είδη από τις Βόρειες Θάλασσες (Parlapani et al., 2015, Parlapani and Bozianis, 2016). Οι Kyrgana και Lougonois (2002) προσδιόρισαν το επίπεδο ΤΜΑΟ στο ευρωπαϊκό λαβράκι (*D. labrax*) στην τιμή των 22,8 mg N/100 g, το οποίο είναι αρκετά χαμηλότερο σε σύγκριση με τα 66,75 mg N/100 g που βρέθηκαν στον μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*).

3. Γαλακτικά βακτήρια (LAB)

Τα Γαλακτικά βακτήρια, είναι θετικά κατά Gram βακτηρία όπου εμφανίζονται είτε σε ραβδοειδές σχήμα (βάκιλλοι) είτε σε σφαιρικό (κόκκοι). Είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν την ζύμωση για να παράγουν ATP, αλλά ταυτόχρονα ανέχονται την παρουσία O_2 στο περιβάλλον τους. Ποικίλα Γαλακτικά βακτήρια, μεταξύ αυτών το *Carnobacterium*, συνήθως κυριαρχούν σε ιχθύες προερχόμενοι από τις βόρειες θάλασσες που συντηρούνται υπό τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασία (MAP) ή σε συσκευασία υπό κενό (Macé et al., 2012). Στους ιχθύες από την περιοχή της Μεσογείου που συντηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες υπό MAP συνθήκες οι κύριοι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί που ευθύνονται είναι βακτήρια των *Lactobacillus* και *Carnobacterium* (Koutsoumanis et al., 2000). Ανάμεσα σε αυτούς κυριαρχεί και ο *Brochothrix thermosphacta* για τον οποίο θα αναφερθούμε εκτενώς παρακάτω. Παρόλα αυτά, σε MAP συσκευασία, όπου O_2 βρίσκεται σε συγκέντρωση 10 % οι *Pseudomonas* spp. παραμένουν ο κυρίαρχος πληθυσμός παρόλο που ευνοούνται οι LAB (Pournis et al., 2005).

Τα LAB μεταβολίζουν υδατάνθρακες, παράγοντας οξέα, όπως γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ αλλά και υδρόθειο, θειόλες, μερκαπτάνες, διμεθυλοσουλφίδιο, προδίδοντας την μυρωδιά της ουρίας στους ιχθύες και τα προϊόντα τους. Η μυρωδιά του σάπιου ιχθύ προέρχεται, επίσης, από την παρουσία αμινοβαλερικού οξέος, αμινοβαλερικής αλδεϋδης και

πιπεριδίνης (Connil et al., 2002). Επιπλέον, η παρουσία κετονών (π.χ. 3-υδροξυ-2-βουτανόνη) και εστέρων (π.χ. οξικός 3-μεθυλ-βουτυρεστέρας) στην αλλοίωση των ιχθύων σχετίζεται όχι μόνο με τον μεταβολισμό των *Pseudomonas* spp. αλλά και με εκείνο των Γαλακτικών οξέων (Boziaris and Parlapani, 2017).

4. Enterobacteriaceae

Τα μέλη της Enterobacteriaceae συστήνουν μία μεγάλη οικογένεια αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που περιλαμβάνει πάνω 30 γένη και 100 είδη. Μεταξύ αυτών ανήκουν πολλά γνωστά παθογόνα, όπως η *Salmonella*, η *Escherichia coli* και η *Shigella*. Έχουν σχήμα ράβδου, δεν σχηματίζουν σπόρια και τα περισσότερα γένη διαθέτουν μαστίγια για να κινούνται, ενώ μερικά είναι μη κινητικά. Όσον αφορά τον μεταβολισμό τους είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που μεταβολίζουν σάκχαρα για να παράγουν γαλακτικό οξύ και άλλα τελικά προϊόντα. Μερικά από τα Enterobacteriaceae, όπως είναι τα *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, μπορούν να βρεθούν στους ιχθύες που ζουν συνήθως σε νερά της παράκτιας περιοχής. Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από την ποσότητα των βιομηχανικών ή αστικών απορριμμάτων και είναι ιδιαίτερα υψηλή την Άνοιξη και το Καλοκαίρι, από την αύξηση των αστικών απορριμμάτων λόγω του τουρισμού. Ο βαθμός της ρύπανσης των υδάτων επηρεάζει μεταξύ άλλων και την *Salmonella* spp. και την *E. coli*. Ωστόσο, ως μεσόφιλοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες άνω των 10 °C. Έτσι, όταν τα προϊόντα ιχθύων παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε αυξανόμενες θερμοκρασίες ευνοείται η ανάπτυξη τους (Gram et al., 1990). Παρόλα αυτά, η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών, κυρίως, σχετίζεται με τους χειρισμούς που υφίστανται οι ιχθύες μετά τη συλλογή (Comi and Iacumin, 2012). Έχουν βρεθεί ως αλλοιωγόνους, μαζί με άλλους μικροοργανισμούς ικανούς να ανεχθούν υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, σε προϊόντα όπως ο παστός γαύρος (Aponte et al., 2010). Τα Enterobacteriaceae συμβάλλουν στην αλλοίωση των ιχθύων σε μικρότερο βαθμό απελευθερώνοντας άσχημες οσμές μέσω της παραγωγής TMA και $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ (Joffraud et al., 2001).

5. *Brochothrix thermosphacta*

Το *B. thermosphacta* είναι θετικό κατά Gram βακτήριο σε σχήμα ράβδου που δεν σχηματίζει σπόρια (Kilcher et al., 2010). Όντας προαιρετικά αναερόβιος και ψυχρότροφος μικροοργανισμός έχει αναφερθεί στην αλλοίωση μπιφτεκιών από ιχθύ, τόνου συσκευασμένου υπό CO_2 ή MAP (Lannelongue et al., 1982) και κατεψυγμένου μπακαλιάρου (Gardner, 1981). Επιπλέον, το *B. thermosphacta* ανήκει στους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς των ιχθύων της Μεσογείου που συντηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες υπό MAP συνθήκες (Drosinos and Nychas, 1996). Στους ιχθύες και στα προϊόντα ιχθύων η ανάπτυξη του εξαρτάται από την συγκέντρωση O_2 στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασίας. Μπορεί να γίνει ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός παρουσία συγκέντρωσης O_2 πάνω από 0,2 % ή σε αερόβιες συνθήκες (Coton et al., 2013).

Το *B. thermosphacta* μέσω του μεταβολισμού του παράγει ενώσεις που σχετίζονται με την χαρακτηριστική γλοιώδεις όψη και δυσσομία των συντηρημένων υπό MAP προϊόντων.

Συγκεκριμένα, σε γαρίδες που συντηρήθηκαν υπό MAP το *B. thermosphacta* κατανάλωσε ισολευκίνη, λευκίνη και άλλες οργανικές ενώσεις και παράγαγε 2,3-βουτανδιόνη, 3-μεθυλ-1-βουτανάλη, 2-οκτένιο, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, διμεθυλοβενζόλιο και βουτανδιόλη. Από αυτές τις πτητικές ενώσεις, η 2,3-βουτανδιόνη, η 3-μεθυλ-1-βουτανάλη και η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη είναι κυρίως υπεύθυνες για την δυσοσμία. Βέβαια, οι ενώσεις που παράγονται εξαρτώνται και από το τρόφιμο στο οποίο αναπτύσσεται το συγκεκριμένο βακτήριο (Laurson et al., 2006). Έτσι, μπορεί να παραχθεί μια ποικιλία από αλδεΐδες, κετόνες και αλκοόλες που είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση (Illikoud et al., 2019). Εκτός αυτών, κατά την διάρκεια ζύμωσης ως κύριο προϊόν αποικοδόμησης των υδατανθράκων (π.χ. γλυκόζη, ξυλόζη) παράγει γαλακτικό οξύ και μυρμιγκικό οξύ (Laurson et al., 2006).

Πίνακας 1.3 Παραγόμενες ενώσεις από τον μεταβολισμό των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών των ιχθύων που προέρχονται από την Μεσόγειο (Church, 1998, Gram and Huss, 2000 και Laurson et al., 2006).

Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί	Παραγόμενα προϊόντα αλλοίωσης
<i>Pseudomonas</i> spp.	CH ₃ SH, (CH ₃) ₂ S, κετόνες, εστέρες, αλδεΐδες, NH ₃ , βιογενείς αμίνες και υποξανθίνη
<i>Shewanella putrefaciens</i>	TMA, H ₂ S, CH ₃ SH, (CH ₃) ₂ S, υποξανθίνη και οξέα
Γαλακτικά βακτήρια	H ₂ S, (CH ₃) ₂ S, κετόνες, εστέρες, αλδεΐδες, NH ₃ και οξέα
Enterobacteriaceae	TMA, (CH ₃) ₂ S και οξέα
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	2,3-βουτανδιόνη, 3-μεθυλ-1-βουτανάλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, κετόνες, αλκοόλες, αλδεΐδες και οξέα

1.6.2. Αλλοίωση μέσω ενζυμικής αυτόλυσης

Αμέσως μετά την θανάτωση του ιχθύ, η ενζυμική αυτόλυση που προκύπτει από τη δράση ενδογενών ενζύμων, προκαλεί αρχικά απώλεια της χαρακτηριστικής φρέσκιας οσμής και γεύσης του ψαριού και στη συνέχεια μαλακώνει τη σάρκα (Huss, 1995). Οι κύριες αλλαγές που λαμβάνουν χώρα είναι αρχικά η ενζυμική αποικοδόμηση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και των συναφών προϊόντων και στη συνέχεια η δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων (Boziaris, 2014), όπως περιγράφεται στον Πίνακα 1.2. Η υψηλή αυτολυτική δραστηριότητα των κυρίων μυϊκών ενδογενών πρωτεασών προκαλεί την υδρόλυση των βασικών μυοϊνιδιακών πρωτεϊνών, συμβάλλοντας στην αποδυνάμωση της δομής των μυοϊνιδίων κατά τη μεταθανάτια αποθήκευση. Τα κύρια πρωτεολυτικά συστήματα που υπάρχουν είναι οι κυτταροπλασματικές καλπίνες (σε ουδέτερο pH) και οι λυσοσωμικές καθεψίνες (σε όξινο pH). Επιπλέον, η παραγωγή φορμαλδεΐδης και της αμμωνίας από την ενζυμική αποικοδόμηση της τριμεθυλαμίνης (TMA) οδηγεί στον σχηματισμό ανεπιθύμητων οσμών, όπως και η παραγωγή υποξανθίνης από τον καταβολισμό του ATP (Tavares et al., 2021).

Οι συγκεντρώσεις του ATP και η διάσπαση στα προϊόντα ADP (διφωσφορική αδενοσίνη), AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη) και IMP (μονοφωσφορική ινοσίνη), ινοσίνη (INO) και υποξανθίνη (Hx) είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς και αξιόπιστους δείκτες φρεσκότητας των ιχθύων, που ποικίλλει ανάλογα με τα είδη ιχθύων, τους τύπους μυών και τις συνθήκες αποθήκευσης (Boziaris, 2014).

Πίνακας 2.2 Δράση των αυτολυτικών ενζύμων μετά την θανάτωση του ιχθύ (Tavares et al., 2021).

Ένζυμο	Υπόστρωμα	Αποτέλεσμα
Γλυκολυτικά ένζυμα	Γλυκόζη	Παραγωγή γαλακτικού οξέος – μείωση pH
Ένζυμα που διασπούν νουκλεοτίδια	ATP, ADP, AMP, IMP	Βαθμιαία παραγωγή υποξανθίνης
Καθεψίνες	Πρωτεΐνες, πεπτιδία	Μαλάκωμα του ιστού
Καλπίνες	Μυοϊνιδιακές πρωτεΐνες	Μαλάκωμα του ιστού
TMAO απομεθυλάση	TMAO	Παραγωγή φορμαλδεΐδης

1.6.3. Οξειδωτική αλλοίωση

Η ποιότητα των ιχθύων μπορεί να επηρεαστεί κατά την αποθήκευση σε διάφορες θερμοκρασίες λόγω της εκπομπής δυσάρεστων οσμών κατή την οξείδωση των λιπιδίων ή των σχηματισμό του υπεροξειδίου των λιπιδίων. Τα μέταλλα μετάπτωσης είναι οι κύριοι ενεργοποιητές του μοριακού οξυγόνου που οδηγούν σε παραγωγή υπεροξειδικών ριζών. Οι υπεροξειδικές ρίζες με την σειρά τους αντιδρούν με τα λιπαρά οξέα και κυρίως με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι περισσότερο ευαίσθητα στην διαδικασία αυτή, παράγοντας υπεροξειδία και νέες ελεύθερες ρίζες (Hultin, 1994).

Η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί να συμβεί είτε ενζυμικά είτε μη ενζυμικά στους ιχθύες. Κατά την διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης (λιπόλυση), τα γλυκερίδια διασπώνται από λιπάσες, σχηματίζοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα που είναι υπεύθυνα για την κοινή δυσσομία (τάγγιση). Τα κύρια λιπολυτικά ένζυμα περιλαμβάνουν την τριακυλολιπάση, τη φωσφολιπάση A2 και τη φωσφολιπάση B και μπορεί είτε να είναι ενδογενή είτε να προέρχονται από ψυχοτρόπους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, η παρουσία προοξειδωτικών ενζύμων, όπως οι λιποξυγενάσες και οι υπεροξειδάσες, διευκολύνουν την οξείδωση των λιπιδίων (Huis in't Veld, 1996). Η μη ενζυμική οξείδωση πυροδοτείται από την κατάλυση ενώσεων αιματίνης, όπως η αιμοσφαιρίνη, η μυοσφαιρίνη και το κυτόχρωμα, δημιουργώντας υδροϋπεροξειδία (Khayat and Schwall, 1983). Τα υπεροξειδία είναι ασταθή και ευαίσθητα στην υδρόλυση, σχηματίζοντας πτητικές ενώσεις (όπως αλδεΐδες, κετόνες και αλκοόλες), που προκαλούν δυσάρεστες γεύσεις (Huis in't Veld, 1996).

1.7. Μέθοδοι παράτασης της διάρκειας ζωής των ιχθύων

1.7.1. Συντήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία

Γενικά, μια υψηλή θερμοκρασία συντήρησης επιταχύνει την αλλοίωση των θαλασσινών. Όταν ένα προϊόν αφήνεται να παραμείνει σε θερμοκρασίες ευνοϊκές για την ανάπτυξη των βακτηρίων για αρκετό χρονικό διάστημα, οδηγεί σε μη ασφαλή επίπεδα βακτηρίων ή μεταβολικών προϊόντων ακόμα και τοξινών στο τρόφιμο. Η διαχείριση του χρόνου και της θερμοκρασίας της έκθεσης στο προϊόν είναι σημαντική για την παραγωγή ενός ασφαλούς προϊόντος (Masniyom, 2011). Η αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία καθυστερεί αποτελεσματικά την υποβάθμιση του προϊόντος, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν μπορεί να αποτρέψει τη χημική φθορά, όπως η αυτοοξειδωση ή η ενζυμική υδρόλυση των λιπιδίων (Sivertsvik et al., 2002). Επιπλέον, ανάλογα με την θερμοκρασία συντήρησης διαφέρουν οι κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στους ιχθύες. Σε θερμοκρασίες από 0 – 5 °C οι *S. putrefaciens*, *P. phosphoreum*, *Aeromonas* spp. και *Pseudomonas* spp. είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες (>15 °C) τα διάφορα είδη των *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* και οι θετικοί κατά Gram οργανισμοί ευθύνονται για την αλλοίωση (Gram et al., 1987, Gram et al., 1990).

Η ψύξη προάγει την αύξηση της διάρκειας ζωής, επιβραδύνοντας τις φυσικές και χημικές αντιδράσεις καθώς και τη δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και των ενζύμων. Κατά την ψύξη εφαρμόζονται θερμοκρασίες μεταξύ των 4 – 8 °C (Berk, 2009). Ωστόσο, οι συνθήκες θερμοκρασίας στην πραγματική ψυκτική αλυσίδα συχνά αποκλίνουν από το συνιστώμενο εύρος. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της διάρκειας ζωής των προϊόντων ιχθύων. Πράγματι, η Μεσογειακή γόπα συντηρήθηκε στους 0, 3, 7 και 10 °C στον αέρα με αποτέλεσμα η διάρκεια ζωής του προϊόντος να φτάνει τις 7, 5, 3 και τις 2 ημέρες, αντίστοιχα (Koutsoumanis and Nychas, 1998). Παρόμοια, η διάρκεια ζωής της τσιπούρας στον αέρα στις θερμοκρασίες 0, 5 και 15 °C ήταν αντίστοιχα 14, 5 και 2 ημέρες (Parlapani et al., 2014). Σύμφωνα με τους Tsironi et al. (2008) και Tsironi and Taoukis (2010), η διάρκεια ζωής των φιλέτων τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες στους 5 °C κυμαινόταν από 4 έως 7 ημέρες. Παρόλα αυτά, η διαδικασία της ψύξης μπορεί να συνδυαστεί και με άλλους μεθόδους για την επέκταση της διάρκειας ζωής των φρέσκων ιχθύων (Banerjee and Maheswarappa, 2019).

1.7.2. Τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασία (MAP)

1.7.2.1. Μίγμα αερίων

Η MAP συσκευασία έχει αποδειχθεί ότι παρατείνει τη διάρκεια ζωής και επιβραδύνει την αλλοίωση των θαλασσινών υπό ψύξη. Περιλαμβάνει την αντικατάσταση του αέρα με την προσθήκη ενός μεμονωμένου αερίου ή μείγματος αερίων στη συσκευασία. Κατά την αποθήκευση και τη διανομή, η σύνθεση αερίου στη συσκευασία δεν ελέγχεται. Τα πρωτογενή αέρια που χρησιμοποιούνται στη περίπτωση των θαλασσινών είναι CO₂, N₂ και O₂ (Zhang et al., 2008). Η μείωση των επιπέδων του οξυγόνου επιβραδύνει την οξείδωση των λιπιδίων και την δημιουργία τάγγισης στους λιπαρούς ιχθύες (Sivertsvik et al., 2002).

Το N₂ είναι ένα αδρανές, άοσμο και άγευστο αέριο. Χρησιμοποιείται ως πληρωτικό για την παρεμπόδιση της κατάρρευσης της συσκευασίας, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς του στο νερό και στο λίπος (Farber, 1991).

Το O₂ μειώνεται σε μείγματα αερίων για τους λιπαρούς ιχθύες εξαιτίας της αντίδρασης της οξείδωσης των λιπιδίων (Goulas et al., 2005). Ωστόσο, το O₂ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε προϊόντα ιχθύων για την επιβράδυνση των αναερόβιων συνθηκών και την αποφυγή της εστίας αυστηρά αναερόβιων παθογόνων, όπως το μη πρωτεολυτικό *C. botulinum*. Ταυτόχρονα, η συνθήκη χαμηλότερου O₂ μπορεί να είναι αποτελεσματική για τον πολλαπλασιασμό των ψυχρότροφων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένης της *L. monocytogenes* και της *S. putrefaciens* (Rutherford et al., 2007). Η χρήση O₂ σε συσκευασίες αερίου συμβάλλει στο κόκκινο χρώμα της σάρκας του ιχθύ (π.χ. τόνου), το οποίο σχετίζεται με την οξυγονωμένη μορφή, την οξυμοσφαιρίνη.

Το CO₂ γίνεται συνήθως πιο αποτελεσματικά ως αντιμικροβιακός παράγοντας στους ιχθύες και τα οστρακοειδή λόγω των βακτηριοστατικών και μυκητοστατικών ιδιοτήτων του. Η δράση του ως βακτηριοστατικός παράγοντας πιστεύεται ότι οφείλεται σε 4 μηχανισμούς: α) διείσδυση του CO₂ στη μεμβράνη των βακτηρίων που οδηγεί σε ενδοκυτταρικές αλλαγές του pH, β) μεταβολή στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης που έχει ως αποτέλεσμα επιβλαβή επίδραση στην πρόσληψη και απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, γ) άμεση αναστολή ή επιβράδυνση της ενζυμικής δραστηριότητας και δ) άμεσες αλλαγές στις φυσικές και χημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών (Sivertsvik et al., 2002). Επιπρόσθετα, το CO₂ μπορεί να διαλυθεί στην υγρή φάση των μυών, η οποία σχετίζεται με αυξημένο ανθρακικό οξύ. Το διττανθρακικό ιόν, ένα προϊόν διάστασης που αλλάζει τη διαπερατότητα των κυττάρων και επηρεάζει τις μεταβολικές διεργασίες (Banks et al., 1980). Επιπλέον, το ανθρακικό οξύ μπορεί να μειώσει το pH, με αποτέλεσμα την ελαφρώς αλλαγή στη γεύση των ιχθύων, και η απορρόφησή του από το προϊόν μπορεί επίσης να προκαλέσει κατάρρευση της συσκευασίας (Ashie et al., 1996). Γενικά, τα συνιστώμενα μείγματα αερίων για τους λευκούς άπαχους ιχθύες και οστρακοειδή είναι 35 – 45 % CO₂, 25 – 35 % O₂, 25 – 35 % N₂, ενώ για τους λιπαρούς ιχθύες είναι 35 – 45 % CO₂, 55 – 65 % N₂. Αυτό μπορεί να αυξήσει τη διάρκεια ζωής από 2 – 3 σε 8 – 10 ημέρες στη θερμοκρασία συντήρησης -1 – 2 °C (Torri et al. 2009). Η διάρκεια ζωής των αλιευτικών προϊόντων σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO₂ μπορεί να παραταθεί ανάλογα με τις πρώτες ύλες, το μείγμα αερίων, τη θερμοκρασία αποθήκευσης και τη συγκέντρωση αερίου.

1.7.2.2. Επίδραση της MAP συσκευασίας στην μικροβιακή αλλοίωση

Οι κύριοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των φρέσκων ιχθύων είναι ψυχρότροφοι Gram-αρνητικοί μικροοργανισμοί, όπως οι *Pseudomonas* spp., κατά την συντήρηση σε ψύξη. Η συσκευασία MAP εμπλουτισμένη με CO₂ καθυστερεί την ανάπτυξη τους, όντας υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, και αντί αυτού κυριαρχούν τα Γαλακτικά βακτήρια (LAB), τα Enterobacteriaceae και το *B. thermosphacta* (Dalgaard, 2000, Sivertsvik et al., 2002). Η επικράτηση των Γαλακτικών βακτηρίων θεωρείται ευνοϊκότερη συνθήκη, διότι τα προϊόντα του μεταβολισμού τους παράγονται με αργό ρυθμό και δεν έχει τις ίδιες δυσμενείς επιπτώσεις σε σύγκριση με τους *Pseudomonas* spp. (Mireles Dewitt

and Oliveira, 2016). Η ανάπτυξη των LAB με την ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος και της βακτηριοσίνης είναι φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας, οδηγώντας στην αναστολή άλλων βακτηρίων στους ιχθύες (Asensio et al., 1988). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. είναι δυνατόν να ελεγχθεί ακόμα και με 5% CO₂ στη συσκευασία (Barnett et al., 1982). Αν και το CO₂ επιβραδύνει την ανάπτυξη της *Shewanella* spp. το *Photobacterium phosphoreum* είναι πιο ανθεκτικό σε αυτό με αποτέλεσμα η μικροβιακή αναστολή να επιτυγχάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα (80 %) (Emborg et al., 2005).

Οι συνολικές πτητικές ενώσεις αζώτου (Total volatile base, TVB) και άλλες ενώσεις που σχετίζονται με την αλλοίωση των ιχθύων και των θαλασσινών που διατηρούνται σε MAP με υψηλή συγκέντρωση CO₂ αυξήθηκαν πιο αργά από εκείνων που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλό CO₂, αποδεικνύοντας ότι η υψηλότερη συγκέντρωση CO₂ δυνητικά ανέστειλε την ανάπτυξη αερόβιων Gram-αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων και των πτητικών ενώσεων που παράγουν οι μικροοργανισμοί. Η μείωση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX) ως αποτέλεσμα της παρουσίας του CO₂ στο μείγμα αερίων επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε πολλές μελέτες που περιλαμβάνουν ιχθύες και θαλασσινά, όπως παλαμίδα, μπακαλιάρος, καραβίδες, μύδια, κέφαλος, γαρίδα, σολομός, σαρδέλες, χτένια, λαβράκι και τσιπούρα (Mireles Dewitt and Oliveira, 2016).

Χρειάζεται να επισημανθεί ότι η παράταση της διάρκειας ζωής των ιχθύων και των αλιευτικών προϊόντων με τη χρήση συστημάτων τροποποιημένης ατμόσφαιρας μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματικά μόνο όταν χρησιμοποιείται η υψηλότερης ποιότητας πρώτη ύλη. Η εφαρμογή MAP στους ιχθύες δεν βελτιώνει ένα προϊόν κακής ποιότητας ούτε επαναφέρει την διάρκεια ζωής ενός αλλοιωμένου προϊόντος. Αντίθετα, ένα χημικά ή/και ενζυμικά αποδομημένο προϊόν με η παρουσία υψηλών επιπέδων βακτηρίων αλλοίωσης θα οδηγήσει είτε σε ελάχιστη παράταση της διάρκειας ζωής είτε σε καμία παράταση. Η σημασία ενός χαμηλού βακτηριακού φορτίου, κατά προτίμηση στην περιοχή από 2 έως 3 log CFU/g, έχει αναγνωριστεί ως βασικός παράγοντας για τη μεγιστοποίηση της παράτασης της διάρκειας ζωής των θαλασσινών συσκευασμένων σε MAP συσκευασία (Messina, et al., 2015).

1.7.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην αποτελεσματικότητα της MAP συσκευασίας

Η θερμοκρασία αποθήκευσης των ιχθύων έχει δραματική επίδραση στη διάρκεια ζωής του προϊόντος παρά τη μέθοδο συσκευασίας. Γενικά, σε θερμοκρασίες μεταξύ 0 – 4 °C, η τροποποιημένη ατμόσφαιρα θα μπορούσε να διπλασιάσει ή να τριπλασιάσει τον χρόνο αποθήκευσης, ανάλογα με το μείγμα αερίων. Στην περίπτωση του μπακαλιάρου ο χρόνος συντήρησης μπορεί να ποικίλλει από 2 ημέρες στους 26 °C στον αέρα έως 55 – 60 ημέρες στους 4 °C υπό MAP με περιεκτικότητα 75% CO₂ και 25% N₂. Η συντήρηση φιλέτων σολομού Ατλαντικού σε υπερψύξης (-2 °C) υπό MAP (CO₂:N₂ 60:40) συνθήκες επέκτεινε τη διάρκεια ζωής του προϊόντος κατά τέσσερις φορές σε σύγκριση με το συσκευασμένο με αέρα προϊόν που διατηρείται σε θερμοκρασία ψυγείου (4 °C). Τα υπερψυγμένα φιλέτα MAP διατήρησαν καλή ποιότητα με αμελητέα μικροβιακή ανάπτυξη (<1000 CFU/g) για περισσότερες από 24 ημέρες, τα συσκευασμένα στον αέρα φιλέτα με υπερψύξη είχαν διάρκεια ζωής 21 ημέρες, ενώ τα φιλέτα στον αέρα και τα φιλέτα MAP διατηρήθηκαν σε

ψύξη (4 °C) αλλοιώθηκαν μετά από 7 και 10 ημέρες, αντίστοιχα. Μικρές αυξήσεις στη θερμοκρασία κατά 1 °C που οδηγεί σε μείωση της διάρκειας ζωής κατά 2 ή περισσότερες ημέρες Mireles (Mireles Dewitt and Oliveira, 2016).

1.7.3. Νοθεία

Η χαμηλού κόστους αντικατάσταση ή προσθήκη ειδών ιχθύων, αντί του αναγραφόμενου είδους για οικονομικό όφελος αναφέρεται ως νοθεία. Η νοθεία αποτελεί μορφή απάτης στην βιομηχανία τροφίμων με αρνητικό αντίκτυπο στην ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων, οδηγώντας σε σοβαρούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία, όπως έκθεση σε τοξίνες, παθογόνα ή αλλεργιογόνα σε αυτά τα προϊόντα (Magiati et al., 2019, Spink and Moyer, 2011). Η ζήτηση για προϊόντα ιχθύων είναι υψηλή με αποτέλεσμα οι ιχθύες να είναι ένα από τα ακριβότερα προϊόντα που γίνεται στόχος για νοθεία (Cawthorn et al., 2013). Δεδομένου ότι το επίπεδο ευαισθητοποίησης σχετικά με την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων έχει πρόσφατα αυξηθεί, η απάτη στα τρόφιμα έχει γίνει ένα σημαντικό παγκόσμιο ζήτημα. Ως εκ τούτου, ο εντοπισμός νοθείας των προϊόντων ιχθύων με ακατάλληλα ζωικά είδη είναι σημαντική από υγειονομική και οικονομική άποψη (Mousavi et al., 2015).

1.7.3.1. Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας

Οι πιο ευρέως διαδεδομένοι μέθοδοι ανίχνευσης της νοθείας είναι οι μέθοδοι που στοχεύουν στις πρωτεΐνες και στο DNA των ιχθύων. Συγκεκριμένα, οι ανοσοδοκιμασίες βασίζονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του αντισώματος προς εξέταση και του αντιγόνου στο δείγμα, που σε αυτή την περίπτωση είναι μια συγκεκριμένη ζωική πρωτεΐνη (Fumière et al., 2009). Σε αυτές ανήκουν η ηλεκτροφόρηση και οι ανοσολογικές τεχνικές. Χρησιμοποιούνται διάφορες τροποποιήσεις ηλεκτροφορητικών μεθόδων ανάλογα με τον τύπο του αναλυόμενου προϊόντος, όπως είναι η ισοηλεκτρική εστίαση και η ηλεκτροφόρηση σε δωδεκυλοθειικού νατρίου – πολυακρυλαμιδίου γέλη (SDS-PAGE) (Hubalkova et al., 2007). Το μειονέκτημά τους είναι η πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ πρωτεϊνών στενά συγγενών ειδών ιχθύων (Wolf et al., 2000). Αυτές οι μέθοδοι είναι λιγότερο εφαρμόσιμες για την αξιολόγηση ενός ευρέος φάσματος ειδών ιχθύων, επειδή είναι απαραίτητο να προετοιμαστούν μεγάλοι αριθμοί ειδικών αντισωμάτων. Σε αυτή την περίπτωση μπορούν να χρησιμοποιηθεί η ενζυμική ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία (ELISA), οι οποίες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και για ποσοτική αξιολόγηση (Sotelo et al., 1993). Μια άλλη τεχνική που βασίζεται στις πρωτεΐνες είναι η χρωματογραφία. Η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) περιγράφηκε ως μέθοδος κατάλληλη για ταυτοποίηση ειδών ιχθύων (Osman et al., 1987, Armstrong et al., 1992) μετά από αποθήκευση σε ψύξη ή κατάψυξη. Η μέθοδος HPLC δεν είναι χρονοβόρα μέθοδος και μπορεί να είναι πλήρως αυτοματοποιημένο.

Αν και οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους έχουν σημαντική αξία σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν είναι κατάλληλες για ανάλυση δειγμάτων ρουτίνας. Οι πρωτεΐνες χάνουν τη βιολογική τους δράση μετά τον θάνατο των ιχθύων καθώς η παρουσία και τα χαρακτηριστικά τους εξαρτώνται από τους τύπους κυττάρων. Επιπλέον, τα περισσότερα από αυτά είναι θερμικά ασταθή. Έτσι, για την ταυτοποίηση ειδών ιχθύων που έχουν

υποστεί θερμική επεξεργασία, προτιμάται μια μέθοδος DNA παρά η ανάλυση πρωτεϊνών (Lockley and Bardsley, 2000).

Η ανάπτυξη μεθόδων μοριακής βιολογίας, ιδιαίτερα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και οι τροποποιήσεις της, με βάση την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA, συνέβαλαν σημαντικά στην ανίχνευση νοθείας τροφίμων (Lockley and Bardsley, 2000). Αυτή η μέθοδος αντιπροσωπεύει ένα γρήγορο μέσο αναγνώρισης με δυνατή τη ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών ειδών ιχθύων. Μία από τις τεχνικές που ανήκουν σε αυτή τη μέθοδο είναι η πραγματικού χρόνου PCR (Hubalkova et al., 2007). Μια άλλη τεχνολογία DNA για την αναγνώριση ειδών είναι η μικροσυστοιχία DNA που παρέχει ταυτόχρονο έλεγχο DNA εκατοντάδων ειδών ταυτόχρονα (Peter et al., 2004). Τέλος, η αλληλούχιση (προσδιορισμός της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε μία από τις αλυσίδες DNA) επιτρέπει τη λήψη των περισσότερων πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένης της ταυτοποίησης των ειδών ψαριών. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή απαιτεί χρόνο και τεχνικό εξοπλισμό (Hubalkova et al., 2007).

Η ιδιαιτερότητα των παραπάνω μεθόδων είναι ότι το DNA πρέπει να συμμορφώνεται με τις ελάχιστες απαιτήσεις σχετικά με την απόδοση, την καθαρότητα και την ακεραιότητα. Η απόδοση είναι μια σημαντική παράμετρος, καθώς το DNA των τροφίμων πρέπει να είναι σε επαρκή ποσότητα ώστε να επιτρέπει την αξιόπιστη και ανάλυση των ειδών (Heydt et al., 2014). Οι μέθοδοι εκχύλισης μπορούν να επηρεάσουν περαιτέρω την απόδοση, την καθαρότητα και την ακεραιότητα του DNA ανάλογα με τον τύπο της μήτρας τροφίμων (Şakalar et al., 2012). Ως αποτέλεσμα, η ποσότητα του DNA του είδους που προσδιορίζεται στο προϊόν δεν θα αντικατοπτρίζει την πραγματική ποσότητα στο αρχικό υλικό, επηρεάζοντας τις ποσοτικές μετρήσεις (Primrose et al., 2010). Επιπρόσθετα, αυτές οι μέθοδοι είναι επίπονες, δαπανηρές και απαιτούν εξελιγμένες συσκευές με εξειδικευμένο τεχνικό προσωπικό (Calvo et al., 2002, von Bargen et al., 2014). Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη προηγμένων μεθόδων ανίχνευσης αποτελεί σημαντική πρώτη γραμμή άμυνας τόσο για τον εντοπισμό όσο και για την αποτροπή της απάτης στα τρόφιμα (Moore et al., 2012). Οι γρήγορες, αποτελεσματικές, ακριβείς και αξιόπιστες τεχνολογίες ανίχνευσης είναι το κλειδί για την αποτελεσματική επίβλεψη της νοθείας των ιχθύων.

1.8. Ταχείες μέθοδοι εκτίμησης της μικροβιακής αλλοίωσης και της ανίχνευσης της νοθείας στα προϊόντα ιχθύων

1.8.1. Μέθοδος Πολυφασματικής Απεικόνισης (MSI)

Η πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral imaging, MSI) είναι μία μη επεμβατική μέθοδος που συνδυάζει την τεχνολογία της απεικόνισης με την φασματοσκοπία (Nixon and Burns, 2017). Οι πληροφορίες που παρέχει είναι φασματικές και χωρικές για το προς εξέταση δείγμα. Η απεικόνιση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του προσπίπτοντος φωτός και των μορίων της ύλης (φασματοσκοπία δονήσεων), ενώ η απόκτηση των χωρικών πληροφοριών γίνεται μέσω της υπολογιστικής όρασης (computer vision). Η τελευταία μιμείται την ανθρώπινη όραση, χρησιμοποιώντας τρεις ζώνες (κόκκινο, πράσινο και μπλε) για να αποκτήσει τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

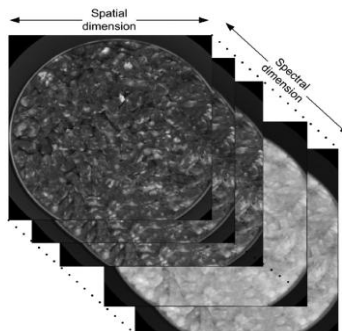
Στο ορατό φάσμα τα χαρακτηριστικά που λαμβάνονται είναι το χρώμα το σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος και η υφή (Ropodi et al., 2016). Η Πολυφασματική Απεικόνιση πλεονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων ανάλυσης, διότι η ανάλυση περιλαμβάνει χαμηλό κόστος, ενώ ταυτόχρονα είναι γρήγορη, δίνοντας πληροφορίες τόσο από την περιοχή του ορατού όσο και την περιοχή του εγγύς υπερύθρου (Ropodi et al., 2015).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το όργανο VideometerLab (Videometer A/S, Herlev, Δανία) για την ανάλυση Πολυφασματικής Απεικόνισης. Καταγράφει την επιφανειακή ανάκλαση δειγμάτων σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος (405–970 nm), συγκεκριμένα: 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 670, 708, 890, 910, 940 και 970 nm (Panagou et al., 2014). Τα δεδομένα συλλέγονται από μία εικόνα τρισδιάστατου κύβου (3D), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.7., όπου οι χωρικές πληροφορίες (απεικόνιση 2 διαστάσεων, x, y) υποδηλώνουν την ένταση των εικονοστοιχείων (pixel) κατά την επιλογή ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος. Από την άλλη, οι φασματικές πληροφορίες (τρίτη διάσταση, z) είναι η ένταση κάθε εικονοστοιχείου σε διαφορετικά συγκροτήματα. Είναι προφανές ότι αυτού του είδους τα δεδομένα δίνουν μεγάλο όγκο πληροφοριών, αλλά ταυτόχρονα είναι πολύ περίπλοκα (Ropodi et al., 2015, Aboras et al., 2015).

Το όργανο της Πολυφασματικής Απεικόνισης αποτελείται από μία φωτεινή πηγή, έναν αισθητήρα φωτός, έναν φασματογράφο, μία κάμερα μεγάλης ευκρίνειας, έναν μετατροπέα σήματος, καθώς και έναν υπολογιστή με εγκατεστημένο λογισμικό για την επεξεργασία της εικόνας (Tsakanikas et al., 2016). Προκειμένου να αποκλειστούν περιοχές που δεν παρέχουν πληροφορίες για το δείγμα, όπως είναι η επιφάνεια του τρυβλίου, απαιτείται επεξεργασία της εικόνας για περιοριστεί η πληροφορία στην ενδιαφερόμενη περιοχή (ROI). Η οριοθέτηση του τμήματος ROI και η εφαρμογή της Κανονικής Διακριτικής Ανάλυσης (CDA) διαχωρίζει τα pixels της εικόνας με βάση την περιοχή ROI, μέσω της Εξίσωσης 1.1 (Duda et al., 2000, Carstensen and Hansen, 2003):

$$R(a) = \frac{a^T \Sigma_s a}{a^T \Sigma_N a} \quad (\text{Εξίσωση 1.1})$$

όπου Σ_s είναι η κατανομή μεταξύ των κλάσεων και Σ_N είναι η κατανομή εντός μιας κλάσης.



Εικόνα 1.7 Κύβος Πολυφασματικής Απεικόνισης από κιμά κρέατος όπου διακρίνεται η χωρική και φασματική διάσταση (Ropodi et al., 2016).

1.8.2. Μέθοδος Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η IR περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από 14.000 – 50 cm⁻¹ και χωρίζεται σε 3 περιοχές: το εγγύς υπέρυθρο (NIR) φάσμα (14.000 – 4.000 cm⁻¹), το μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα (4.000 – 400 cm⁻¹) και το άπω υπέρυθρο (FIR) φάσμα (400 – 50 cm⁻¹). Τα φάσματα υπέρυθρου (IR) παράγονται καταγράφοντας αλλαγές στην απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από μόρια, τα οποία υφίστανται μηχανικές κινήσεις (δονητικές και περιστροφικές λειτουργίες) λόγω της απορρόφησης ενέργειας (Diem, 1993, Guillen and Cabo, 1997).

Μέσα σε οποιοδήποτε μόριο, μια δεδομένη λειτουργική ομάδα (όπως η ομάδα καρβονυλίου) δίνει χαρακτηριστική απορρόφηση IR σε συγκεκριμένες, στενές περιοχές συχνοτήτων ανεξάρτητα από τη σχέση τους με το υπόλοιπο μόριο. Λόγω των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων των ατόμων μέσα στο μόριο, το καθένα εμπλέκεται στις δικές του δονητικές μεταπτώσεις, ενέργεια μιας δόνησης. Η θέση στο φάσμα IR επηρεάζεται μερικές φορές από τα άτομα που περιβάλλουν τη δονητική ομάδα. Έτσι, τα φάσματα υπέρυθρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση ή τη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων και να δώσουν πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα των λειτουργικών ομάδων (Diem, 1993, Guillen and Cabo, 1997).

Η Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform-infrared spectroscopy, FTIR) βασίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μόρια απορροφούν στην μέση υπέρυθρη (MIR) περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το εύρος συχνότητας μετριέται ως κυματαριθμός στην περιοχή 4000 – 400 cm⁻¹ (Faix, 1991). Ο κυματαριθμός ($\bar{\nu}$) είναι το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός και ως αποτέλεσμα είναι αντιστρόφως ανάλογος του μήκους κύματος (Εξίσωση 1.2):

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$$

(Εξίσωση 1.2)

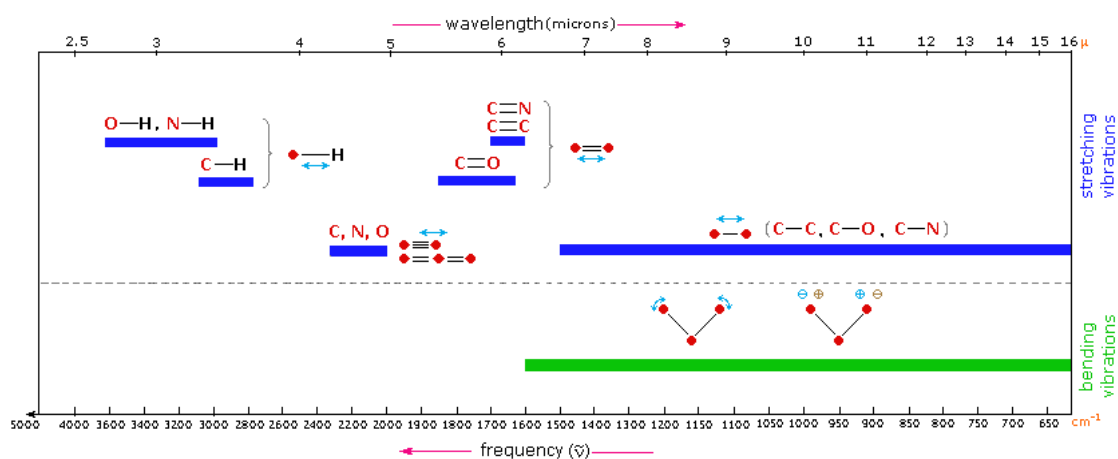
1.8.2.1. Φασματικές περιοχές IR

Οι φασματικές κορυφές στην περιοχή MIR προκύπτουν από τις θεμελιώδεις δονήσεις τάσης, την κάμψη και την περιστροφή των μορίων του δείγματος, ενώ τα φάσματα NIR προκύπτουν από πολύπλοκους συνδυασμούς υψηλής συχνότητας σε μικρότερα μήκη κύματος (McClure, 2003).

Τα φάσματα NIR είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού των περιοχών που προκαλούνται από τις δονήσεις που σχετίζονται κυρίως με λειτουργικές ομάδες C-H, N-H και O-H. Οι περιοχές NIR είναι αποτέλεσμα της σύνθετης δονητικής κίνησης χημικών δεσμών που τείνουν να αποκλίνουν από την αρμονία. Αυτές οι αποκλίσεις (ανααρμονικότητα) έχουν ως αποτέλεσμα περιοχές που προκύπτουν από μεταβάσεις σε δύο, τρία ή υψηλότερα επίπεδα ενέργειας (12.500 – 4.000 cm⁻¹, 800–2.500 nm) της συχνότητας των θεμελιωδών δονήσεων, οδηγώντας σε μια φθίνουσα ένταση απορρόφησης NIR. Οι αλληλεπιδράσεις

δύο ή περισσότερων δονήσεων μπορεί να λάβουν χώρα ταυτόχρονα από την απορρόφηση ενός μόνο φωτονίου (Osborne, 2000, Barton, 2002). Ωστόσο, η μετάβαση σε πολλά διαφορετικά επίπεδα και ο συνδυασμός των επιπέδων NIR προκαλεί πολύ χαμηλή δομική επιλεκτικότητα των φασμάτων NIR σε σύγκριση με τα φάσματα MIR. Τα επίπεδα NIR είναι 10 έως 100 φορές λιγότερο έντονες από τις αντίστοιχα θεμελιώδη επίπεδα MIR. Αυτό μπορεί να επιτρέψει την άμεση ανάλυση δειγμάτων που έχουν υψηλή απορρόφηση ή ισχυρή σκέδαση φωτός χωρίς αραίωση ή εκτεταμένη προετοιμασία του δείγματος (Hall et al., 1996, Shenk et al., 2001).

Τα φάσματα από την περιοχή MIR χρησιμοποιούνται συνήθως για δομική αναγνώριση (δακτυλικό αποτύπωμα) οργανικών ενώσεων, επειδή οι κορυφές απορρόφησης προκαλούνται από θεμελιώδεις δονήσεις μιας συγκεκριμένης λειτουργικής ομάδας. Η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων, που βρίσκεται στην περιοχή MIR μεταξύ $1.200 - 700 \text{ cm}^{-1}$, περιέχει κορυφές από λιπίδια, πρωτεΐνες, καροτενοειδή και πολυσακχαρίτες, και ως αποτέλεσμα είναι πλούσια σε δομικές πληροφορίες. Ενδεικτικά, οι δονήσεις των δεσμών C-H εντοπίζονται στην περιοχή $2850 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, των N-H και O-H στην περιοχή $3200 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, των $\text{C}\equiv\text{C}$ και $\text{C}\equiv\text{N}$ στην περιοχή $2400 - 2100 \text{ cm}^{-1}$ και των ομάδων C=C, C=O και C=N στην περιοχή $2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ (Εικόνα 1.8). Οι συχνότητες τάσης (stretching) είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες συχνότητες κάμψης (bending) καθώς είναι ευκολότερο να λυγίσει ένας δεσμός παρά να τον τεντώσει. Τα φάσματα από την περιοχή MIR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εφαρμογές ποσοτικής ανάλυσης καθώς οι εντάσεις των κορυφών είναι ανάλογες με τη συγκέντρωση της αντίστοιχης λειτουργικής τους ομάδας (Pare and Belanger, 1997).



Εικόνα 1.8 Περιοχές IR που εμφανίζονται χαρακτηριστικές ομάδες.

1.8.2.2. Όργανο FTIR

Ένα κοινό φασματόμετρο FTIR αποτελείται από μια πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, ένα συμβολόμετρο Michelson, ένα διαμέρισμα δείγματος, έναν ανιχνευτή υπέρυθρου, έναν ενισχυτή, έναν μετατροπέα A/D και έναν υπολογιστή. Η πηγή παράγει ακτινοβολία η οποία περνά το δείγμα μέσω του συμβολόμετρου και φτάνει στον ανιχνευτή. Στη

συνέχεια το σήμα ενισχύεται από τον ενισχυτή και μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα από τον μετατροπέα αναλογικού σε ψηφιακό. Τελικά, το σήμα μεταφέρεται σε έναν υπολογιστή στον οποίο πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier (<https://chem.libretexts.org/@go/page/1844>).

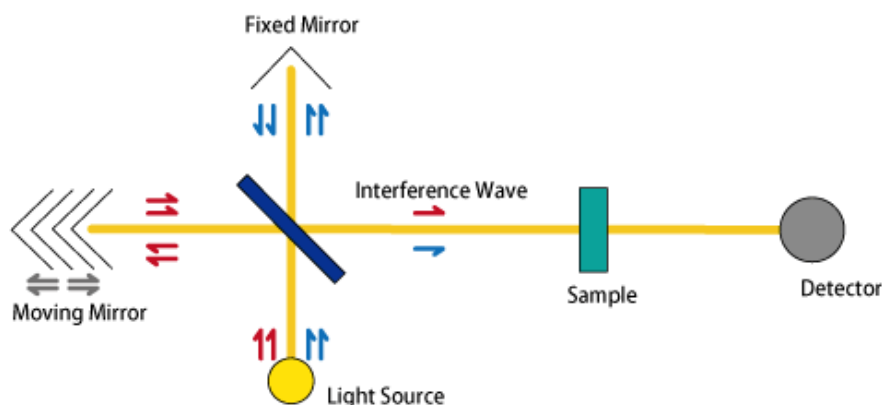
Το FTIR χρησιμοποιεί συμβολομετρική διαμόρφωση της ακτινοβολίας για τη μέτρηση πολλαπλών συχνοτήτων ταυτόχρονα, παράγοντας ένα συμβολογράφημα που υπολογίζεται εκ νέου χρησιμοποιώντας σύνθετους αλγόριθμους για να δώσει το αρχικό φάσμα (Markovich, 1991). Το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο είναι ο πυρήνας των φασματόμετρων FTIR, χρησιμοποιείται για να χωρίσει μια δέσμη φωτός στα δύο, έτσι ώστε οι διαδρομές των δύο δεσμών να είναι διαφορετικές. Στη συνέχεια, το συμβολόμετρο Michelson ανασυνδυάζει τις δύο δέσμες και τις οδηγεί στον ανιχνευτή όπου η διαφορά της έντασης αυτών των δύο δεσμών μετράται ως συνάρτηση της διαφοράς των διαδρομών (<https://chem.libretexts.org/@go/page/1844>). Η εξίσωση Fourier επιλύει τις επικαλυπτόμενες ζώνες υπερύθρων, που προκαλούνται από πολύπλοκα δείγματα, μειώνοντας το εύρος ζώνης και αυξάνοντας το ύψος κορυφής (Markovich, 1991).

Πιο αναλυτικά, ένα τυπικό συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από δύο κάθετα κάτοπτρα και έναν διαχωριστή δέσμης. Ένας από τους καθρέφτες είναι σταθερός καθρέφτης και ένας άλλος είναι κινητός καθρέφτης. Ο διαχωριστής δέσμης έχει σχεδιαστεί για να μεταδίδει το μισό φως και να αντανακλά το άλλο μισό φως. Στη συνέχεια, το εκπεμπόμενο φως και το ανακλώμενο φως προσπίπτουν στον ακίνητο και στον κινητό καθρέφτη, αντίστοιχα. Όταν αντανακλώνται από τα κάτοπτρα, δύο δέσμες φωτός ανασυνδυάζονται μεταξύ τους στον διαχωριστή ακτινών.

Εάν οι αποστάσεις που διανύονται από δύο δέσμες είναι ίδιες, οι αποστάσεις μεταξύ δύο κατόπτρων και του διαχωριστή δέσμης είναι ίδιες και άρα η κατάσταση ορίζεται ως μηδενική διαφορά διαδρομής (ZPD). Εάν, όμως, το κινητό κάτοπτρο απομακρυνθεί από τον διαχωριστή δέσμης, η δέσμη φωτός που χτυπά το κινητό κάτοπτρο θα διανύσει μεγαλύτερη απόσταση από τη φωτεινή δέσμη που χτυπά στον ακίνητο καθρέφτη. Η απόσταση που το κινητό κάτοπτρο απέχει από το ZPD ορίζεται ως η μετατόπιση του κατόπτρου και αντιπροσωπεύεται από το Δ . Είναι προφανές ότι η επιπλέον απόσταση που διανύει το φως που χτυπά στο κινητό κάτοπτρο είναι 2Δ . Η επιπλέον απόσταση ορίζεται ως η διαφορά οπτικής διαδρομής (OPD) και αντιπροσωπεύεται από το δέλτα, δηλαδή, $\delta = 2\Delta$.

Όταν το OPD είναι το πολλαπλάσιο του μήκους κύματος ($\delta = n\lambda$, με $n = 0,1,2,3\dots$), εμφανίζεται εποικοδομητική παρεμβολή. Ως αποτέλεσμα, ένα σήμα μέγιστης έντασης παρατηρείται από τον ανιχνευτή. Αντίθετα, όταν το OPD είναι το μισό μήκος κύματος ή το μισό μήκος κύματος προσθέτουμε πολλαπλάσια μήκους κύματος ($\delta = (n+1/2)\lambda$, με $n = 0,1,2,3\dots$), εμφανίζεται καταστροφική παρεμβολή επειδή οι κορυφές επικαλύπτονται με τις κοιλάτες. Κατά συνέπεια, ένα σήμα ελάχιστης έντασης παρατηρείται από τον ανιχνευτή. Αυτές οι δύο καταστάσεις είναι δύο ακραίες καταστάσεις. Εάν το OPD δεν είναι ούτε n -φορές μήκη κύματος ούτε $(n+1/2)$ -φορές μήκη κύματος, η παρεμβολή πρέπει να είναι μεταξύ εποικοδομητικής και καταστροφικής. Άρα η ένταση του σήματος πρέπει να είναι μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης τιμής.

Το όργανο FTIR πλεονεκτεί έναντι άλλων οργάνων IR καθώς δεν χρησιμοποιεί κινούμενα εξαρτήματα με αποτέλεσμα την χαμηλή μηχανική φθορά, λαμβάνει ταυτόχρονα όλους τους κυματαριθμούς του φωτός, έχει υψηλότερη απόδοση και καλύτερη ανάλυση του μήκους κύματος (<https://chem.libretexts.org/@go/page/1844>).



Εικόνα 1.9 Απλοποιημένη αναπαράσταση της λειτουργίας του φασματόμετρου FTIR.

1.8.3. Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fresh Detect)

Η φασματοσκοπία φθορισμού (επίσης γνωστή ως φθοριομετρία ή φασματοφθοριομετρία) είναι ένας τύπος ηλεκτρομαγνητικής φασματοσκοπίας που αναλύει τον φθορισμό ενός δείγματος. Είναι μια αναλυτική τεχνική μέτρησης επιλεκτικότητας και εξαιρετικά υψηλής ευαισθησίας και μπορεί να εφαρμοστεί στην ανίχνευση ενός πολύ μεγάλου φάσματος ενώσεων σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα. Ο φθορισμός είναι η εκπομπή φωτός από μια ουσία που έχει απορροφήσει φως ή άλλη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία υψηλότερης ενέργειας. Η φθορίζουσα ουσία ονομάζεται φθοροφόρο. Οι γενικές αρχές μπορούν να απεικονιστούν με ένα διάγραμμα Jablonski (Jablonski, 1933), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.10, και αποτελείται από 3 βήματα:

- 1) Ένα ηλεκτρόνιο από το φθοροφόρο απορροφά ένα φωτόνιο ($h\nu_{ex}$) και διεγείρεται από τη βασική ηλεκτρονική του κατάσταση (S_0) σε μία από τις διάφορες καταστάσεις δόνησης στη διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση.
- 2) Το διεγερμένο μόριο αλληλεπιδρά με το μοριακό περιβάλλον με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, όπως είναι η απόσβεση και η μεταφορά ενέργειας, μεταβαίνοντας στην κατώτερη κατάσταση δόνησης της πρώτης διεγερμένης κατάστασης.
- 3) Το ηλεκτρόνιο επιστρέφει σε ένα από τα διάφορα επίπεδα δόνησης της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης (S_0), εκπέμποντας ένα φωτόνιο ($h\nu_{em}$) κατά την διαδικασία. Καθώς τα μόρια μπορεί να μεταπίπτουν σε οποιοδήποτε από τα πολλά επίπεδα δόνησης στη βασική κατάσταση, τα εκπεμπόμενα φωτόνια θα έχουν διαφορετικές ενέργειες και επομένως διαφορετικές συχνότητες.

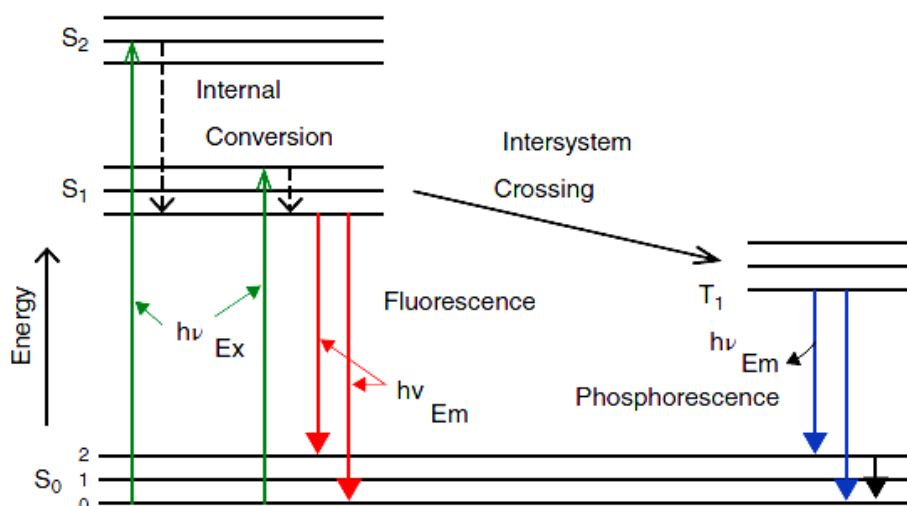
Με βάση το γεγονός ότι η διέγερση μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε από τις καταστάσεις δόνησης των διεγερμένων καταστάσεων και η εκπομπή σε οποιαδήποτε από

τις καταστάσεις δόνησης της βασικής κατάστασης, η διέγερση και η εκπομπή δεν συμβαίνουν μόνο σε ένα μόνο μήκος κύματος, αλλά σε μια κατανομή μηκών κύματος. Συνήθως, το φάσμα εκπομπής ενός μορίου είναι μια κατοπτρική εικόνα του φάσματος διέγερσής του που μετακινείται σε χαμηλότερες ενέργειες. Αυτή η συμμετρία είναι αποτέλεσμα των ομοιοτήτων των επιπέδων δόνησης των S_0 και S_1 που εμπλέκονται τόσο στη διέγερση όσο και στην εκπομπή. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχουν περισσότερες ζώνες, για παράδειγμα στην περίπτωση διέγερσης από τη μετάβαση S_0 στο S_3 (Mousdis and Mellou, 2017).

Η διαφορά στα μήκη κύματος ή στις μονάδες ενέργειας μεταξύ του απορροφούμενου και του εκπεμπόμενου φωτονίου ονομάζεται μετατόπιση του Stokes ($\Delta\bar{\nu}$). Η μετατόπιση Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) εκφράζεται από την εξίσωση 1.3 (Sikorska et al., 2019):

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{em} \quad (\text{Εξίσωση 1.3})$$

Η διαδικασία εκπομπής φωτός διαρκεί ϵ νανοδευτερόλεπτα και είναι ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία. Σε ορισμένες περιπτώσεις το ηλεκτρόνιο δεν πηγαίνει σε μια ενεργειακά χαμηλότερη δονητική κατάσταση της διεγερμένης κατάστασης, αλλά σε μια ενδιάμεση διεγερμένη τριπλή κατάσταση. Σε αυτή την περίπτωση η αποσύνθεση διαρκεί περισσότερο και εξαρτάται από τη θερμοκρασία, και το φαινόμενο είναι γνωστός ως φωσφορισμός.



Εικόνα 1.10 Διάγραμμα Jablonski που απεικονίζει τη διαδικασία φθορισμού και φωσφορισμού (Mousdis and Mellou, 2017).

Λόγω του γεγονότος ότι ο φθορισμός χαρακτηρίζεται από δύο ανεξάρτητα μήκη κύματος, η ειδικότητα της μεθόδου βελτιώνεται σημαντικά σε σύγκριση με τη φασματοσκοπία απορρόφησης. Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι επίσης μια πολύ ευαίσθητη τεχνική, η οποία επιτρέπει σε ορισμένες περιπτώσεις μετρήσεις σε επίπεδα μερών ανά

δισεκατομμύριο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα φωτόνια που εκπέμπονται μετρώνται σε χαμηλό φόντο και υπάρχει πλήθος ανιχνευτών υψηλής απόδοσης για το οπτικό μέρος της περιοχής φασμάτων. Η ικανότητα φθορισμού ενός φθοροφόρου μπορεί να μετρηθεί από την κβαντική απόδοση Q , που ορίζεται από την Εξίσωση 1.4 (Mousdis and Mellou, 2017):

$$Q = \frac{\text{Αριθμός των εκπεμπόμενων κβάντων}}{\text{Αριθμός των απορροφούμενων κβάντων}}$$

(Εξίσωση 1.4)

1.8.3.1. Φθορίζουσες ενώσεις

Μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ενώσεων εμφανίζει φθορισμό. Οι φθορίζουσες οργανικές ενώσεις συνήθως χαρακτηρίζονται από συζευγμένα συστήματα διπλών δεσμών C=C, συχνά με αρωματικό χαρακτήρα και άκαμπτους μοριακούς σκελετούς. Οι φθορίζουσες ενώσεις περιλαμβάνουν πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες, ετεροκυκλικές ενώσεις και μερικές εξαιρετικά ακόρεστες αλειφατικές ενώσεις. Αυτά τα μόρια μπορεί να είναι υδρόφιλα, υδρόφοβα ή ακόμα και αμφίφυλα. Τα χαρακτηριστικά φθορισμού επηρεάζονται τόσο από τη φύση όσο και από τη θέση των υποκαταστατών σε ένα μόριο.

Ο φθορισμός είναι επίσης ευαίσθητος στο μικροπεριβάλλον του μορίου που το εκπέμπει, αν και η έκταση αυτής της ευαισθησίας εξαρτάται από το φθοροφόρο (Lakowicz, 2006). Η επίδραση του μικροπεριβάλλοντος οδηγεί σε αλλαγές στην ένταση φθορισμού (μείωση ή αύξηση) και/ή μετατόπιση στα μέγιστα του φθορισμού. Τα πολικά φθοροφόρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην πολικότητα του τοπικού περιβάλλοντος. Το pH επηρεάζει έντονα τη διάσταση ή τις ισορροπίες πρωτονίωσης και αλλάζει τους ρυθμούς των μη ακτινοβολούμενων διεργασιών που ανταγωνίζονται τον φθορισμό και επομένως τις κβαντικές αποδόσεις και τους χρόνους ζωής του. Η θερμοκρασία επηρεάζει, επίσης, το σήμα φθορισμού κυρίως μέσω της επίδρασής του στη δυναμική απόσβεση (Christensen et al., 2006).

Στα τρόφιμα οι πιο γνωστές φθοροφόρες ουσίες είναι το NADH (Νικοτιναμιδο-αδενινωδινουκλεοτίδιο), το ATP, τα αμινοξέα τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη, και οι βιταμίνες A (ρετινόλη), B₂ (ριβοφλαβίνη), B₆ (πυριδοξίνη) και E (α-τοκοφερόλη) (Mousdis and Mellou, 2017).

1.8.3.2. Όργανο Freshdetect BFD-100

Το όργανο Fresh Detect BFD-100 (Freshdetect GmbH, Germany) περιέχει μια κεφαλή μέτρησης με τέσσερις δίοδους λέιζερ, ένα λευκό φως LED, ένα σύνολο οπτικών ινών και ένα φασματόμετρο που καταγράφει τα σήματα φθορισμού (Εικόνα 1.11). Χρησιμοποιεί ως μήκος κύματος διέγερσης στα 405 nm και καταγράφει σήματα φθορισμού από την περιοχή 460 έως 900 nm (Grimmler et al., 2018). Οι δίοδοι λέιζερ χρησιμοποιούνται για διέγερση του φθορισμού και παρέχουν μονοχρωματικό, κατευθυντήριο και συνεκτικό φως με το πλεονέκτημα της υψηλής έντασης ακτινοβολίας. Οι δίοδοι εκπομπής φωτός

(LED) χρησιμοποιούνται, επίσης, ως πηγές φωτός στη φασματοφθοριμετρία. Μια συστοιχία LED μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ληφθεί ένα εύρος μηκών κύματος διέγερσης. Τα LED μπορούν να χρησιμοποιηθούν με φίλτρα για τη μείωση του φασματικού πλάτους του φωτός διέγερσης. Τα πλεονεκτήματα των LED περιλαμβάνουν χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και πολύ λιγότερη παραγόμενη θερμότητα, κάτι που τα κάνει να προτιμώνται για συσκευές χειρός. Οι δίοδοι λείζερ εκπέμπουν μονοχρωματική ακτινοβολία και είναι διαθέσιμες σε ένα ευρύ φάσμα φάσματος. Οι οπτικές ίνες που βρίσκονται στον κέντρο της κεφαλής έχουν τον ρόλο της παράδοσης και της συλλογής των σημάτων, όπως όλα τα όργανα φθορισμού περιέχουν έναν συλλέκτη για το διεγερμένο μήκος κύματος και έναν συλλέκτη για το εκπεμπόμενο μήκος κύματος.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα μετριέται συνήθως στις 90 μοίρες σε σχέση με τη δέση διέγερσης. Αυτή η γεωμετρία ορθής γωνίας χρησιμοποιείται για την καταστολή του μη απορροφούμενου φωτός διέγερσης που περνά μέσα από το δείγμα (Mousdis and Mellou, 2017).

1.8.4. Ηλεκτρονική μύτη (E-nose)

Η ηλεκτρική μύτη είναι ένα όργανο που μιμείται την αίσθηση της όσφρησης. Κατά το οσφρητικό σύστημα των θηλαστικών οι πτητικές ενώσεις από ένα προϊόν φτάνουν στο οσφρητικό επιθήλιο, μία περιοχή περίπου 5 cm², μέσω της μύτης ή της οπισθορινικής οδού. Εκεί οι ενώσεις αλληλεπιδρούν με τους κατάλληλους υποδοχείς παράγοντας ηλεκτρικά ερεθίσματα που μεταφέρονται στον εγκέφαλο. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μια διαδικασία αναγνώρισης προτύπων με βάση την μνήμη, χρησιμοποιώντας όλα τα δεδομένα προκειμένου να εντοπιστεί, να ταξινομηθεί ή να πραγματοποιηθεί μια νέα ανάλυση (Dymerski et al., 2011). Έτσι, και η συσκευή της ηλεκτρονικής μύτης έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει και να διακρίνει σύνθετες οσμές χρησιμοποιώντας μια συστοιχία χημικών αισθητήρων. Η συστοιχία αισθητήρων αποτελούμενη από ευρέως συντονισμένους (μη ειδικούς) αισθητήρες, υπό την επίδραση ενός ερεθίσματος οσμής, δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό δακτυλικό αποτύπωμα ή αποτύπωμα οσμής (Wilson and Baietto, 2009). Για να συμβεί αυτό οι πτητικές χημικές ενώσεις εισάγονται στον θάλαμο των αισθητήρων μέσω του συστήματος δειγματοληψίας. Το σήμα απόκρισης του αισθητήρα μεταδίδεται στη συνέχεια σε έναν υπολογιστή, όπου πραγματοποιείται η αναγνώριση προτύπων (Wojnowski et al., 2017).

Η πολυπλοκότητα των περισσότερων αρωμάτων στα τρόφιμα καθιστά δύσκολο τον χαρακτηρισμό τους με συμβατικές τεχνικές ανάλυσης, όπως η αέρια χρωματογραφία ή η αέρια χρωματογραφία οσφρητικής μέτρησης. Η ηλεκτρονική μύτη είναι κατάλληλη μέθοδος για τον άμεσο προσδιορισμό των χημικών ενώσεων που προσδίδουν το άρωμα σε ένα τρόφιμο, τη μετάφραση τους σε ψηφιακά σήματα και την ταχεία ανάλυση τους με τα κατάλληλα λογισμικά (Xu et al., 2014).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το όργανο Alpha-Fox 3000, ένας αισθητήρας αερίων ημιαγωγικών οξειδίων του μετάλλου (metal oxide semi-conductors, MOS). Η λειτουργία τους βασίζεται στην μέτρηση των αλλαγών της τάσης που προκαλείται από την αντίδραση πτητικών χημικών ενώσεων που καταλύονται από οξείδια του μετάλλου.

Οι αισθητήρες οξειδίων του μετάλλου (MOx) αποτελούνται από ένα ημιαγωγίμο φιλμ οξειδίων του μετάλλου (π.χ. SnO₂, TiO₂, ZnO, ZrO₂) επικαλυμμένο σε ένα κεραμικό υπόστρωμα (π.χ. οξείδιο του αργιλίου). Τις περισσότερες φορές η συσκευή περιέχει επίσης ένα στοιχείο θέρμανσης. Το οξυγόνο από τον αέρα διαλύεται στο πλέγμα των ημιαγωγών. Κατά τη μέτρηση, τα πτητικά απορροφούνται στην επιφάνεια του ημιαγωγού όπου αντιδρούν με τα διαλυμένα είδη οξυγόνου προκαλώντας περαιτέρω τροποποίηση της αντίστασης της συσκευής (Ampuero and Bosset, 2003).

Η διάρκεια ζωής των ιχθύων επηρεάζεται από τις φυσικές, χημικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές αλλαγές (Limbo et al., 2009). Επίσης οι βιογενείς αμίνες όπως η διμεθυλαμίνη (DMA), η τριμεθυλαμίνη (TMA), η αμμωνία και η ισταμίνη είναι δείκτες αλλοίωσης των ιχθύων (Rodriguez-Mendez et al., 2009). Η συστοιχία της ηλεκτρονικής μύτης Alpha-Fox 3000 αποτελείται από 12 αισθητήρες οι οποίοι είναι ικανοί να προσδιορίσουν την μικροβιακή δραστηριότητα μέσω των πτητικών ενώσεων που παράγουν. Κατά συνέπεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο προσδιορισμού της φρεσκότητας των ιχθύων. Αναλυτικότερα, στο Κεφάλαιο Υλικά – Μέθοδοι (Πίνακας 2.1) παρουσιάζονται οι αισθητήρες και οι ενώσεις που ανιχνεύουν. Ενδεικτικά, οι αισθητήρες που χρησιμοποιούνται ανιχνεύουν την αμμωνία που είναι αποτέλεσμα της δράσης των *S. thermosphacta* και των Γαλακτικών βακτηρίων και το H₂S που παράγεται εξαιτίας των *Pseudomonas* spp. και των Γαλακτικών βακτηρίων (Connil et al., 2002).

1.8.4.1. Αρχή λειτουργίας

Η λειτουργία του οργάνου βασίζεται στην αλλαγή της ηλεκτρικής αντίστασης των αισθητήρων παρουσία των πτητικών ενώσεων. Το οξείδιο του μετάλλου είναι ένας ημιαγωγός που είναι ευαίσθητος στα αέρια. Το οξυγόνο της ατμόσφαιρας αντιδρά με τις κενές θέσεις οξυγόνου της επιφάνειας του οξειδίου του μετάλλου και δεσμεύει τα ηλεκτρόνια από τη ζώνη αγωγιμότητας (Εξίσωση 1.5):



Παρουσία ενός αερίου ή ενός αρωματικού μορίου (G), το χημιοαπορροφημένο οξυγόνο (O⁻) αντιδρά μη αναστρέψιμα για να παράγει συνδυασμένα μόρια (GO), όπως φαίνεται στην Εξίσωση 1.6:



Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια τείνουν να μειώνουν το δυνητικό φράγμα οξειδίων, γεγονός που αυξάνει την κινητικότητα των ηλεκτρονίων και τη συνολική ηλεκτρική αγωγιμότητα του υλικού. Έτσι, η αντίσταση των αισθητήρων μειώνεται παρουσία πτητικών ενώσεων. Το μέγεθος της απόκρισης εξαρτάται από τη φύση των ανιχνευόμενων μορίων, τη συγκέντρωσή τους και τον τύπο του οξειδίου του μετάλλου. Ο χρόνος απόκρισης εξαρτάται από την κινητική της αντίδρασης, τον όγκο του υπερκείμενου χώρου που μετρήθηκε και τον ρυθμό ροής του αερίου.

Οι μετρήσεις επιτυγχάνονται όταν ένα αέριο περνά πάνω από τους αισθητήρες. Αυτό ονομάζεται αρχική αντίσταση των αισθητήρων ή R_0 . Όταν ένα δείγμα περνά πάνω από τους αισθητήρες, η αντίστασή τους μειώνεται μέχρι να φτάσει σε μια ελάχιστη τιμή (R). Αυτή η τιμή αντιστοιχεί στον τύπο του αερίου και τη συγκέντρωσή του στο δείγμα. Αφού τελειώσει η παροχή του δείγματος, ο συνθετικός αέρας περνά και πάλι πάνω από τους αισθητήρες. Στη συνέχεια, η αντίσταση επιστρέφει στην αρχική τιμή R_0 . Ο τρόπος με τον οποίο ο αισθητήρας επιστρέφει στη γραμμή βάσης του είναι χαρακτηριστικός για τη χημική αντίδραση μεταξύ του ατμού και της επιφάνειας του αισθητήρα (Maricou et al., 1997).

1.9. Σκοπός μελέτης

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των ταχέων μεθόδων Videometer, FTIR και E-nose να προσδιορίσουν την μικροβιακή αλλοίωση των δειγμάτων τσιπούρας και λαβρακιού σε αέρα και MAP συσκευασία υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες. Παράλληλα, εξετάστηκε η ικανότητα των δύο πρώτων μεθόδων, καθώς και του Fresh Detect να διακρίνουν τα νοθευμένα μπιφτέκια τσιπούρας από παγκάσιους. Επομένως, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της μικροβιακής αύξησης και της νοθείας, αξιοποιώντας τα φασματικά δεδομένα του MSI, του FTIR, του Fresh Detect, καθώς και το πτητικό προφίλ των δειγμάτων τσιπούρας και λαβρακιού.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων ιχθύων

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων αλλοίωσης προμηθεύτηκαν ιχθύες από την εγχώρια ιχθυοκαλλιέργεια. Συγκεκριμένα ολόκληρα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) και τσιπούρες (*Sparus aurata*) συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες, καθώς και φιλέτα τους που συντηρήθηκαν σε αερόβιες και τροποποιημένες ατμόσφαιρες συσκευασίας, υπό μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες. Οι ολόκληροι ιχθύες και τα φιλέτα σε αέρα κατέφτασαν στο εργαστήριο μέσα σε πάγο και έπειτα τοποθετήθηκαν σε δίσκο πολυστυρενίου όπου καλύφθηκαν με οικιακής χρήσης μεμβράνη πολυαιθυλενίου. Τα φιλέτα που συντηρήθηκαν σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες παρελήφθησαν σε συσκευασία που περιείχε δύο φιλέτα. Τα δείγματα αφού υποβλήθηκαν σε μικροβιολογικές αναλύσεις, εξετάστηκαν στα όργανα Videometer, FT-IR και E-nose. Τα πειράματα έγιναν σε 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις από 2 διαφορετικούς αναλυτές.

2.1.2. Συνθήκες συντήρησης

Οι συνθήκες συντήρησης των ιχθύων που εφαρμόστηκαν ήταν:

- Τα ολόκληρα λαβράκια και οι τσιπούρες συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στο θερμοκρασιακό μεταβαλλόμενο πρόγραμμα 1: 2 °C (70 ώρες) – 9 °C (20 ώρες) – 6 °C (50 ώρες) συνολικά για 192 ώρες.
- Τα φιλέτα τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες και τα φιλέτα λαβρακιού υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες, αποτελούμενες από 11.8 % O₂, 28.1% CO₂ και 60.1% N₂ (v/v), συντηρήθηκαν στο θερμοκρασιακό μεταβαλλόμενο πρόγραμμα 2: 10 °C (8 ώρες) – 5 °C (12 ώρες) για συνολικά 168 ώρες.
- Τα φιλέτα λαβρακιού σε αερόβιες συνθήκες και τα φιλέτα τσιπούρας υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες, αποτελούμενες από 13.5% O₂, 26.3% CO₂ και 60.2% N₂ (v/v), συντηρήθηκαν στο θερμοκρασιακό μεταβαλλόμενο πρόγραμμα 3: 4 °C (12 ώρες) – 15 °C (1 ώρα) – 10 °C (6 ώρες) για συνολικά 192 ώρες.

Να σημειωθεί ότι τα πειράματα σε μεταβαλλόμενα θερμοκρασιακά προγράμματα αποτελούν στάδιο επιβεβαίωσης προγενέστερων πειραμάτων με τα παραπάνω δείγματα ιχθύων να έχουν συντηρηθεί και σε ισόθερμες θερμοκρασίες (0, 4, 8 και 12 °C).

2.1.3. Προετοιμασία νοθευμένων μπιφτεκιών

Για την μελέτη της νοθείας δημιουργήθηκαν μπιφτέκια από σάρκα τσιπούρας και σάρκα παγκάσιους (*Pangasius Hyporhthalmus*) με σκοπό να παρασκευαστούν τα εξής ποσοστά νοθευμένων προϊόντων: 10%, 20%, 30%, 40% και 50% (w/w). Συμπληρωματικά, εξετάστηκαν και τα μπιφτέκια που αποτελούνταν από 100% (w/w) τσιπούρα και 100% (w/w) παγκάσιους για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των γρήγορων μεθόδων να διακρίνουν τα διαφορετικά προϊόντα ιχθύων τόσο μεταξύ τους όσο και στα προϊόντα

ανάμειξης. Για το σκοπό αυτό, προμηθεύτηκαν ολόκληρες τσιπούρες ή φιλέτα τσιπούρας σε συσκευασία από τοπικά καταστήματα και αφού απομονώθηκε η σάρκα του ιχθύ, τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια για τον σχηματισμό των μπιφτεκιών. Αντίστοιχα, αγοράστηκαν φιλέτα παγκάσιους σε συσκευασία, όπως πωλούνται στην αγορά, και τεμαχίστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο. Το συνολικό βάρος των μπιφτεκιών ήταν 50 g. Η πειραματική διαδικασία διήρκησε 15 ημέρες και στην κάθε μέρα παρασκευάζονταν εκ νέου τα μπιφτεκία στις 7 διαφορετικές κατηγορίες για να ακολουθήσει η εφαρμογή των οργάνων Videometer, Fresh Detect και FT-IR. Τα πειράματα έγιναν σε 2 επαναλήψεις, Α και Β δείγματα, με συνολική παραγωγή 210 δειγμάτων.

2.2. Μικροβιολογικές αναλύσεις

2.2.1. Δειματοληψία

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μικροβιολογικές αναλύσεις ζυγίστηκαν 25 g από το ραχιαίο τμήμα του ιχθύος κάθε δείγματος, τα οποία μεταφέρονταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε σακούλα Stomacher όπου προστίθεται 225ml πεπτονόχου νερού (0.1% w/v Bacteriological peptone και 0.85% NaCl w/v). Οι διαδικασίες αυτές γίνονται σε ασηπτικές συνθήκες υπό την παρουσία λύχνου Bunsen. Εν συνεχεία, η σακούλα τοποθετείται στο Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 60 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει ομογενοποίηση και να λάβουν έπειτα χώρα, οι διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος. Ταυτόχρονα με την δειματοληψία, απομακρύνονται 15g από το δείγμα που αποθηκεύονται σε φύλλο αλουμινίου στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση του πτητικού προφίλ από την Ηλεκτρονική μύτη (e-nose). Ακόμη ένα μέρος του ψαριού λήφθηκε για την ανάλυση Πολυφασματικής Απεικόνισης (MSI) και Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Το κομμάτι αυτό παραλαμβάνεται από το άνω ραχιαίο τμήμα.

Παρασκευάστηκαν, ακολούθως, κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με μεταφορά 1 ml από το ομογενοποιημένο δείγμα που βρίσκονται στην σακούλα του Stomacher σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 ml πεπτονόχου νερού και ανακινήθηκε σχολαστικά. Για το αραιωτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό, ενώ αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 λεπτά, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Να επισημανθεί, ακόμα, ότι όλη η διαδικασία των αραιώσεων έλαβε χώρα παρουσία λύχνου Bunsen.

2.2.2. Υποστρώματα και επώαση

Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με την τεχνική της επίστρωσης ήταν η ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX), οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.) και το *Brochothrix thermosphacta*. Συγκεκριμένα, έγινε ενοφθαλμισμός 0,1 ml αραιωμένου δείγματος στο ήδη στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα και με μια αποστειρωμένη ράβδο επίστρωσης απλώνεται με κυκλικές κινήσεις σε όλη την επιφάνεια. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Plate Count Agar (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), το οποίο επωάστηκε για 3 ημέρες στους 25 °C για την απαρίθμηση των αποικιών της OMX.
- *Pseudomonas* Agar Base (LAB108, LAB M, U.K.) με προσθήκη του αντιβιοτικού Ceftrimide – Fusidin – Cephaloridine (Modified C.F.C X108, LAB M, U.K.) και γλυκερόλης, το οποίο επωάστηκε για 2 ημέρες στους 25 °C για την απαρίθμηση του *Pseudomonas* spp.
- Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base, STAA (Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy) με προσθήκη αντιβιοτικού (Ref. 4240052, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), το οποίο επωάστηκε για 2-3 ημέρες στους 25 °C για την απαρίθμηση του *Brochothrix thermosphacta*.

Επίσης, εξετάστηκαν τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae, τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα γαλακτικά βακτήρια με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Σύμφωνα με αυτήν, γίνεται ενοφθαλμισμός 1 ml αραιωμένου δείγματος σε κενό τρυβλίο και ακολουθεί η προσθήκη του υποστρώματος σε υγρή μορφή θερμοκρασίας περίπου 50 °C.

- Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA (Biolife, Italiana S.r.l Milano, Italy), το οποίο επωάστηκε για 1 ημέρα στους 37 °C για την απαρίθμηση των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae.
- Iron Agar (σύσταση: 20 g/l Bacteriological peptone, 3 g/l Meat extract, 3 g/l Yeast extract, 0,22 g/l ένυδρο C₆H₅FeO₇, 0,3 g/l Sodium triosulphate (N₂SO₃), 5 g/l Sodium chloride, 0,6 g/l L-cysteine, 12 g/l Agar και ρύθμιση του pH στο 7,4±0,2), το οποίο επωάστηκε για 2-3 ημέρες στους 25 °C για την απαρίθμηση των βακτηρίων που παράγουν H₂S.
- de Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS (Biolife, Italiana S.r.l Milano, Italy), το οποίο επωάστηκε για 3 έως 5 ημέρες στους 25 °C για την απαρίθμηση των γαλακτικών βακτηρίων.

Τα παραπάνω υποστρώματα αποστειρώθηκαν σε προγραμματισμένο αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 λεπτά, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με εξαίρεση το υπόστρωμα STAA στο οποίο εφαρμόστηκε η αποστείρωση στους 115 °C για τον ίδιο χρόνο.

2.3. Οργανοληπτικός έλεγχος

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των ιχθύων έγινε σε πάνελ 2 ατόμων (άτομα του εργαστηρίου, μη εκπαιδευμένα) πριν από κάθε δειγματοληψία. Συγκεκριμένα, διεξήχθη για τα πειράματα αλλοίωσης σε όλες τις συνθήκες συντήρησης. Η αξιολόγηση για τα φιλέτα των ιχθύων στις δύο διαφορετικές συνθήκες συντήρησης περιελάμβανε την εκτίμηση της οσμής και το χρώμα του δέρματος, ενώ για τους ολόκληρους ιχθύες έγινε επιπλέον εκτίμηση του χρώματος των βραγχίων και της ελαστικότητας του δέρματος (επαναφορά μετά από πίεση). Για τον σκοπό αυτό δημιουργήθηκε μια κλίμακα

ταξινόμησης από το 0 έως το 3, με τον βαθμό 0 να αποτελεί το μη φρέσκο – μη αποδεκτό δείγμα ψαριού και τον βαθμό 3 το φρέσκο – αποδεκτό.

2.4. Προσδιορισμός pH

Μετά το πέρας κάθε μικροβιολογικής ανάλυσης έγινε μέτρηση των τιμών του pH (Metrohm 691 pH meter) σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα ιχθύων, τοποθετώντας το ηλεκτρόδιο στο ομογενοποιημένο δείγμα που βρίσκονταν στη σακούλα Stomacher. Πριν από την έναρξη των μετρήσεων το όργανο είχε βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.5. Μέτρηση αερίων

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση αερίων, πριν από κάθε δειγματοληψία, στα δείγματα που είχαν συσκευαστεί υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με την βοήθεια του οργάνου Dansensor CheckMate 9900 O₂/CO₂ (PBI-Dansensor A/S, Denmark) με ακρίβεια ± 0.1 .

2.6. Φυσικοχημικές αναλύσεις

2.6.1. Πολυφασματική Απεικόνιση (MSI)

Η πολυφασματική απεικόνιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το όργανο VideometerLab (Videometer A/S, Videometer, 2019, Herlev, Denmark) (Cartensen and Folm-Hansen, 1999), το οποίο καταγράφει την επιφανειακή ανάκλαση των δειγμάτων σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος που κυμαίνονται από τα 405 nm (περιοχή ορατού) έως 970 nm (περιοχή εγγύς υπερόυθρου) και πιο συγκεκριμένα: 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970nm. Η ανάκλασης της επιφάνειας κάθε δείγματος καταγράφεται από μία τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (Charge Coupled Device chip, CCD chip) (Spyrelli et al., 2020).

Το δείγμα τοποθετήθηκε, αρχικά, σε τρυβλίο Petri και ύστερα μεταφέρθηκε μέσα στη σφαίρα Ulbricht στην οποία μια Point Grey Scorpion κάμερα είναι τοποθετημένη στο επάνω μέρος. Το εσωτερικό της είναι επικαλυμμένο με ματ επίστρωση όπου σε συνδυασμό με την καμπυλότητα της σφαίρας εξασφαλίζει μια ομοιόμορφη αντανάκλαση του διάχυτου φωτός, και ως εκ τούτου ένα ομοιόμορφο φως σε ολόκληρη τη σφαίρα. Περιμετρικά και ομοιόμορφα σε όλη την σφαίρα τοποθετούνται δίοδοι εκπομπής φωτός (Light emitting diodes, LED) που ανάβουν διαδοχικά όταν λαμβάνεται μια εικόνα. Η ανάκλαση από αυτό το συγκεκριμένο μήκος κύματος καταγράφεται από την κάμερα που είναι τοποθετημένη στο επάνω μέρος. Το αποτέλεσμα είναι μια μονόχρωμη εικόνα με ακρίβεια 32-bit για κάθε τύπο LED, δίνοντας στο τέλος έναν υπερφασματικό κύβο διαστάσεων 1280×960×19. Στην περίπτωση των συσκευασμένων φιλέτων υπό MAP συνθήκες λήφθηκε εικόνα από την μεριά του δέρματος αλλά και από την σάρκα από το ίδιο κομμάτι. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η εικόνα πάρθηκε μόνο από το δέρμα.

Πριν από την έναρξη των πειραμάτων, έγινε ρύθμιση φωτός με βάση τον τύπο του αντικειμένου που καταγράφηκε (light setup), οποία είναι ξεχωριστή για το δέρμα, την σάρκα των ιχθύων και για τα μπιφτέκια. Το σύστημα βαθμονομείται ραδιομετρικά και γεωμετρικά, χρησιμοποιώντας πρότυπους στόχους, πριν από την έναρξη των λήψεων (Folm-Hansen, 1999). Το ομοιογενές διάχυτο φως, μαζί με τα βήματα βαθμονόμησης, εξασφαλίζει ένα βέλτιστο δυναμικό εύρος και ελαχιστοποιεί τις σκιές και τα εφέ σκίασης, καθώς και την κατοπτρική ανάκλαση και τα συναφή εφέ (Dissing et al., 2013). Η εικόνα που προέκυψε περιλάμβανε περιττές πληροφορίες, όπως το τρυβλίο Petri και το περιβάλλον του. Για αυτόν τον λόγο απαιτήθηκε ένα βήμα επεξεργασίας εικόνας που οδήγησε σε μια εικόνα που αποτελείται μόνο από την επιθυμητή περιοχή. Αυτή η διαδικασία υλοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες διαδικασίες του λογισμικού VideometerLab (έκδοση 2.12.39) που ελέγχει τη λειτουργία του οργάνου (Ropodi et al., 2015).

2.6.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Για τα φασματικά δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση FTIR χρησιμοποιήθηκε ένας κρύσταλλος ZnSe 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) (PIKE Technologies, Madison, WI, USA), με δείκτη διάθλασης 2.4 και βάθος διείσδυσης 2.0 μmαt 1000 cm⁻¹, και ένα φασματόμετρο FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με ένα τυπικό θάλαμο για το δείγμα, έναν ανιχνευτή θεϊκής τριγλυκίνης (TSG) και έναν διαχωριστή δέσμης Ge/KBr.

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας ένα μικρό κομμάτι δείγματος ιχθύος ή μπιφτεκιού στην κρυστάλλινη πλάκα έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή επαφή με τον κρύσταλλο και έπειτα καλύφθηκε με ένα κομμάτι φύλλου αλουμινίου και πιέστηκε. Στην περίπτωση των φιλέτων ιχθύων υπό MAP συνθήκες, έγιναν 2 ξεχωριστές μετρήσεις από το ίδιο τμήμα τόσο από την πλευρά της σάρκας σε επαφή με τον κρύσταλλο όσο και από την πλευρά του δέρματος, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις εξετάστηκε μόνο το δέρμα. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) έκδοση 2 (Jasco Corp.), τα φάσματα συλλέχθηκαν μεταξύ του εύρους κυμάτων 4000 έως 400 cm⁻¹, μετά από 100 σαρώσεις με ανάλυση 4 cm⁻¹ και συνολικό χρόνο ολοκλήρωσης 2 λεπτά. Πριν από την αρχική μέτρηση και μετά από κάθε 4 μετρήσεις δειγμάτων, ο κρύσταλλος τοποθετείται χωρίς δείγμα και καθαρός στον θάλαμο, λαμβάνοντας, έτσι το φάσμα αναφοράς. Η επιφάνεια του δείγματος καθαρίζεται μετά από κάθε δείγμα με σαπουνόνερο, απεσταγμένο νερό και ακετόνη με την βοήθεια μπατονέτας. Τα φάσματα FTIR που τελικά χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω αναλύσεις ήταν κατά προσέγγιση το εύρος κυμάτων από 3100 έως 2700 και 1800 έως 900 cm⁻¹.

2.6.3. Ηλεκτρονική μύτη (E-nose)

Η ηλεκτρονική μύτη Alpha-Fox 3000 (ALPHA MOS, Toulouse FR) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πτητικού προφίλ των διαφορετικών δειγμάτων ιχθύων μέσω ενός συστήματος χειρισμού δειγμάτων, ενός συστήματος ανίχνευσης και ενός συστήματος επεξεργασίας δεδομένων (Alpha Soft V11) που διαθέτει. Λειτουργεί με μία συστοιχία αισθητήρων, χωρίς την ικανότητα ανίχνευσης και διαχωρισμού πτητικών ενώσεων, και

έτσι ένα ερέθισμα οσμής δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό δακτυλικό αποτύπωμα (ή αποτύπωμα οσμής). Η συστοιχία αισθητήρων αποτελείται από 12 αισθητήρες από οξείδια του μετάλλου χωρισμένοι σε 3 θαλάμους T, P και LY (Peris and Escuder-Gilabert, 2009). Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι αισθητήρες και η αντίστοιχη λειτουργία τους.

Πίνακας 2.1 Οι αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης Alpha-Fox 3000 και οι εφαρμογές τους (Xiong et al., 2014).

Αριθμός	Όνομα αισθητήρα	Εφαρμογές
S1	LY2/LG	Οξειδωτικό αέριο
S2	LY2/G	Αμμωνία, μονοξείδιο του άνθρακα
S3	LY2/AA	Αιθανόλη
S4	LY2/GH	Αμμωνία/οργανική αμίνη
S5	LY2/gCTL	Υδρόθειο
S6	LY2/gCT	Προπάνιο/ βουτάνιο
S7	T30/1	Οργανικοί διαλύτες
S8	P10/1	Υδρογονάνθρακες
S9	P10/2	Μεθάνιο
S10	P40/1	Φθόριο
S11	T70/2	Αρωματικές ενώσεις
S12	PA/2	Αιθανόλη, αμμωνία/ οργανική αμίνη

Τα δείγματα που απομονώθηκαν κατά την δειγματοληψία και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη, αποψύχθηκαν κάποια λεπτά πριν την εφαρμογή της Ηλεκτρονικής μύτης. Από κάθε δείγμα ιχθύος λήφθηκαν 2 g, συμπεριλαμβανόμενων περιοχών σάρκας και δέρματος, τα οποία τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 20 ml. Το δείγμα πιέστηκε με μια λαβίδα προκειμένου να τοποθετηθεί ομοιόμορφα στον πάτο του φιαλιδίου για να δημιουργηθεί αρκετό κενό μεταξύ δείγματος και καπακιού. Τέλος, τα φιαλίδια σφραγίστηκαν σχολαστικά με καπάκια αλουμινίου με χαρακτηριστικό διάφραγμα από πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE) και τοποθετήθηκαν στους 4 °C πριν την ανάλυση για να αποκτήσουν όλα τα δείγματα ομοιόμορφη θερμοκρασία. Αφού τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 50 °C για 20 λεπτά στο θερμομπλόκ με σκοπό να παραχθεί εξισορροπημένη ποσότητα πτητικών ενώσεων στον κενό χώρο του φιαλιδίου, έγινε η ένεση. Η ένεση διαπέρασε το διάφραγμα, σύλλεξε 0.5 ml από τις πτητικές ενώσεις που είχαν συσσωρευτεί και έγινε ο εμβολιασμός του δείγματος στην e-nose. Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνταν και ενέσεις αέρα για τον καθαρισμό της συστοιχίας αισθητήρων μετά από πέρασ 4 μετρήσεων δειγμάτων. Όταν τα πτητικά αέρια φτάσουν στο θάλαμο ανίχνευσης (με σταθερό ρυθμό 120 s), η απόκριση του αισθητήρα της e-nose υπολογίζεται από την σχέση $(R_t - R_0)/ R_0$, δηλαδή από την διαφορά της αντίστασης των αισθητήρων σε σχέση με την αρχική (Xiong et al., 2014). Το σύστημα περιλαμβάνει, επιπλέον, και μία διαδικασία αυτό-καθαρισμού του θαλάμου ανιχνευτή που διαρκεί 500 s μετά από την ολοκλήρωση κάθε μέτρησης. Έτσι, επανέρχεται η κατάσταση των αισθητήρων στην αρχική τους για την έναρξη της επόμενης μέτρησης.

2.6.4. Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fresh Detect)

Το όργανο Fresh Detect BFD-100 (Freshdetect GmbH, Germany) χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή φασματοσκοπίας φθορισμού στα δείγματα νοθείας. Αποτελεί μια φορητή συσκευή που χρησιμοποιεί ως μήκος κύματος διέγερσης στα 405 nm, ένα σύνολο σημάτων οπτικών ινών και ένα φασματόμετρο που καταγράφει σήματα φθορισμού από την περιοχή 460 έως 900 nm (Grimmler et al., 2018). Το όργανο ανιχνεύει μόνο το φθορισμό που εκπέμπεται από το κεντρικό τμήμα της διεγερτικής δέσμης. Το φως διέγερσης εστιάζεται στην επιφάνεια του δείγματος και η εκπομπή φθορισμού συλλέγεται από την ίδια περιοχή, χρησιμοποιώντας μια γωνία που μειώνει το ανακλώμενο και διασκορπισμένο φως (Hassoun et al., 2019).

Για την συγκέντρωση των φασματοσκοπικών δεδομένων, το όργανο Fresh Detect τοποθετήθηκε κάθετα την επιφάνεια του μπιφτεκιού και λήφθηκαν 3 μετρήσεις από διαφορετικά σημεία ανά δείγμα. Η κεφαλή μέτρησης που περιέχει την οπτική ίνα, 4 δίοδοι για το λέιζερ και ένα λευκός φως LED, καταλαμβάνει στο δείγμα επιφάνεια 5cm². Η κεφαλή καθαρίζεται όταν μεταβαίνουμε από το ένα δείγμα στο επόμενο με σαπουνόνερο, απιονισμένο νερό και καθαρή αιθανόλη με την χρήση χαρτοπετσέτας που δεν αφήνει χνούδια. Απαραίτητη προϋπόθεση, πριν την έναρξη της διαδικασίας, είναι η βαθμονόμηση του οργάνου με την βοήθεια των 2 καλυμμάτων κεφαλής, το ένα χρησιμοποιείται ως πρότυπο φθορισμού και το άλλο ως πρότυπο για το λευκό φως.

2.7. Στατιστική ανάλυση

2.7.1. Μοντέλα εκτίμησης της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square - Regression, PLS-R).

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα μελέτης της αλλοίωσης των ιχθύων, και από την ανάλυση των φασμάτων των MSI και FTIR, αναπτύχθηκαν μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης. Χρησιμοποιήθηκε η γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την ποσοτική ανάλυση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται η γραμμική συσχέτιση δύο συνόλων δεδομένων, χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες από τα φάσματα ως ανεξάρτητες μεταβλητές, X, και τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX ως εξαρτημένη μεταβλητή, Y. Έτσι, δημιουργείται ένα νέο σύνολο - χώρος ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X-scores), με ορθογώνια διάταξη και ορίζεται ένας αριθμός κύριων συνιστωσών (Latent Variables, LVs) για το νέο αυτό χώρο (Romia and Bernardez, 2009, Panagou et al., 2014).

Ο βασικός στόχος αυτής της ανάλυσης ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα πρόβλεψης της διάρκειας ζωής των ιχθύων μέσω των προβλεπόμενων μικροβιολογικών μετρήσεων που θα προκύπτουν απευθείας από τα δοθέντα φάσματα. Επίσης, για το λόγο αυτό, αξιοποιήθηκαν και τα δεδομένα των ισόθερων θερμοκρασιών Έτσι, για την ανάπτυξη (validation) και την επικύρωση (cross validation) του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από τις ισόθερες θερμοκρασίες 0,4,8 και 12 °C, ενώ για την επιβεβαίωση της πρόβλεψης (prediction) του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των

μεταβαλλόμενων θερμοκρασιών. Στην περίπτωση των φιλέτων στις συνθήκες MAP, η ανάλυση έγινε για τα δεδομένα και της σάρκας και του δέρματος.

Οι παράμετροι που υπολογίζονται αυτόματα από την δημιουργία του μοντέλου είναι: η κλίση της ευθείας a (slope) και ο συντελεστής b (offset), έχοντας υπόψη το γραμμικό μοντέλο $y = ax + b$, ο παράγοντας συσχέτισης r (correlation), ο οποίος δείχνει τον βαθμό συσχέτισης των X και Y , το R^2 , το οποίο όσο πιο κοντά βρίσκεται στην μονάδα τόσο πιο γραμμικό είναι το μοντέλο, και η τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (RMSE), το οποίο όσο μικρότερη τιμή έχει τόσο καλύτερη πρόβλεψη δίνει.

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή του PLS-R ήταν το The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software As, Oslo, Norway).

2.7.2. Μοντέλα εκτίμησης της νοθείας και της αλλοίωσης των προϊόντων ιχθύων με την διακριτική ανάλυση με την μέθοδο των μερικών τετραγώνων (Partial Least Square – Discriminant Analysis, PLS-DA)

Για την ποιοτική προσέγγιση η πολυπαραγοντική στατιστική μέθοδος διακριτική ανάλυση με την μέθοδο των μερικών τετραγώνων (PLS-DA) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων του MSI, του FTIR και του Fresh Detect των νοθευμένων μπιφτεκιών και των δεδομένων της e-nose της αλλοίωσης των ιχθύων. Η μέθοδος αυτή διαχωρίζει τα διαφορετικά σύνολα δειγμάτων σε κλάσεις και επομένως οι εξαρτημένες μεταβλητές, Y , αντιπροσωπεύουν ποιοτικές τιμές, δηλαδή ποια δείγματα ανήκουν σε μια κλάση που έχει οριστεί (Ballabio and Todeschini, 2009).

Στην περίπτωση της αλλοίωσης των ιχθύων τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες με βάση την OMX, σε φρέσκα ($< 7 \log \text{CFU/g}$) και αλλοιωμένα ($> 7 \log \text{CFU/g}$) δείγματα ιχθύων. Χρησιμοποιήθηκαν για αυτόν τον σκοπό τα πειράματα που διενεργήθηκαν στις ισόθερμες και στις μεταβαλλόμενες συνθήκες συντήρησης. Όσον αφορά τα πειράματα νοθείας, τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το ποσοστό νοθείας σε: κατηγορία 100 (100% κιμάς τσιπούρας), κατηγορία 10 (90% κιμάς τσιπούρας και 10 % παγκάσιους), κατηγορία 20 (80% κιμάς τσιπούρας και 20 % παγκάσιους), κατηγορία 30 (70% κιμάς τσιπούρας και 30 % παγκάσιους), κατηγορία 40 (60% κιμάς τσιπούρας και 40 % παγκάσιους), κατηγορία 50 (50% κιμάς τσιπούρας και 50 % παγκάσιους), και κατηγορία 0 (100% κιμάς παγκάσιους).

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε στην εφαρμογή του PLS-DA για τα δεδομένα αλλοίωσης της e-nose ήταν το XLSTAT 2021, ενώ για τα δεδομένα της νοθείας το The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software As, Oslo, Norway).

3. Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

3.1.1. Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού: Δείγματα τσιπούρας

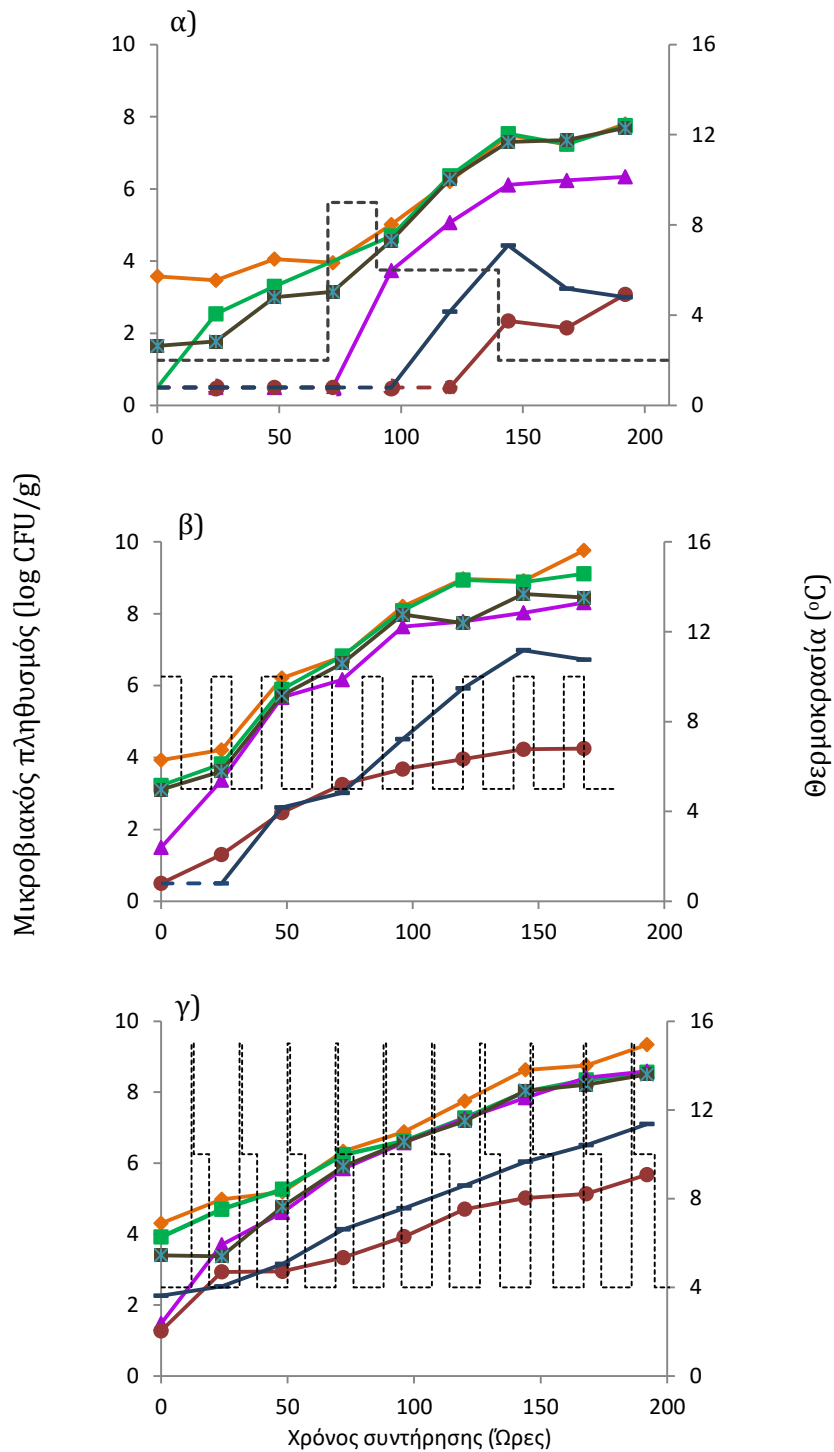
Μεταβολές παρατηρήθηκαν στη μικροβιακή χλωρίδα που καταμετρήθηκε στα δείγματα των ιχθύων που μελετήθηκαν. Οι καμπύλες αύξησης των OMX, *Pseudomonas* spp., βακτηρίων που παράγουν H₂S, *Brochothrix thermosphacta*, Εντεροβακτηρίων και Γαλακτικών βακτηρίων σε ιχθύες τσιπούρας που συντηρήθηκαν στις μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες συντήρησης παρουσιάζονται στο Γράφημα 3.1. Τα διαφορετικά δείγματα ήταν ολόκληρη τσιπούρα και φιλέτα τσιπούρας που συντηρήθηκαν στον αέρα, καθώς και φιλέτα τσιπούρας που συντηρήθηκαν υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες συσκευασία (MAP). Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών εκφράστηκε σε log CFU/g, όπως προέκυψε από το μέσο όρο των δύο επαναλήψεων για κάθε σημείο μέτρησης.

Οι επικρατέστεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί και στις τρεις περιπτώσεις ιχθύων τσιπούρας, ήταν οι *Pseudomonas* spp., τα βακτήρια που παράγουν H₂S και το *B. thermosphacta*, ενώ σε μικρότερα μεγέθη απαριθμήθηκαν τα Enterobacteriaceae και τα Γαλακτικά βακτήρια. Στην περίπτωση της ολόκληρης τσιπούρας που συντηρήθηκε στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 2 °C (70 ώρες) – 9 °C (20 ώρες) – 6 °C (50 ώρες), κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1 log CFU/g) παρέμειναν οι μικροοργανισμοί *B. thermosphacta*, Enterobacteriaceae και Γαλακτικά βακτήρια για 72, 96 και 120 ώρες, αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, ο τελικός πληθυσμός του *B. thermosphacta* ήταν 6,3 log CFU/g, ενώ της OMX, των *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S ήταν 7,8 log CFU/g.

Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν για τα φιλέτα τσιπούρας σε αερόβιες και MAP συνθήκες παρουσιάζονται στο Γράφημα 3.1(β, γ). Στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης εφαρμόστηκε το θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 10 °C (8 ώρες) – 5 °C (12 ώρες) για 168 ώρες, ενώ στις MAP συνθήκες το θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 4 °C (12 ώρες) – 15 °C (1 ώρα) – 10 °C (6 ώρες) για συνολικά 192 ώρες. Αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού παρατηρήθηκε, στην περίπτωση των Γαλακτικών βακτηρίων κατά 1 λογαριθμικό κύκλο στις MAP συνθήκες (5,2 log CFU/g) σε σύγκριση με τις αερόβιες (4,2 log CFU/g) στις 168 ώρες. Την ίδια χρονική στιγμή, οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp. (9,1 log CFU/g), των βακτηρίων που παράγουν H₂S (8,5 log CFU/g) και του *B. thermosphacta* (8,3 log CFU/g) στις αερόβιες συνθήκες δεν διέφεραν σημαντικά από τους αντίστοιχους πληθυσμούς υπό MAP (8,3, 8,2 και 8,4 log CFU/g, αντίστοιχα). Αντίστοιχα, οι πληθυσμοί των Enterobacteriaceae στις δύο συνθήκες ήταν παρόμοιοι (6,7 και 6,5 log CFU/g σε αέρα και MAP, αντίστοιχα), παρόλο που στις αερόβιες συνθήκες δεν καταμετρήθηκε (βρίσκονταν κάτω από 1 log CFU/g) πριν από τις 48 ώρες.

Συνολικά, εμφανής ήταν η επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στις ολόκληρες τσιπούρες (2 °C για 70 ώρες) σε σύγκριση με τα φιλέτα τσιπούρας σε αέρα και MAP, όπου η αρχική θερμοκρασία

συντήρησης ήταν είτε 4 °C (12 ώρες) είτε 10 °C (8 ώρες). Επιπλέον, οι πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* και των Γαλακτικών βακτηρίων στα φιλέτα τσιπούρας και στις δύο περιπτώσεις ήταν υψηλότεροι σε σύγκριση με την ολόκληρη τσιπούρα (3 log CFU/g).



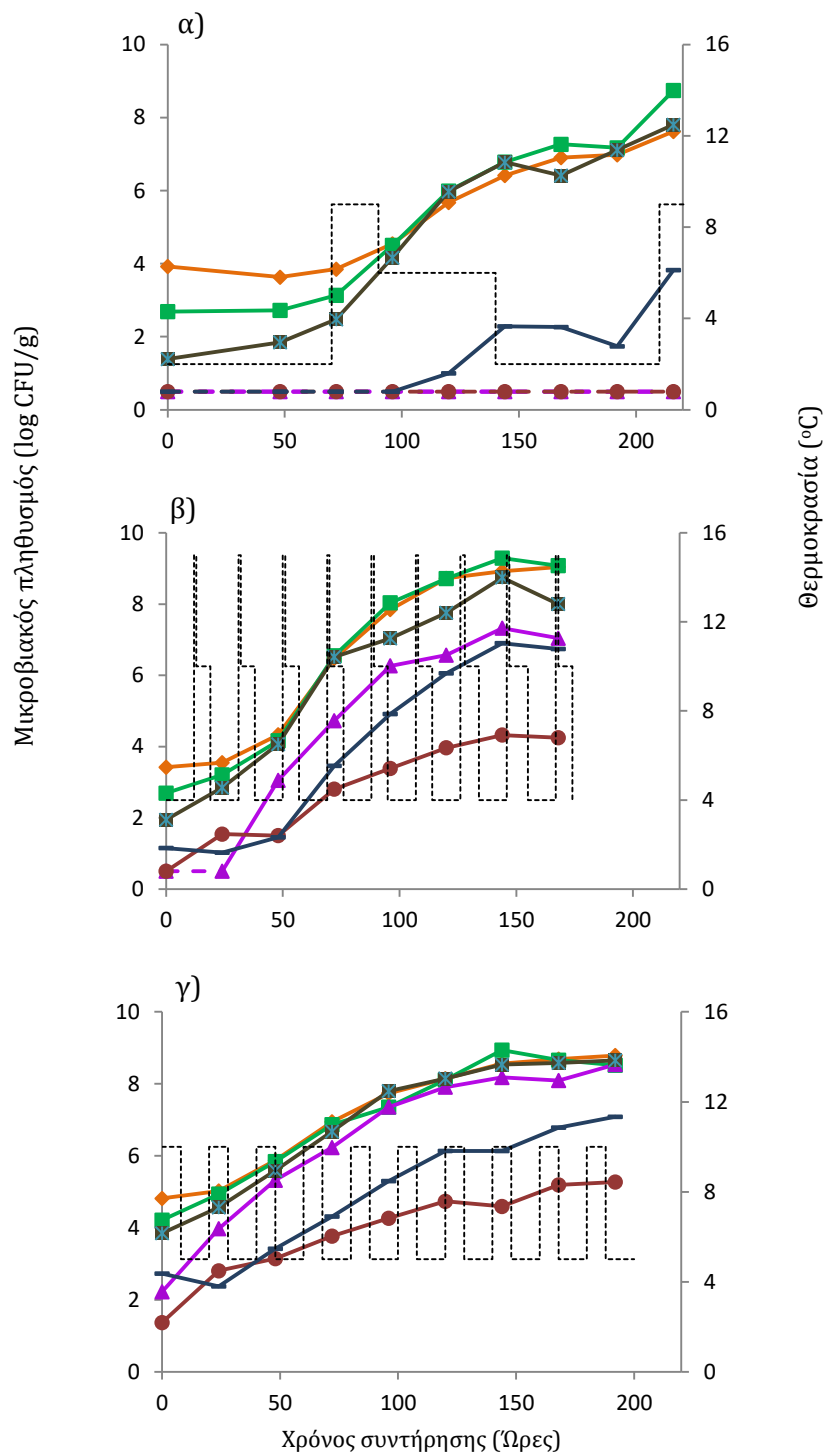
Σχήμα 3.1 Καμπύλες μικροβιακής αύξησης για α) την ολόκληρη τσιπούρα στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα 1: 2 °C (70 ώρες) – 9 °C (20 ώρες) – 6 °C (50 ώρες), β) τα φιλέτα τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα 2: 10 °C (8 ώρες) – 5 °C (12 ώρες), και γ) τα φιλέτα τσιπούρας σε συνθήκες MAP στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα 3: 4 °C (12 ώρες) – 15 °C (1 ώρα) – 10 °C (6 ώρες). OMX: (♦), *Pseudomonas* spp.: (■), *B. thermosphacta*: (▲), βακτήρια που παράγουν H₂S: (■x), Enterobacteriaceae: (■), Γαλακτικά βακτήρια: (●), Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: (--) και Τιμές κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1 log CFU/g): έγχρωμες διακεκομμένες γραμμές.

3.1.2. Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού: Δείγματα λαβρακιού

Τα αποτελέσματα της μεταβολής των μικροβιακών πληθυσμών που μελετήθηκαν για το ολόκληρο λαβράκι και για τα φιλέτα λαβρακιού που συντηρήθηκαν σε αερόβια και σε MAP συσκευασία, σε τρία διαφορετικά θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενα προγράμματα, παρατίθενται στο Σχήμα 3.2.

Στην περίπτωση του ολόκληρου λαβρακιού (Σχήμα 3.2.α) που συντηρήθηκε στον αέρα στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 2 °C (70 ώρες) – 9 °C (20 ώρες) – 6 °C (50 ώρες), οι επικρατέστεροι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν οι *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S με πληθυσμό 8,7, και 7,8 log CFU/g, αντίστοιχα, και ακολούθησαν τα Enterobacteriaceae με 3,8 log CFU/g. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ο *B. thermosphacta* και τα Γαλακτικά βακτήρια παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου καθ' όλη την διάρκεια των 216 ωρών. Η OMX, από την άλλη, έφτασε σε πληθυσμό 7,6 log CFU/g. Όσον αφορά στα φιλέτα λαβρακιού που συντηρήθηκαν σε αέρα (Σχήμα 3.2.β) στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 4 °C (12 ώρες) – 15 °C (1 ώρα) – 10 °C (6 ώρες), οι *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S, όντας οι επικρατέστεροι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί, αυξήθηκαν με παρόμοιο μοτίβο με την OMX. Οι τελικοί πληθυσμοί αυτών έφτασαν τα 9,1, 8 και 9 log CFU/g, αντίστοιχα. Ακολούθησαν το *B. thermosphacta* (7 log CFU/g), τα Enterobacteriaceae (6,7 log CFU/g) και τα Γαλακτικά (4,2 log CFU/g).

Στα φιλέτα λαβρακιού που συντηρήθηκαν υπό συνθήκες MAP (Σχήμα 3.2.γ) στις θερμοκρασίες: 10 °C (8 ώρες) – 5 °C (12 ώρες), το *B. thermosphacta* στις 168 ώρες συντήρησης έφτασε σε πληθυσμό 8,1 log CFU/g, δηλαδή αυξήθηκε κατά 1,1 λογαριθμικούς κύκλους σε σύγκριση με το φιλέτο λαβρακιού στις αερόβιες συνθήκες την ίδια χρονική στιγμή. Ο τελικός του πληθυσμός ήταν 8,5 log CFU/g (192 ώρες). Φάνηκε ότι οι MAP συσκευασία ευνόησε την ανάπτυξη του *B. thermosphacta*. Αυτή η παρατήρηση, παρόλα αυτά, δεν επιβεβαιώθηκε στην περίπτωση των φιλέτων τσιπούρας, δίνοντας έμφαση στην επίδραση του θερμοκρασιακού προφίλ στην επικράτηση των μικροοργανισμών. Εκτός του *B. thermosphacta* οι τελικοί πληθυσμοί των υπόλοιπων κύριων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών OMX (8,7 log CFU/g), *Pseudomonas* spp. (8,5 log CFU/g), και βακτηρίων που παράγουν H₂S (8,7 log CFU/g) δεν διέφερε σημαντικά από τα φιλέτα στις αερόβιες συνθήκες. Να σημειωθεί ότι οι αρχικοί πληθυσμοί των προαναφερθέντων μικροοργανισμών ήταν υψηλότεροι κατά 1,5 με 1,9 λογαριθμικούς κύκλους σε σχέση με τις αερόβιες συνθήκες.



Σχήμα 3.2 Καμπύλες μικροβιακής αύξησης για α) το ολόκληρο λαβράκι στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα 1: 2 °C (70 ώρες) – 9 °C (20 ώρες) – 6 °C (50 ώρες), β) τα φιλέτα λαβρακιού σε αερόβιες συνθήκες στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα 3: 4 °C (12 ώρες) – 15 °C (1 ώρα) – 10 °C (6 ώρες) και γ) τα φιλέτα λαβρακιού σε συνθήκες MAP στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα 2: 10 °C (8 ώρες) – 5 °C (12 ώρες). OMX: (♦), *Pseudomonas* spp.: (■), *B. thermosphacta*: (▲), βακτήρια που παράγουν H₂S: (■x), Enterobacteriaceae: (—), Γαλακτικά βακτήρια: (●), Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: (--) και Τιμές κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1 log CFU/g): έγχρωμες διακεκομμένες γραμμές.

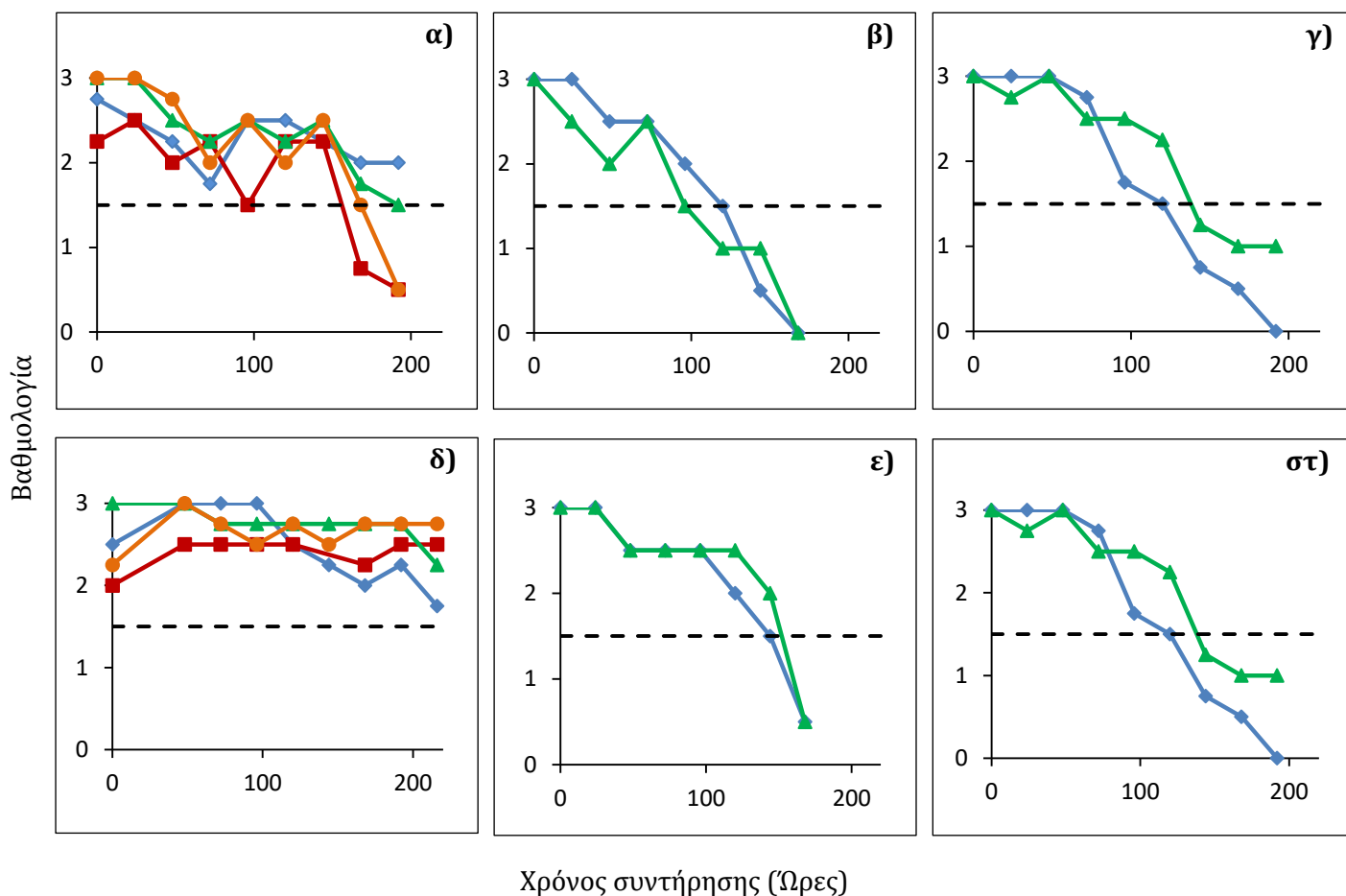
3.2. Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης

Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων τσιπούρας και λαβρακιού δίνονται στο Σχήμα 3.3. Οι ολόκληροι ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού ελέγχθηκαν με τα κριτήρια της οσμής, του χρώματος των βραγχίων, της ελαστικότητας του δέρματος ύστερα από πίεση και του χρώματος του δέρματος. Για τα δείγματα φιλέτων τα κριτήρια αξιολόγησης συμπεριλάμβαναν μόνο την οσμή και το χρώμα του δέρματος. Η κλίμακα βαθμολόγησης ορίστηκε από το 3 έως το 0 με την τιμή 1,5 να αποτελεί το σημείο απόρριψης.

Το ολόκληρο λαβράκι δεν απορρίφθηκε οργανοληπτικά στις 216 ώρες συντήρησης παρόλο που ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S ήταν 8,7 και 7,8 log CFU/g, αντίστοιχα. Αντίθετα, η ολόκληρη τσιπούρα που συντηρήθηκε στο ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα απορρίφθηκε στις 162 ώρες εξαιτίας του χρώματος των βραγχίων και της ελαστικότητας του δέρματος. Σε αυτό το χρονικό σημείο ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. ήταν 7,2 log CFU/g και των βακτηρίων που παράγουν H₂S 7,5 log CFU/g.

Στην περίπτωση των φιλέτων τσιπούρας που συντηρήθηκαν υπό MAP, η οργανοληπτική απόρριψη συνέβη στις 120 ώρες από το χρώμα του δέρματος (OMX ήταν 7,7 log CFU/g), ενώ στο αέρα στις 96 ώρες λόγω οσμής (OMX ήταν 8,2 log CFU/g). Στην περίπτωση των φιλέτων λαβρακιού που συντηρήθηκαν σε αέρα, ο πληθυσμός της OMX ήταν 8,9 log CFU/g, όταν απορρίφθηκε οργανοληπτικά λόγω οσμής στις 144 ώρες. Αντίθετα, στα φιλέτα λαβρακιού που συντηρήθηκαν υπό MAP η OMX ήταν 8,1 log CFU/g όταν απορρίφθηκαν εξαιτίας της οσμής στις 120 ώρες.

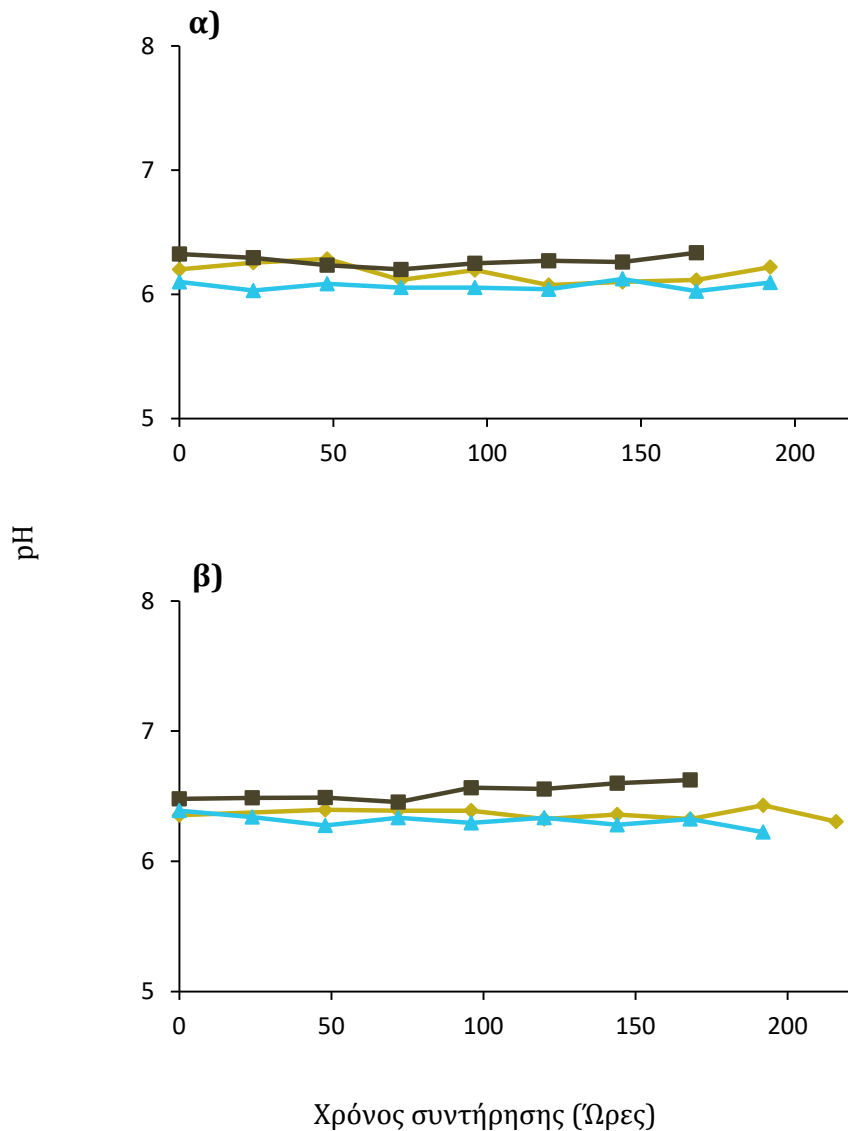
Με την πάροδο του χρόνου οι τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν οδηγήθηκαν σε σταδιακή μείωση με εξαίρεση το ολόκληρο λαβράκι που οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ του 3 και του 2, δηλαδή διατηρήθηκαν στο στάδιο «φρέσκο».



Σχήμα 3.3 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης για α), δ) την ολόκληρη τσιπούρα και λαβράκι (θερμοκρασιακό πρόγραμμα 1) β), στ) το φιλέτο τσιπούρας σε αερόβιες και το φιλέτο λαβρακιού υπό MAP συνθήκες (θερμοκρασιακό πρόγραμμα 2) και γ), ε) το φιλέτο τσιπούρας υπό MAP και το φιλέτο λαβρακιού σε αερόβιες συνθήκες (θερμοκρασιακό πρόγραμμα 3), σε κλίμακα από το 3 (φρέσκο) έως το 0 (αλλοιωμένο). Οσμή: (◆), χρώμα βραγχίων: (■), χρώμα δέρματος: (▲), ελαστικότητα του δέρματος: (●) και σημείο απόρριψης δείγματος 1,5: (-).

3.3. Αποτελέσματα μέτρησης pH

Οι μεταβολές στην τιμή του pH στην διάρκεια του χρόνου συντήρησης για τα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού, απεικονίζονται στο Σχήμα 3.4α, και Σχήμα 3.4β, αντίστοιχα. Καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στις τιμές του pH κατά τη διάρκεια της συντήρησης των ιχθύων.

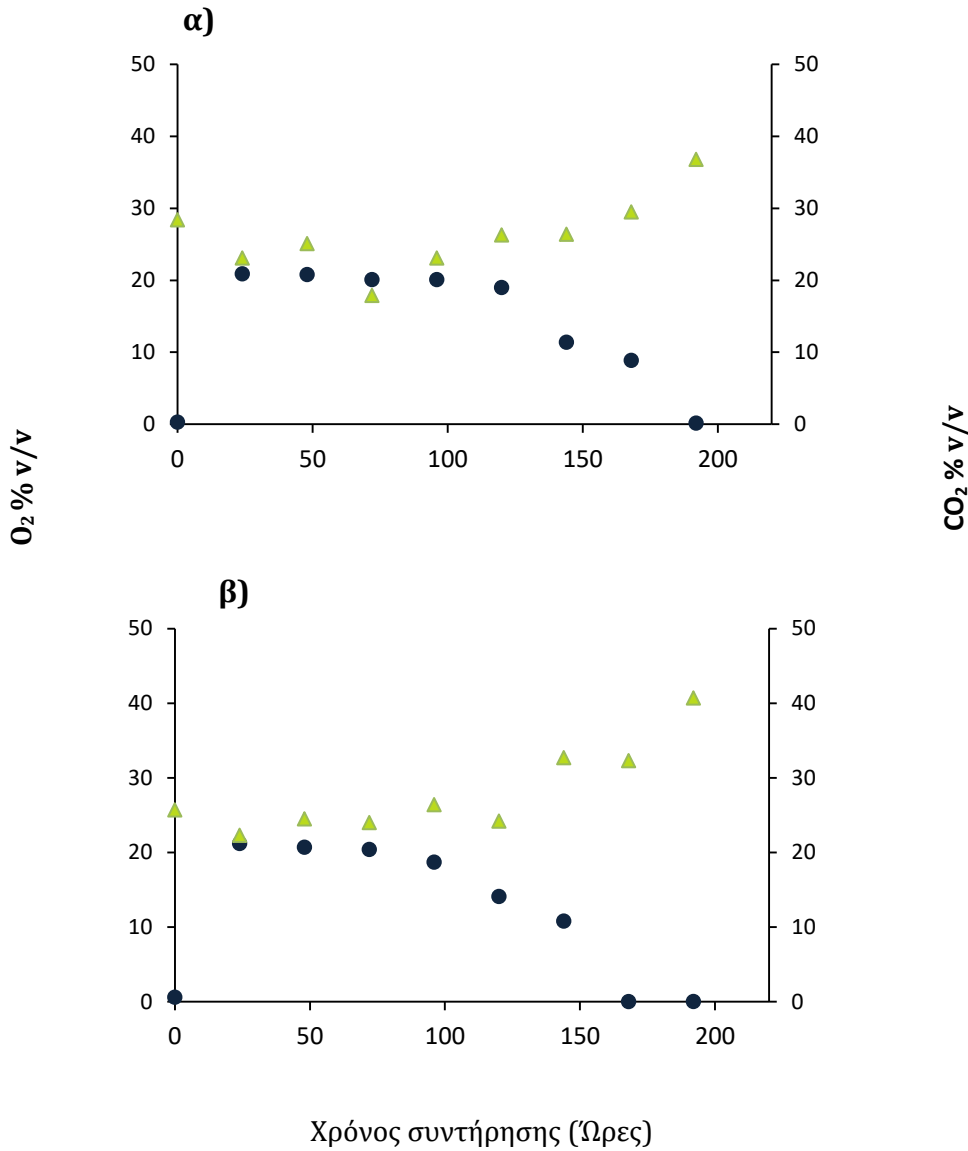


Σχήμα 3.4 Παράσταση της τιμής pH στα α) διαφορετικά δείγματα τσιπούρας και β) στα διαφορετικά δείγματα λαβρακιού. Ολόκληροι ιχθείς: (♦), φιλέτα ιχθύων συντηρημένα στον αέρα: (■), φιλέτα ιχθύων συντηρημένα σε MAP συνθήκες: (▲).

3.4. Αποτελέσματα μέτρησης αερίων

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων των αερίων O_2 και CO_2 πραγματοποιήθηκαν στις συσκευασίες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα τόσο για τα φιλέτα τσιπούρας όσο και για φιλέτα λαβρακιού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται με τα ακόλουθα διαγράμματα σε ποσοστά (%) για το O_2 και CO_2 σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης στο Σχήμα 3.5.

Για τα φιλέτα τσιπούρας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας οι συγκεντρώσεις O_2 και CO_2 ήταν 0,3 και 28,4 %, αντίστοιχα, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό συμπληρώνει το N_2 . Οι τελικές συγκεντρώσεις διαμορφώθηκαν σε 0,162 % για το O_2 , αφού πρώτα εμφάνισε μια αύξηση γύρω στο 20 % για 96 ώρες, και 36,8 % για το CO_2 . Όμοια, για τα φιλέτα λαβρακιού, οι αρχικές συγκεντρώσεις O_2 και CO_2 που καταγράφηκαν ήταν 0,6 και 25,7 % και οι τελικές 0,024 και 40,7 %, αντίστοιχα.



Σχήμα 3.5 Μεταβολή των συγκεντρώσεων των αερίων O_2 (•) και CO_2 (▲) για α) τα φιλέτα τσιπούρας και β) τα φιλέτα λαβρακιού σε συσκευασίας με τροποποιημένη ατμόσφαιρα.

3.5. Αποτελέσματα φυσικοχημικών αναλύσεων

3.5.1. Συσχέτιση των φασμάτων της Πολυφασματικής Απεικόνισης (MSI) με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα

Τα φασματικά δεδομένα του MSI χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων με στόχο την πρόβλεψη του πληθυσμού της OMX και επομένως της διάρκειας ζωής των προϊόντων. Για την αξιολόγηση των μοντέλων πρόβλεψης του πληθυσμού της OMX, αξιοποιήθηκαν οι δείκτες απόδοσης για την βαθμονόμηση, την επικύρωση και την πρόβλεψη του μοντέλου, οι οποίοι παρατίθενται στον Πίνακα 3.3, για τα δείγματα της τσιπούρας και στον Πίνακα 3.4 για τα δείγματα λαβρακιού .

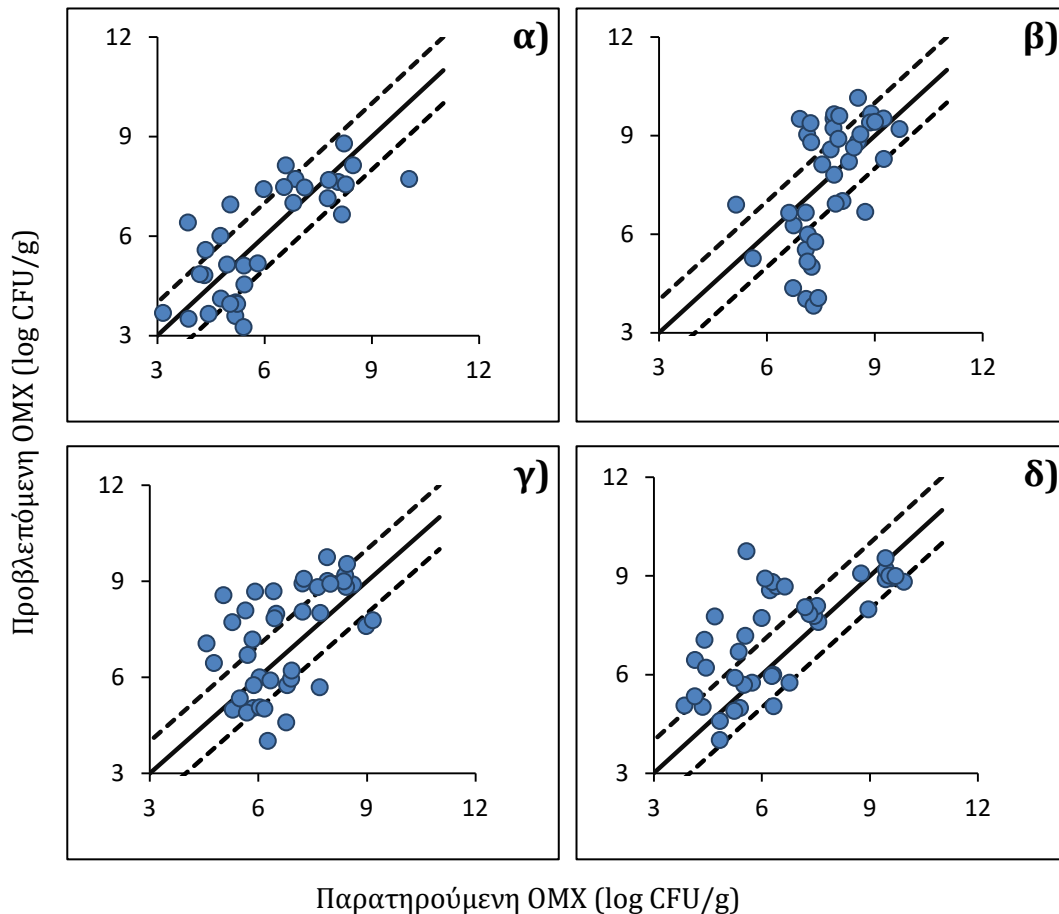
Η βαθμονόμηση (calibration) του μοντέλου πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά με τα δεδομένα (training) των προγενέστερων πειραμάτων στις ισόθερμες θερμοκρασίες (0, 4, 8, 12 °C). Για την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα (testing) των μεταβαλλόμενων συνθηκών συντήρησης. Συμπληρωματικά χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα δείγματα από τις ισόθερμες θερμοκρασίες που δεν συμπεριλήφθηκαν στην εκπαίδευση του μοντέλου, για να αυξηθεί ο όγκος δειγμάτων τσιπούρας. Επιπλέον, για την ανάπτυξη του μοντέλου που αφορά στα δείγματα φιλέτων τσιπούρας που συντηρήθηκαν υπό MAP συσκευασία συμπεριλήφθηκαν τα δεδομένα των μετρήσεων τόσο από την πλευρά του δέρματος όσο και την πλευρά της σάρκας. Για την βελτίωση του μοντέλου πρόβλεψης εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός (transformation) Standard Normal Variate (SNV) στην περίπτωση του φιλέτου στον αέρα (δέρμα), του φιλέτου υπό MAP από την πλευρά της σάρκας, του ολόκληρου λαβρακιού, και τέλος στις δύο πλευρές του φιλέτου λαβρακιού υπό MAP.

Όσον αφορά τα δείγματα της τσιπούρας, το μοντέλο που αναπτύχθηκε από τα φασματικά δεδομένα της ολόκληρης τσιπούρας (δέρμα) είχε την καλύτερη επίδοση σε σχέση με τα φιλέτα σε αέρα και υπό MAP (δέρμα και σάρκα). Συγκεκριμένα, στην βαθμονόμηση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από τις ισόθερμες θερμοκρασίες 0, 4, 8 και 12 °C, εκτός από 4 δείγματα κάθε κατηγορίας, τα οποία συμπεριλήφθηκαν στην πρόβλεψη του μοντέλου μαζί με την μεταβαλλόμενη συνθήκη. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) μεταξύ των εκτιμώμενων και των παρατηρούμενων μικροβιακών πληθυσμών ήταν 0,73, 0,48 και 0,46 για την βαθμονόμηση, την εσωτερική επικύρωση (validation) και την πρόβλεψη του μοντέλου, αντίστοιχα. Οι τιμές της απόκλισης της μέσης τετραγωνικής ρίζας (RMSE) των μοντέλων αυτών ήταν αντίστοιχα 0,92, 1,30 και 1,23. Την λιγότερο ικανοποιητική πρόβλεψη έδωσαν τα φιλέτα υπό MAP τόσο από την πλευρά του δέρματος ($R^2 = 0,13$ και $RMSE = 1,51$) όσο και από την πλευρά της σάρκας ($R^2 = 0,14$ και $RMSE = 1,49$).

Η απόδοση αυτή των μοντέλων των δειγμάτων τσιπούρας απεικονίζεται και στα διαγράμματα των προβλεπόμενων τιμών της OMX συναρτήσει των παρατηρούμενων τιμών στο Σχήμα 3.7.

Πίνακας 3.3 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την ολόκληρη τσιπούρα (δέρμα), το φιλέτο τσιπούρας στον αέρα (δέρμα) και το φιλέτο τσιπούρας σε MAP συνθήκες (δέρμα και σάρκα) με βάση τα φασματικά δεδομένα του MSI.

		MSI – Τσιπούρα			
		Ολόκληρη (αέρας) Δέρμα	Φιλέτο (αέρας) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Σάρκα
Calibration	Samples	83	89	86	85
	Slope	0.73	0.75	0.60	0.756
	Offset	1.68	1.98	2.73	1.68
	RMSE	0.92	0.83	1.11	0.87
	R ²	0.73	0.75	0.60	0.76
Validation	Slope	0.68	0.68	0.55	0.68
	Offset	2.06	2.65	3.07	2.18
	RMSE	1.30	1.12	1.24	1.05
	R ²	0.48	0.56	0.51	0.65
Prediction	Samples	34	40	41	42
	Slope	0.75	0.28	0.38	0.78
	Offset	1.84	5.60	4.02	0.95
	RMSE	1.23	1.57	1.51	1.49
	R ²	0.46	0.30	0.13	0.14
Info	Training: 0, 4, 8,12 °C Testing: 4 samples from each isothermal condition and dynamic	Training: 0, 4, 8,12 °C Training: 6 samples from each isothermal condition and dynamic, SNV transformation	Training: 0, 4, 12 °C Testing: 8 °C and dynamic	Training: 0, 4, 12 °C Testing: 8 °C and dynamic, SNV transformation	



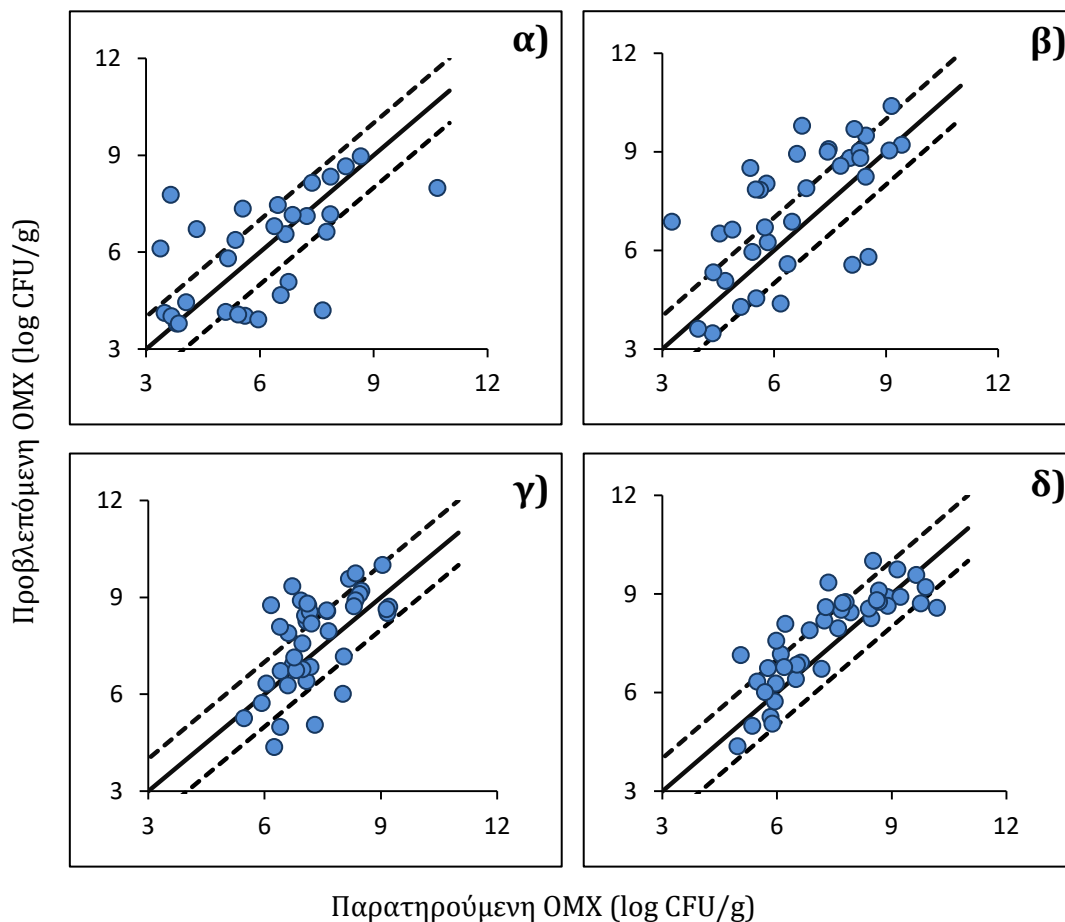
Σχήμα 3.7 Προβλεπόμενη τιμή OMX (log CFU/g) σε συνάρτηση με την παρατηρούμενη τιμή OMX (log CFU/g) με βάση τα δεδομένα του MSI για α) την ολόκληρη τσιπούρα (δέρμα), β) για το φιλέτο τσιπούρας στον αέρα (δέρμα), γ) για το φιλέτο τσιπούρας σε MAP (δέρμα) και για το φιλέτο τσιπούρας σε MAP (σάρκα).

Όσον αφορά τα δείγματα λαβρακιού, το μοντέλο απέδωσε ικανοποιητικότερα στην περίπτωση της σάρκας του φιλέτου λαβρακιού υπό MAP σε σύγκριση με τις άλλες συνθήκες λαβρακιού. Τα μοντέλα για την βαθμονόμηση, την επικύρωση και την πρόβλεψη είχαν τιμές R^2 0,77, 0,73 και 0,59, αντίστοιχα, και αντίστοιχες τιμές RMSE 0,61, 0,68 και 0,91. Τα δεδομένα που αξιοποιήθηκαν για την βαθμονόμηση του μοντέλου ήταν εκείνα από τις ισόθερμες θερμοκρασίες 0, 4 και 12 °C, ενώ για την πρόβλεψη τα δεδομένα από την μεταβαλλόμενη θερμοκρασία και τους 8 °C. Στην συγκεκριμένη περίπτωση εφαρμόστηκε και SNV μετασχηματισμός. Τα μοντέλα πρόβλεψης που αναπτύχθηκαν με τα φασματικά δεδομένα των υπόλοιπων δειγμάτων είχαν χαμηλότερη επίδοση. Το R^2 είχε τιμές μεταξύ 0,20 – 0,27 και οι τιμές του RMSE ήταν κυμαινόμενες μεταξύ 1,21 – 1,59.

Η διαγραμματική απεικόνιση της απόδοσης των μοντέλων των δειγμάτων λαβρακιού (προβλεπόμενη OMX προς παρατηρούμενη OMX) δίνεται στο Σχήμα 3.8.

Πίνακας 3.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για το ολόκληρο λαβράκι (δέρμα), το φιλέτο λαβρακιού στον αέρα (δέρμα) και το φιλέτο λαβρακιού σε MAP συνθήκες (δέρμα και σάρκα) με βάση τα φασματικά δεδομένα του MSI.

MSI – Λαβράκι					
		Ολόκληρο (αέρας) Δέρμα	Φιλέτο (αέρας) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Σάρκα
Calibration	Samples	87	74	74	74
	Slope	0.75	0.75	0.72	0.77
	Offset	1.62	1.90	1.99	1.63
	RMSE	0.92	0.88	0.67	0.61
	R ²	0.74	0.75	0.72	0.77
Validation	Slope	0.64	0.62	0.67	0.74
	Offset	2.34	2.94	2.37	1.86
	RMSE	1.48	1.29	0.83	0.68
	R ²	0.36	0.48	0.59	0.73
Prediction	Samples	32	36	41	41
	Slope	0.7	0.57	0.39	0.86
	Offset	1.73	2.40	4.27	0.72
	RMSE	1.58	1.63	1.21	0.91
	R ²	0.20	0.26	0.27	0.59
Info	Training: 0, 4, 8,12 °C Testing: 5 samples from each isothermal condition and dynamic, SNV Transformation	Training: 0, 4, 12 °C Testing: 8 °C and dynamic	Training: 0, 4, 12 °C Testing: 8 °C and dynamic, SNV Transformation	Training: 0, 4, 12 °C Testing: 8 °C and dynamic, SNV Transformation	



Σχήμα 3.8 Προβλεπόμενη τιμή OMX (log CFU/g) σε συνάρτηση με την παρατηρούμενη τιμή OMX (log CFU/g) με βάση τα δεδομένα του MSI για α) το ολόκληρο λαβράκι (δέρμα), β) για το φιλέτο λαβρακιού στον αέρα (δέρμα), γ) για το φιλέτο λαβρακιού σε MAP (δέρμα) και για το φιλέτο λαβρακιού σε MAP (σάρκα).

3.5.2. Συσχέτιση των φασμάτων της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα

Στον Πίνακα 3.5 παρατίθενται οι δείκτες απόδοσης του μοντέλου (PLS-R) με βάση τα φασματικά δεδομένα του FTIR για τα δείγματα τσιπούρας. Από τα φασματικά δεδομένα του FTIR χρησιμοποιήθηκαν οι κυματαριθμοί μεταξύ 3100-2700 και 1800-900 cm^{-1} . Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν, και σε αυτήν την περίπτωση, δεδομένα από το δέρμα και την σάρκα των φιλέτων τσιπούρας που συντηρήθηκαν υπό MAP συνθήκες. Επιπλέον, μετασχηματισμοί δεν εφαρμόστηκαν στα δείγματα τσιπούρας.

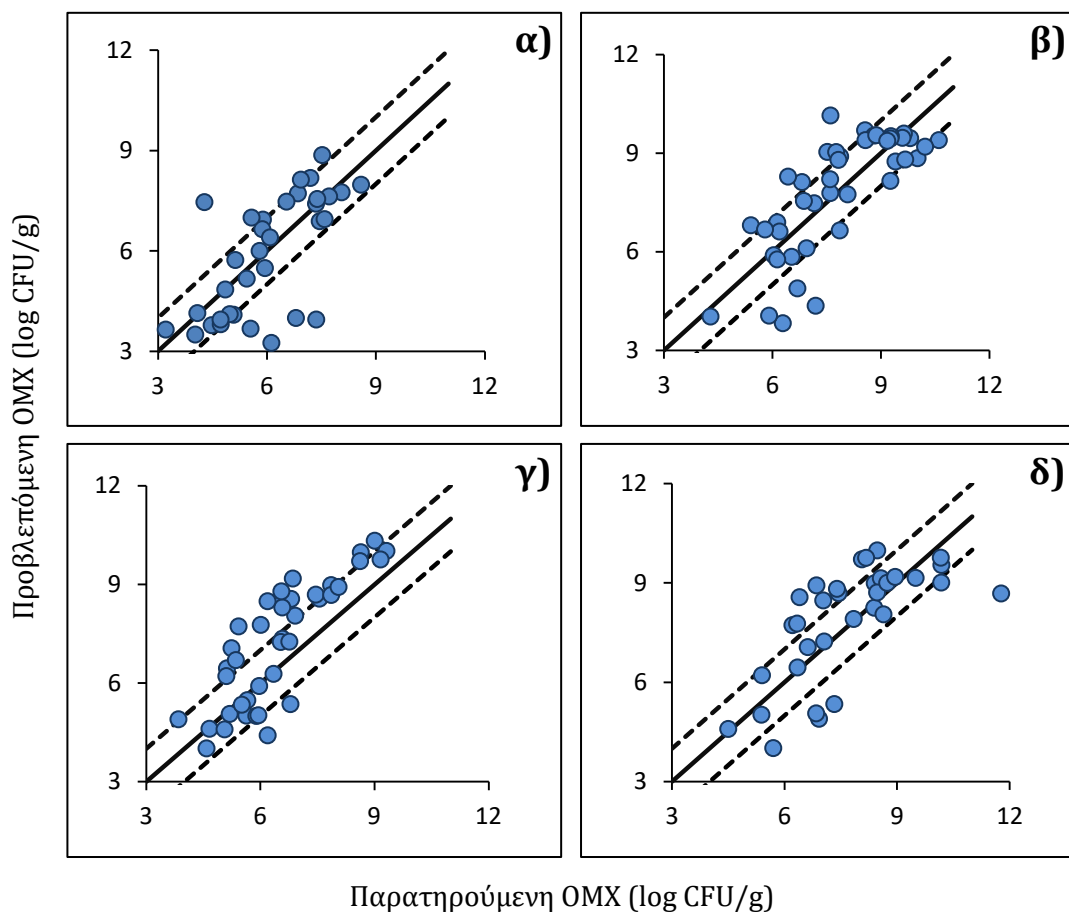
Οι προβλέψεις για τους μικροβιακούς πληθυσμούς στο φιλέτο τσιπούρας (δέρμα) σε αέρα και στο δέρμα από το φιλέτο τσιπούρας υπό MAP παρουσίασαν την μεγαλύτερη επίδοση με κοντινούς δείκτες απόδοσης. Συγκεκριμένα, τα μοντέλα πρόβλεψης είχαν R^2 0,58 και 0,52, ενώ το RMSE είχε τιμές 1,15 και 1,27, αντίστοιχα. Αντίθετα, οι δείκτες για την βαθμονόμηση και την επικύρωση των μοντέλων διέφεραν μεταξύ των δύο δειγμάτων. Στην περίπτωση του φιλέτου στον αέρα τα μοντέλα βαθμονόμησης και επικύρωσης είχαν τιμές R^2 0,82 και 0,74 και RMSE 0,71 και 0,87, αντίστοιχα. Για το δέρμα του φιλέτου υπό

MAP το R^2 ήταν 0,50 και 0,20, ενώ το RMSE ήταν 1,13 και 1,44 για την βαθμονόμηση και την επικύρωση του μοντέλου, αντίστοιχα. Το μοντέλο πρόβλεψης για την ολόκληρη τσιπούρα διαμόρφωσε R^2 0,44 και για την σάρκα του φιλέτου υπό MAP ήταν 0,42.

Η διαγραμματική απεικόνιση της απόδοσης των μοντέλων (προβλεπόμενη OMX προς παρατηρούμενη OMX) δίνεται στο Σχήμα 3.9.

Πίνακας 3.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την ολόκληρη τσιπούρα (δέρμα), το φιλέτο τσιπούρας στον αέρα (δέρμα) και το φιλέτο τσιπούρας σε MAP συνθήκες (δέρμα και σάρκα) με βάση τα φασματικά δεδομένα του FTIR.

FTIR – Τσιπούρα					
		Ολόκληρη (αέρας) Δέρμα	Φιλέτο (αέρας) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Σάρκα
Calibration	Samples	70	85	95	95
	Slope	0.45	0.82	0.50	0.59
	Offset	3.41	1.44	3.39	2.72
	RMSE	1.31	0.71	1.13	1.04
	R^2	0.47	0.82	0.50	0.59
Validation	Slope	0.34	0.78	0.33	0.46
	Offset	4.26	1.74	4.61	3.67
	RMSE	1.54	0.87	1.44	1.32
	R^2	0.29	0.74	0.20	0.36
Prediction	Samples	34	42	40	33
	Slope	0.51	0.65	0.59	0.65
	Offset	3.02	2.73	2.22	2.59
	RMSE	1.29	1.15	1.27	1.28
	R^2	0.44	0.58	0.52	0.42
Info		Training: 0, 4, 12 °C Testing: 8 °C and dynamic	Training: 0, 4, 12 °C Testing: 8 °C and dynamic	Training: 0, 4, 8 °C Testing: 12 °C and dynamic	Training: 0, 4, 8,12 °C Testing: 4 samples from each isothermal condition and dynamic



Σχήμα 3.9 Προβλεπόμενη τιμή OMX (log CFU/g) σε συνάρτηση με την παρατηρούμενη τιμή OMX (log CFU/g) για α) με βάση τα δεδομένα του FTIR την ολόκληρη τσιπούρα (δέρμα), β) για το φιλέτο τσιπούρας στον αέρα (δέρμα), γ) για το φιλέτο τσιπούρας σε MAP (δέρμα) και για το φιλέτο τσιπούρας σε MAP (σάρκα).

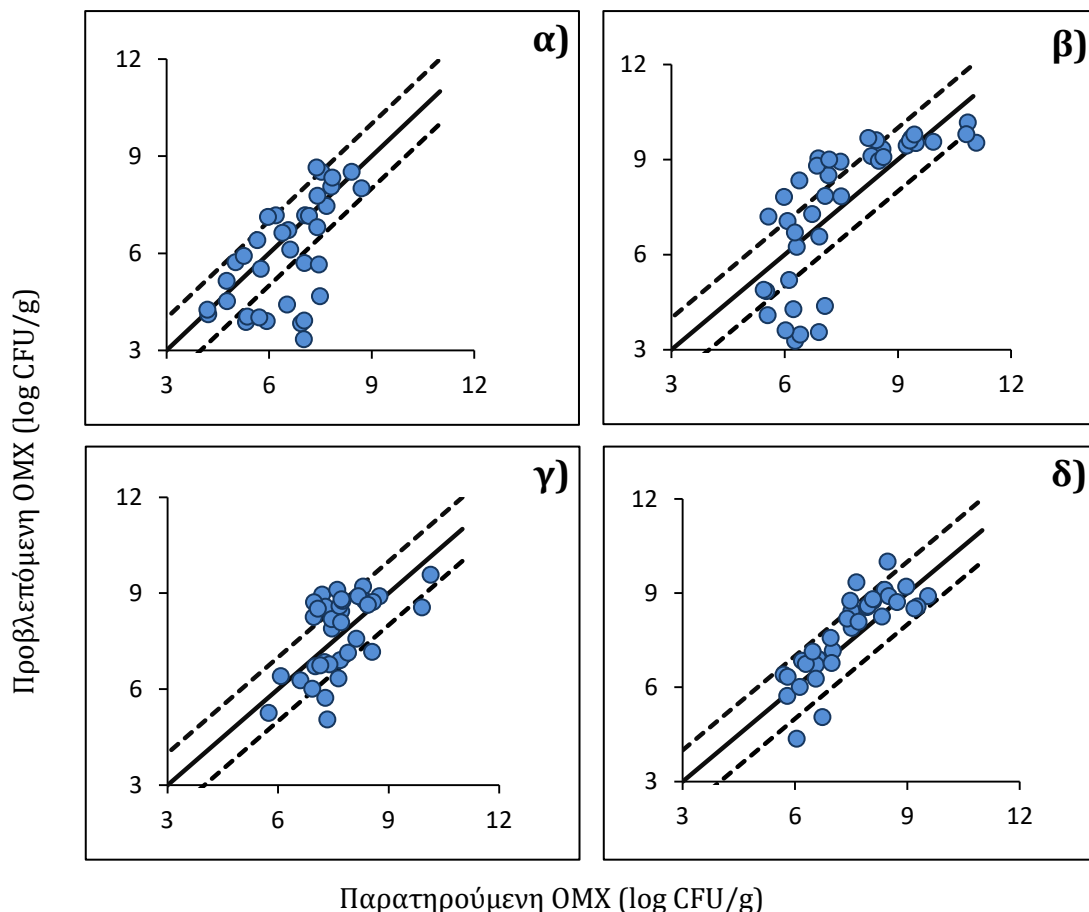
Τα αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) με βάση τα φασματικά δεδομένα του FTIR για τα δείγματα λαβρακιού δίνονται στον Πίνακα 3.6. Για την εκπαίδευση των μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν και στις τέσσερις περιπτώσεις τα δεδομένα των ισόθερων θερμοκρασιών 0, 4 και 8 °C, ενώ για τα μοντέλα πρόβλεψη τα δεδομένα της μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας και των 12 °C. Στην περίπτωση του φιλέτου στον αέρα και του φιλέτου σε MAP από την πλευρά του δέρματος εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός με βάση τον αλγόριθμο Savitzky Golay Derivatives και συγκεκριμένα η δεύτερη παράγωγος, για τη βελτίωση του μοντέλου.

Την υψηλότερη ικανότητα πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού είχε το μοντέλο που αναπτύχθηκε με τα δεδομένα της σάρκας του φιλέτου υπό MAP συνθήκες. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) είχε τιμή 0,77, 0,41 και 0,64 για την βαθμονόμηση, την επικύρωση και την πρόβλεψη του μοντέλου, αντίστοιχα, ενώ τα αντίστοιχα RMSE είχαν τιμές 0,62 1,00 και 0,81. Αντίθετα, την χαμηλότερη επίδοση είχαν τα μοντέλα πρόβλεψης για το ολόκληρο λαβράκι ($R^2 = 0,29$) και για το δέρμα του φιλέτο λαβρακιού υπό MAP ($R^2 = 0,30$). Η

διαγραμματική απεικόνιση της απόδοσης των μοντέλων (προβλεπόμενη OMX προς παρατηρούμενη OMX) φαίνεται στο Σχήμα 3.10.

Πίνακας 3.6 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για το ολόκληρο λαβράκι (δέρμα), το φιλέτο λαβρακιού στον αέρα (δέρμα) και το φιλέτο λαβρακιού σε MAP συνθήκες (δέρμα και σάρκα) με βάση τα φασματικά δεδομένα του FTIR.

FTIR – Λαβράκι					
		Ολόκληρο Δέρμα	Φιλέτο (αέρας) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Δέρμα	Φιλέτο (MAP) Σάρκα
Calibration	Samples	76	72	74	74
	Slope	0.64	0.96	0.77	0.77
	Offset	2.44	0.27	1.67	1.68
	RMSE	1.06	0.32	0.63	0.62
	R ²	0.64	0.96	0.77	0.77
Validation	Slope	0.59	0.74	0.32	0.58
	Offset	2.79	2.01	4.90	2.96
	RMSE	1.21	0.90	1.20	1.00
	R ²	0.54	0.72	0.18	0.41
Prediction	Samples	36	40	36	35
	Slope	0.49	0.53	0.41	0.64
	Offset	3.49	3.54	4.50	2.51
	RMSE	1.39	1.47	1.01	0.81
	R ²	0.29	0.55	0.30	0.64
Info		Training: 0, 4, 8 °C Testing: 12 °C and dynamic	Training: 0, 4, 8 °C Testing: 12 °C and dynamic, 2 nd derivative-S. Goley transformation	Training: 0, 4, 8 °C Testing: 12 °C and dynamic, 2 nd derivative- S. Goley transformation	Training: 0, 4, 8 °C Testing: 12 °C and dynamic



Σχήμα 3.10 Προβλεπόμενη τιμή OMX σε συνάρτηση με την παρατηρούμενη τιμή OMX με βάση τα δεδομένα του FTIR για α) το ολόκληρο λαβράκι (δέρμα), β) για το φιλέτο λαβρακιού στον αέρα (δέρμα), γ) για το φιλέτο λαβρακιού σε MAP (δέρμα) και για το φιλέτο λαβρακιού σε MAP (σάρκα).

3.5.3. Συσχέτιση των δεδομένων της Ηλεκτρονικής μύτης (E-nose) με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα

Για την αξιοποίηση των δεδομένων της ηλεκτρονικής μύτης χρησιμοποιήθηκε η πολυπαραγοντική στατιστική μέθοδος διακριτική ανάλυση με την μέθοδο των μερικών τετραγώνων (PLS-DA) με σκοπό τον διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε δύο υποσύνολα με βάση των βαθμό αλλοίωσης τους. Συγκεκριμένα, διαχωρίστηκαν σε φρέσκα (Φ) δείγματα με πληθυσμό OMX έως 7 log CFU/g και αλλοιωμένα (Α) με πληθυσμό OMX από 7 log CFU/g και πάνω. Τα αποτελέσματα των μοντέλων ανάπτυξης καθώς και αυτά της εσωτερικής επικύρωσης για την ολόκληρη τσιπούρα, το φιλέτο τσιπούρας που συντηρήθηκε στον αέρα και το φιλέτο τσιπούρας που συντηρήθηκε υπό MAP παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7. Ο πίνακας δίνει την % ευαισθησία του μοντέλου ως προς την σωστή αναγνώριση και ταξινόμηση των φρέσκων ή αλλοιωμένων δειγμάτων στην κάθε κατηγορία και την % συνολική ακρίβεια ως προς την συνολική επίδοση στην κατηγοριοποίησης τόσο των φρέσκων όσο και των αλλοιωμένων δειγμάτων.

Το μοντέλο πρόβλεψης του φιλέτου τσιπούρας σε αέρα είχε την μεγαλύτερη συνολική ακρίβεια (67,7 %) ως προς τον διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις

2 κατηγορίες. Παρόλα αυτά, ένα μικρό ποσοστό των φρέσκων δειγμάτων ταξινομήθηκε σωστά ως φρέσκα (20,59 %), ενώ η ευαισθησία ως προς την ταξινόμηση των αλλοιωμένων δειγμάτων ήταν 92,31 % (Πίνακας 3.7.β). Την αμέσως μεγαλύτερη ακρίβεια είχε το μοντέλο πρόβλεψης της αλλοίωσης του φιλέτου τσιπούρας υπό MAP συνθήκες (Πίνακας 3.7.γ), ενώ ακολούθησε εκείνο της ολόκληρης τσιπούρας (Πίνακας 3.7.α) σε ποσοστό 57,45 % και 54,90 %, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.7 Πίνακες απόδοσης για την εκπαίδευση και επικύρωση των μοντέλων PLS-DA με βάση τα φασματικά δεδομένα της ηλεκτρονικής μύτης στην ταξινόμηση α) της ολόκληρης τσιπούρας, β) του φιλέτου τσιπούρας στον αέρα και γ) του φιλέτου τσιπούρας σε MAP σε 2 κατηγορίες ποιότητας, φρέσκο (Φ) και αλλοιωμένο (Α).

α) Ολόκληρη τσιπούρα (αέρας)

Εκπαίδευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	16	9	25	64,00
A	14	12	26	46,15
Σύνολο	30	21	51	(Ακρίβεια) 54,90

Επαλήθευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	3	1	4	64,00
A	5	1	6	16,67
Σύνολο	8	2	10	(Ακρίβεια) 40,00

β) Φιλέτο τσιπούρας (αέρας)

Εκπαίδευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	7	27	34	20,59
A	5	60	65	92,31
Σύνολο	12	87	99	(Ακρίβεια) 67,68

Επαλήθευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	1	3	4	25,00
A	2	4	6	66,67
Σύνολο	3	7	10	(Ακρίβεια) 50,00

γ) Φιλέτο τσιπούρας (MAP)

Εκπαίδευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	27	17	44	61,36
A	20	27	47	57,45
Σύνολο	47	44	91	(Ακρίβεια) 59,34

Επαλήθευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	3	2	5	60,00
A	3	2	5	40,00
Σύνολο	6	4	10	(Ακρίβεια) 50,00

Φ: Φρέσκο (< 7 log CFU/g)

A: Αλλοιωμένο (> 7 log CFU/g)

Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοντέλων ανάπτυξης της πολυπαραγοντικής στατιστικής μεθόδου διακριτική ανάλυση με την μέθοδο των μερικών τετραγώνων (PLS-DA) και της εσωτερικής επικύρωσης των μοντέλων για το ολόκληρο λαβράκι, το φιλέτο λαβρακιού στον αέρα και το φιλέτο λαβρακιού υπό MAP συνθήκες.

Στην περίπτωση των δειγμάτων λαβρακιού παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μεγάλη απόκλιση ως προς την ευαισθησία του μοντέλου να ταξινομήσει σωστά τα φρέσκα από τα αλλοιωμένα δείγματα. Για παράδειγμα στο ολόκληρο λαβράκι (Πίνακας 3.8.α) το μοντέλο πρόβλεψης αναγνώρισε σωστά τα φρέσκα δείγματα σε ποσοστό 79,63 %, ενώ τα αλλοιωμένα τα κατηγοριοποίησε στην σωστά με ποσοστό 36,17 %. Συνολικά, ωστόσο, η ακρίβεια του μοντέλου διαμορφώθηκε σε 59,41 %. Παρόμοια απόκλιση είχαν τα δείγματα του φιλέτου λαβρακιού υπό MAP (Πίνακας 3.8.γ), όπου το μοντέλο πρόβλεψης είχε συνολική ακρίβεια 66,67 %. Αντίστροφα αποτελέσματα είχε το μοντέλο πρόβλεψης για το φιλέτο λαβρακιού στον αέρα (Πίνακας 3.8.β), όπου η ταξινόμηση των φρέσκων δειγμάτων είχε ευαισθησία 21,95 % και των αλλοιωμένων 86,79 %.

Πίνακας 3.8 Πίνακες απόδοσης για την πρόβλεψη και επικύρωση των μοντέλων PLS-DA με βάση τα φασματικά δεδομένα της ηλεκτρονικής μύτης στην ταξινόμηση α) του ολόκληρου λαβρακιού, β) του φιλέτου λαβρακιού στον αέρα και γ) του φιλέτου λαβρακιού σε MAP σε 2 κατηγορίες ποιότητας, φρέσκο (Φ) και αλλοιωμένο (Α).

α) Ολόκληρο λαβράκι (αέρας)

Εκπαίδευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	43	11	54	79,63
A	30	17	47	36,17
Σύνολο	73	28	101	(Ακρίβεια) 59,41

Επαλήθευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	4	2	6	66,67
A	3	1	4	25,00
Σύνολο	7	3	10	(Ακρίβεια) 50,00

β) Φιλέτο λαβρακιού (αέρας)

Εκπαίδευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	9	32	41	21,95
A	7	46	53	86,79
Σύνολο	16	78	94	(Ακρίβεια) 58,51

Επαλήθευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	0	4	4	0,00
A	4	2	6	33,33
Σύνολο	4	6	10	(Ακρίβεια) 20,00

γ) Φιλέτο λαβρακιού (MAP)

Εκπαίδευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	13	17	30	43,33
A	6	33	39	84,62
Σύνολο	19	50	69	(Ακρίβεια) 66,67

Επαλήθευση

Κατηγορία	Προβλεπόμενη κατηγορία			%
	Φ	A	Σύνολο	
Φ	1	3	4	25,00
A	1	5	6	83,33
Σύνολο	2	8	10	(Ακρίβεια) 60,00

Φ: Φρέσκο (< 7 log CFU/g)

A: Αλλοιωμένο (> 7 log CFU/g)

3.5.4. Αποτελέσματα νοθείας

3.5.4.1. Πολυφασματική Απεικόνιση (MSI)

Χρησιμοποιώντας τη διακριτική ανάλυση με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), διερευνήθηκε η ικανότητα της Πολυφασματικής Απεικόνισης να διαχωρίζει και να ταξινομεί τα προϊόντα μπιφτεκιών από τσιπούρα και παγκάσιους σε κατηγορίες με βάση το ποσοστό της νοθείας, αλλά και να διακρίνει τα αμιγώς μπιφτεκία τσιπούρας από τα αμιγώς μπιφτεκία παγκάσιους. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν με βάση το ποσοστό νοθείας σε κατηγορίες: 100 (100% κιμάς τσιπούρας), 10 (90% κιμάς τσιπούρας και 10 % παγκάσιους), 20 (80% κιμάς τσιπούρας και 20 % παγκάσιους), 30 (70% κιμάς τσιπούρας και 30 % παγκάσιους), 40 (60% κιμάς τσιπούρας και 40 % παγκάσιους), 50 (50% κιμάς τσιπούρας και 50 % παγκάσιους), και 0 (100% κιμάς παγκάσιους). Τα δείγματα κάθε κατηγορίας ήταν 30 και στο σύνολο τους 210. Για την βέλτιστη απόδοση του μοντέλου τα φασματικά δεδομένα του MSI τροποποιήθηκαν με Standard Normal Variate (SNV) μετασχηματισμό.

Στον Πίνακα 3.9 παρατίθενται ο πίνακας απόδοσης για την πρόβλεψη του μοντέλου ως προς την αναγνώριση και τη κατηγοριοποίηση των αμιγώς μπιφτεκιών τσιπούρας και των νοθευμένων μπιφτεκιών στο σύνολο τους, δηλαδή μπιφτεκία με 10 - 50 % και 100 % παγκάσιους. Δίνονται σε ποσοστά η ευαισθησία (δείγματα που έχουν ταξινομηθεί σωστά στην χ κατηγορία/δείγματα της χ κατηγορίας, 30 ή 180) και η συνολική ακρίβεια του μοντέλου (όλα τα δείγματα που ταξινομήθηκαν σωστά/όλα τα δείγματα, 210). Τα 100% μπιφτεκία από τσιπούρα (κατηγορία 100) αναγνωρίστηκαν με ευαισθησία 96,97 %, ενώ η επίδοση του μοντέλου για την αναγνώριση των διαφορετικών επιπέδων νοθείας (N, νοθεία) ήταν 73,89 %.

Πίνακας 3.9 Πίνακας απόδοσης των μοντέλων PLS-DA με βάση τα φασματικά δεδομένα του MSI για την ταξινόμηση των δειγμάτων σε 2 κατηγορίες: N (μπιφτέκια με 10 – 50 % παγκάσιους και 100 % παγκάσιους) και 100 (αμιγώς μπιφτέκι τσιπούρας).

Πρόβλεψη				
Προβλεπόμενες κατηγορίες				
Κατηγορίες	N	100	Σύνολο	% Ευαισθησία
N	133	47	180	73,89
100	1	29	30	96,67
Σύνολο	134	76	210	77,14

Αναλυτικότερα, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.10, το μοντέλο πρόβλεψης για τα νοθευμένα μπιφτέκια με 10 – 30 % παγκάσιους αδυνατούσε πλήρως να τα ταξινομήσει στην ακριβή κατηγορία που ανήκουν. Το ποσοστό ευαισθησίας κυμαινόταν από 3,33 – 13,33 %, με το μικρότερο ποσοστό να αντιστοιχεί στα μπιφτέκια με 30 % παγκάσιους και το μεγαλύτερο σε εκείνα με το 10 % παγκάσιους. Στην περίπτωση των 10 και 20 % νοθευμένων μπιφτεκιών, αυτό συνέβη διότι αναγνώριζε ένα μεγάλο ποσοστό των δειγμάτων ως 100 % τσιπούρας. Παρόλα αυτά, από το σύνολο των δειγμάτων το μοντέλο αναγνώρισε το 64 % (134/210) ως μη καθαρά μπιφτέκια τσιπούρας, είτε αυτά άνηκαν σε αμιγώς μπιφτέκια παγκάσιους είτε σε άλλα ποσοστά.

Πίνακας 3.10 Πίνακας απόδοσης για την πρόβλεψη (α) και την εσωτερική επικύρωση (β) των μοντέλων PLS-DA για την ταξινόμηση των δειγμάτων μπιφτεκιού στα διαφορετικά επίπεδα νοθείας με βάση τα φασματικά δεδομένα του MSI.

α) Πρόβλεψη

Προβλεπόμενες κατηγορίες									
Κατηγορίες	0	100	50	40	30	20	10	Σύνολο	% Ευαισθησία
0	30	0	0	0	0	0	0	30	100,00
100	0	29	0	0	0	0	1	30	96,67
50	2	0	22	6	0	0	0	30	73,33
40	2	1	14	12	0	1	0	30	40,00
30	0	8	9	9	1	2	1	30	3,33
20	0	15	4	5	1	2	3	30	6,67
10	0	23	1	2	0	0	4	30	13,33
Σύνολο	34	76	50	34	2	5	9	210	46,62

β) Επικύρωση

Κατηγορίες	Προβλεπόμενες κατηγορίες							Σύνολο	% Ευαισθησία
	0	100	50	40	30	20	10		
0	30	0	0	0	0	0	0	30	100,00
100	0	29	0	0	0	0	1	30	96,67
50	4	0	21	5	0	0	0	30	70,00
40	3	1	14	10	0	1	1	30	33,33
30	1	9	9	9	0	2	0	30	0,00
20	0	16	6	4	0	1	3	30	3,33
10	0	22	2	2	1	1	2	30	6,67
Σύνολο	38	77	52	30	1	5	7	210	44,29

Κατηγορία 0: 100% παγκάσιους, κατηγορία 100: 100% τσιπούρα, κατηγορία 50: 50 % τσιπούρα – 50% παγκάσιους, κατηγορία 40: 60 % τσιπούρα – 40% παγκάσιους, κατηγορία 30: 70 % τσιπούρα – 30% παγκάσιους, κατηγορία 20: 80 % τσιπούρα – 20% παγκάσιους, κατηγορία 10: 90 % τσιπούρα – 10% παγκάσιους

3.5.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η μέθοδος PLS-DA εφαρμόστηκε στα φασματικά δεδομένα του FTIR για την ταξινόμηση των νοθευμένων μπιφτεκίων τσιπούρας στις κατηγορίες νοθείας. Η ανάλυση των δεδομένων περιορίστηκε στο φασματικό εύρος 900 – 1800 cm^{-1} και 2700 – 3100 cm^{-1} , όπου υπάρχουν κορυφές χαρακτηριστικές των πρωτεϊνών και των λιπαρών οξέων. Στους Πίνακες 3.11 και 3.12 δίνονται σε ποσοστά η ευαισθησία (δείγματα που έχουν ταξινομηθεί σωστά στην χ κατηγορία/σωστά δείγματα της χ κατηγορίας, 30 ή 180) και η συνολική ακρίβεια του μοντέλου (όλα τα δείγματα που ταξινομήθηκαν σωστά/όλα τα δείγματα, 210).

Το μοντέλο πρόβλεψης δεν κατάφερε να ξεχωρίσει τα μπιφτεκία τσιπούρας από τα νοθευμένα δείγματα. Συγκεκριμένα, ταξινόμησε πλήρως τα αμιγώς μπιφτεκία τσιπούρας (κατηγορία 100) ως νοθευμένα μπιφτεκία (κατηγορία N) είτε αυτά ήταν αποκλείστηκα από παγκάσιους είτε άνηκαν στα μπιφτεκία με 10 – 50 % παγκάσιους (Πίνακας 3.11). Τα νοθευμένα μπιφτεκία ταξινομήθηκαν με ευαισθησία 100 %.

Πίνακας 3.11 Πίνακας απόδοσης των μοντέλων PLS-DA με βάση τα φασματικά δεδομένα του FTIR για την ταξινόμηση των δειγμάτων σε 2 κατηγορίες: N (μπιφτεκία με 10 – 50 % παγκάσιους και 100 % παγκάσιους) και 100 (αμιγώς μπιφτεκί τσιπούρας).

Κατηγορίες	Πρόβλεψη			% Ευαισθησία
	Προβλεπόμενες κατηγορίες			
	N	100	Σύνολο	
N	180	0	180	100
100	30	0	30	0
Σύνολο	210	0	210	85,71

Τα αποτελέσματα για την πρόβλεψη και την εσωτερική επικύρωση του μοντέλου στην ταξινόμηση των μπιφτεκιών σε συγκεκριμένες κατηγορίες δίνονται στον Πίνακα 3.12. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει αδυναμία κατηγοριοποίησης των νοθευμένων μπιφτεκιών στις σωστές κατηγορίες που αγγίζει το ποσοστό 0 % για τα 10 - 50 % νοθευμένα μπιφτεκία τσιπούρας από παγκάσιους, αλλά και των 100 % μπιφτεκιών τσιπούρας (0 %). Η εσωτερική επικύρωση και στις 7 κατηγορίες είχε ευαισθησία 0 %. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε πάνω από δύο κατηγορίες ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα να μην αντιστοιχεί κάποιος συγκεκριμένος αριθμός στις υπόλοιπες κατηγορίες νοθείας (αναγράφεται ως παύλα στον πίνακα). Στο σύνολο των αποτελεσμάτων σαφή ταξινόμηση έλαβαν 121/210 δείγματα.

Πίνακας 3.12 Πίνακες απόδοσης για την πρόβλεψη (α) και την εσωτερική επικύρωση (β) των μοντέλων PLS-DA για την ταξινόμηση των δειγμάτων μπιφτεκιού στα διαφορετικά επίπεδα νοθείας με βάση τα φασματικά δεδομένα του FTIR.

α) Πρόβλεψη

Κατηγορίες	Προβλεπόμενες κατηγορίες							Σύνολο	Ευαισθησία %
	0	100	50	40	30	20	10		
0	23	-	-	-	-	-	-	30	76,67
100	12	0	-	-	4	-	-	30	0,00
50	17	-	0	-	1	-	-	30	0,00
40	14	-	-	0	3	-	-	30	0,00
30	12	-	-	-	4	-	-	30	13,33
20	12	-	-	-	-	0	-	30	0,00
10	12	-	-	-	7	-	0	30	0,00
Σύνολο	102	0	0	0	19	0	0	210	22,31

β) Επικύρωση

Κατηγορίες	Προβλεπόμενες κατηγορίες							Σύνολο	Ευαισθησία %
	0	100	50	40	30	20	10		
0	0	1	1	-	1	-	-	30	0,00
100	15	0	-	-	4	-	-	30	0,00
50	14	-	0	-	1	-	-	30	0,00
40	11	-	-	0	-	-	-	30	0,00
30	7	1	-	-	0	-	-	30	0,00
20	15	-	-	-	-	0	-	30	0,00
10	14	-	-	-	4	-	0	30	0,00
Σύνολο	76	2	1	0	10	0	0	210	0,00

Κατηγορία 0: 100% παγκάσιους, κατηγορία 100: 100% τσιπούρα, κατηγορία 50: 50 % τσιπούρα – 50% παγκάσιους, κατηγορία 40: 60 % τσιπούρα – 40% παγκάσιους, κατηγορία 30: 70 % τσιπούρα – 30% παγκάσιους, κατηγορία 20: 80 % τσιπούρα – 20% παγκάσιους, κατηγορία 10: 90 % τσιπούρα – 10% παγκάσιους

3.5.4.3. Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fresh Detect)

Τα αποτελέσματα των φασματικών δεδομένων του Fresh Detect στην ταξινόμηση και κατηγοριοποίηση των δειγμάτων μπιφτεκίων στα διάφορα επίπεδα νοθείας παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.14. Για την βελτίωση της απόδοσης του μοντέλου εφαρμόστηκε SNV μετασχηματισμός.

Στον Πίνακα 3.13 φαίνεται η πλήρη ικανότητα του μοντέλου να αναγνωρίσει το καθαρό μπιφτέκι τσιπούρας (κατηγορία 100) με ευαισθησία 83,33 % (δείγματα που έχουν ταξινομηθεί σωστά στην κατηγορία 100/δείγματα της κατηγορίας 100, 30), ενώ τα νοθευμένα μπιφτεκία (10 - 50 % και 100 % από παγκάσιους) στο σύνολο τους διακρίνονται ως νοθευμένα με ποσοστό 82,78 %.

Παρόλα αυτά, υπάρχει χαμηλή ικανότητα ταξινόμησης των νοθευμένων δειγμάτων στις σωστές κατηγορίες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.14. Η ευαισθησία του μοντέλου κυμαίνεται από 3,33 % έως 56,67 %, με το μικρότερο ποσοστό να αντιστοιχεί στο 10 % νοθευμένο μπιφτέκι τσιπούρας και το μεγαλύτερο στο 50 % νοθευμένο μπιφτέκι. Είναι σημαντικό, ωστόσο ότι το μοντέλο αναγνωρίζει και κατηγοριοποιεί τα καθαρά μπιφτεκία τσιπούρας στην σωστή κατηγορία με ποσοστό 83,33 %. Η εσωτερική επικύρωση του μοντέλου δίνει παρόμοια αποτελέσματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι από το σύνολο των δειγμάτων το μοντέλο αναγνώρισε το 73,33 % (154/210) ως μη καθαρά μπιφτεκία τσιπούρας, είτε αυτά άνηκαν σε αμιγώς μπιφτεκία παγκάσιους είτε σε άλλα ποσοστά νοθείας.

Πίνακας 3.13 Πίνακας απόδοσης των μοντέλων PLS-DA με βάση τα φασματικά δεδομένα του Fresh Detect για την ταξινόμηση των δειγμάτων σε 2 κατηγορίες: N (μπιφτεκία με 10 - 50 % παγκάσιους και 100 % παγκάσιους) και 100 (αμιγώς μπιφτέκι τσιπούρας).

Πρόβλεψη				
Προβλεπόμενες κατηγορίες				
Κατηγορίες	N	100	Σύνολο	% Ευαισθησία
N	149	31	180	82,78
100	5	25	30	83,33
Σύνολο	154	56	210	82,86

Πίνακας 3.14 Πίνακας απόδοσης για την πρόβλεψη (α) και την εσωτερική επικύρωση (β) των μοντέλων PLS-DA για την ταξινόμηση των δειγμάτων μπιφτεκιού στα διαφορετικά επίπεδα νοθείας με βάση τα φασματικά δεδομένα του Fresh Detect.

α) Πρόβλεψη

Κατηγορίες	Προβλεπόμενες κατηγορίες							Σύνολο	% Ευαισθησία
	0	100	50	40	30	20	10		
0	30	0	0	0	0	0	0	30	100,00
100	0	25	0	2	0	3	0	30	83,33
50	5	1	17	3	2	2	0	30	56,67
40	9	1	8	4	7	1	0	30	13,33
30	6	4	6	4	2	6	2	30	6,67
20	4	8	3	1	3	11	0	30	36,67
10	1	17	2	1	2	6	1	30	3,33
Σύνολο	55	56	36	15	16	29	3	210	42,86

β) Επικύρωση

Κατηγορίες	Προβλεπόμενες κατηγορίες							Σύνολο	% Ευαισθησία
	0	100	50	40	30	20	10		
0	30	0	0	0	0	0	0	30	100,00
100	0	25	0	2	0	3	0	30	83,33
50	7	1	13	5	2	1	1	30	43,33
40	9	2	9	2	3	4	1	30	6,67
30	6	4	6	5	2	5	2	30	6,67
20	11	1	4	2	6	5	1	30	16,67
10	1	17	1	2	1	7	1	30	3,33
Σύνολο	64	50	33	18	14	25	6	210	37,14

Κατηγορία 0: 100% παγκάσιους, κατηγορία 100: 100% τσιπούρα, κατηγορία 50: 50 % τσιπούρα – 50% παγκάσιους, κατηγορία 40: 60 % τσιπούρα – 40% παγκάσιους, κατηγορία 30: 70 % τσιπούρα – 30% παγκάσιους, κατηγορία 20: 80 % τσιπούρα – 20% παγκάσιους, κατηγορία 10: 90 % τσιπούρα – 10% παγκάσιους

4. Συζήτηση

4.1. Μικροβιολογικά αποτελέσματα

Από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα φάνηκε ότι οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που κυριάρχησαν στην αλλοίωση των δειγμάτων τσιπούρας και λαβρακιού σε αερόβιες και υπό MAP συνθήκες ήταν των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν H₂S και των *Brochothrix thermosphacta*. Ακολούθησαν οι πληθυσμοί των Enterobacteriaceae και των Γαλακτικών βακτηρίων. Στην περίπτωση των ολόκληρων λαβρακιών, ο πληθυσμός των *B. thermosphacta* και των Γαλακτικών βακτηριών δεν απαριθμήθηκε.

Οι *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S έχουν βρεθεί ότι είναι οι κύριοι αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί της τσιπούρας ιχθυοτροφείου της περιοχής της Μεσογείου, κατά την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες 0, 8 και 15 °C (Koutsoumanis et al., 1999). Σε αυτή την μελέτη, τόσο τα Enterobacteriaceae όσο και τα Γαλακτικά βακτήρια βρεθήκαν σε χαμηλότερους πληθυσμούς (< 5 log CFU/g) κατά την συντήρηση στους 0 και 8 °C. Από τα βακτήρια που παράγουν H₂S, η *Shewanella putrefaciens* αποτελεί το κύριο είδος στους ιχθύες της Μεσόγειου (Tryfinopoulou et al., 2007). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι οι *Pseudomonas* spp. και η *S. putrefaciens* κυριαρχούν στη μικροχλωρίδα ιχθύων που συντηρήθηκαν στον αέρα υπό ψύξη ανεξάρτητα από την προέλευση των ιχθύων (Gram et al., 1996).

Στην περίπτωση των φιλέτων τσιπούρας και λαβρακιού που συντηρήθηκαν υπό MAP συσκευασία τα αρχικά επίπεδα του CO₂ ήταν 28,4 και 25,7 % (v/v) και του O₂ ήταν 0,3 και 0,6 % (v/v), αντίστοιχα. Αφού αυξήθηκε η συγκέντρωση του O₂, περίπου στο 20 % (v/v), η τελική συγκέντρωση και στα δύο είδη ιχθύων έγινε σχεδόν 0. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού των αερόβιων βακτηρίων, δηλαδή των *Pseudomonas* spp., που καταναλώνουν οξυγόνο και ως συνεπεία προκαλείται αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ στη συσκευασία (Ruiz-Capillas and Moral, 2001). Στην παρούσα εργασία οι τελικές συγκεντρώσεις CO₂ ήταν 36,8 και 40,7 % v/v στην τσιπούρα και στο λαβράκι, δηλαδή αυξήθηκαν σε σχέση με τις αρχικές τιμές. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους Govari et al. (2021) κατά την συντήρηση φιλέτων λαβρακιού υπό MAP συσκευασία με αρχική σύσταση CO₂:O₂:N₂ 31:23:46 στους 0, 4 8 και 12 °C. Σε αυτή τη μελέτη τα τελικά επίπεδα CO₂ αυξήθηκαν κυρίως στους 8 και 12 °C ξεπερνώντας το 50 % v/v.

Κατά την αλλοίωση των φιλέτων ιχθύων που συντηρήθηκαν σε αέρα και υπό MAP, το *B. thermosphacta* εντοπίστηκε ανάμεσα στους επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (*Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S). Σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι πληθυσμοί των *B. thermosphacta* και των *S. putrefaciens* ξεπέρασαν εκείνο των *Pseudomonas* spp. στη κουτσομούρα υπό MAP που περιείχε 50 % και 80 % CO₂, (*Mullus barbatus*) (Koutsoumanis et al., 2000) και στη τσιπούρα (*S. aurata*) υπό MAP με σύσταση 40 % CO₂, 30 % O₂ και 30 % N₂ (Drosinos and Nychas, 1996).

Επιπλέον, έχει φανεί ότι η MAP συσκευασία ευνοεί και την ανάπτυξη των Γαλακτικών βακτηρίων (LAB). Τα LAB παίζουν δευτερεύοντα ρόλο στη διαδικασία αλλοίωσης της

κουτσομούρας (*Mullus barbatus*) από ελληνικά ύδατα που συντηρούνται υπό MAP. Η παρουσία τους στη διαδικασία της αλλοίωσης ήταν εντονότερη καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση CO₂ (> 50 %) (Koutsoumanis et al., 2000). Τα βακτήρια αυτά συνήθως κυριαρχούν υπό MAP (Dalgaard, 2003) λόγω της ανοχής του σε αυξημένα επίπεδα CO₂ (Gill and Molin, 1991). Στην παρούσα εργασία τα Γαλακτικά βακτήρια δεν επικράτησαν έναντι των υπολοίπων. Σημαντικό ρόλο παίζει η σύνθεση των αερίων σε αυτήν την εργασία. Οι Pournis et al. (2005), χρησιμοποιώντας MAP συσκευασία με σύσταση CO₂:O₂:N₂ 60:10:30, διαπίστωσαν ότι τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S ήταν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης στον μεσογειακό κέφαλο (*Mullus surmuletus*), ενώ ο πληθυσμός των *B. thermosphacta* και LAB δεν ξεπέρασαν τα 5 log CFU/g. Ο πληθυσμός των LAB ήταν μεγαλύτερος στην αρχική μικροχλωρίδα σε σύγκριση με άλλους μικροοργανισμούς, αλλά δεν αυξήθηκε αρκετά κατά την συντήρηση. Είναι γνωστό ότι παρά την ποικιλομορφία και την αφθονία της αρχικής μικροχλωρίδας, η σύνθεση της αλλοιωμένης μικροχλωρίδας ευνοείται από τις συνθήκες συντήρησης, ιδιαίτερα τη θερμοκρασία και την ατμοσφαιρική σύνθεση (Dalgaard, 2003).

Συνολικά, ο τελικός πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. δεν διέφερε στα φιλέτα ιχθύων και στις δύο συνθήκες. Γενικότερα, έχει αναφερθεί ότι η ύπαρξη του CO₂ στη MAP συσκευασία καθυστερεί την αύξηση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όπως των *Pseudomonas* spp. (Sivertsvik et al., 2002).

Η επίδραση της MAP συσκευασίας δεν παρέτεινε τη διάρκεια ζωής σε αυτές τις συνθήκες αφού στο φιλέτο τσιπούρας στον αέρα και υπό MAP ο πληθυσμός της OMX ήταν παρόμοια. Παρόλο που το CO₂ είναι η κύρια παρεμποδιστική ένωση, οι υψηλές θερμοκρασίες εμποδίζουν την διάλυση του στο δείγμα, επηρεάζοντας τις ανασταλτικές του ιδιότητες με αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιακής και ενζυμικής δραστηριότητας (Sivertsvik et al., 2002). Αυτό το γεγονός δίνει έμφαση στην σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης των ολόκληρων ιχθύων (2 °C για 70 ώρες) ανέστειλε την αύξηση των Γαλακτικών βακτηρίων, του *B. thermosphacta* και των Enterobacteriaceae είτε σε όλη την διάρκεια της πειρατικής διαδικασίας είτε για ορισμένο χρονικό διάστημα (96 έως 120 ώρες) σε σύγκριση με τα φιλέτα ιχθύων σε αέρα και υπό MAP που συντηρήθηκαν σε μεταβαλλόμενο πρόγραμμα μεταξύ 4 °C - 15 °C. Η παρατήρηση αυτή τονίζει την ικανότητα της χαμηλής θερμοκρασίας να επιβραδύνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

4.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων παρατηρήθηκαν αλλαγές που είναι χαρακτηριστικές της αλλοίωσης. Εξάιρεση αποτελεί το ολόκληρο λαβράκι, καθώς διατήρησε σε αποδεκτό επίπεδο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Η υποβάθμιση των χαρακτηριστικών οφείλεται στα μεταβολικά προϊόντα των μικροοργανισμών. Έχει αναφερθεί ότι η *S. putrefaciens* χρησιμοποιεί το TMAO ως δέκτη ηλεκτρονίων υπό αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Το TMAO μετατρέπεται σε TMA, το οποίο γίνεται αντιληπτό ως έντονη μυρωδιά «ψαριού» και μυρωδιές που μοιάζουν με αμμωνία (Gram and Huss, 1996). Με την σειρά του το *B. thermosphacta* μεταβολίζει τη γλυκόζη σε λιπαρά

οξέα και αλκοόλες, προσδίδοντας έντονα την μυρωδιά και την γεύση του ξινού στα δείγματα (Gill, 2004). Οι *Pseudomonas* spp. είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή γλοιώδους υγρού (Ellis and Goodacre, 2001).

Η αλλοίωση των θαλασσινών συνεπάγεται την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε πληθυσμό μεγαλύτερο από $10^6 - 10^7$ CFU/g και η αλληλεπίδραση (ανταγωνισμός ή συμβίωση) μεταξύ διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξή τους και τον μεταβολισμό (Gram and Dalgaard, 2002). Ενδεικτικά, οι ιχθύες που αλλοιώνονται από τους *Pseudomonas* spp., τα οποία παράγουν ως επί το πλείστον πτητικές αζωτούχες ενώσεις, απαιτούν ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης περίπου 10^8 CFU/g. Παρόμοια, η *S. putrefaciens*, απαιτείται να έχει πληθυσμό μεγαλύτερο από 10^8 CFU/g για να γίνει ανιχνεύσιμη η δυσοσμία που προκαλείται. Σε φιλέτα μπακαλιάρου υπό συσκευασία με διάφορες συγκεντρώσεις CO₂ η ποσότητα του TMA που προκάλεσε την αλλοίωση του προϊόντος αντιστοιχεί σε πληθυσμό *S. putrefaciens* $10^8 - 10^9$ CFU/g (Dalgaard, 1995).

Στο ολόκληρο λαβράκι, ο τελικός πληθυσμός των OMX, των *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S προσδιορίστηκε από το μοντέλο Baranyi στα 8,16, 8,4 και 7,1 log CFU/g, αντίστοιχα, στις 216 ώρες. Αυτός ο πληθυσμός δεν ήταν αρκετός για την οργανοληπτική απόρριψη του δείγματος. Η οργανοληπτική απόρριψη των δειγμάτων φιλέτων λαβρακιού σε αέρα (144 ώρες) και υπό MAP (120 ώρες) και του φιλέτου τσιπούρας στον αέρα (96 ώρες) έγινε όταν οι επικρατέστεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί ήταν μεταξύ 8 - 9 log CFU/g. Σχετικά με την τσιπούρα υπό MAP, οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί είχαν πληθυσμό 7,7 log CFU/g την χρονική στιγμή της απόρριψης (120 ώρες). Σύμφωνα με τους Parlapani et al. (2015), κατά την συντήρηση ολόκληρου λαβρακιού στους 2 °C, η οργανοληπτική απόρριψη του δείγματος έγινε στις 9 ημέρες (216 ώρες) για τις αερόβιες συνθήκες και στις 13 ημέρες (312 ώρες) για τις MAP, όταν ο πληθυσμός της OMX ήταν 7,5 και 7 log CFU/g, των *Pseudomonas* spp. ήταν 7,2 και 6,4 log CFU/g και των βακτηρίων που παράγουν H₂S ήταν 6,7 και 6,4 log CFU/g, αντίστοιχα.

4.3. Αποτελέσματα pH

Όσον αφορά τις τιμές του pH, στα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων δεν καταγράφηκαν σημαντικές αλλαγές. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι η δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στην τιμή του pH. Συγκεκριμένα, οι αερόβιες συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp., οι οποίοι παράγουν μεταβολίτες, όπως αμμωνία, αμίνες και οργανικά σουλφίδια, οδηγώντας στην αύξηση του pH. Επιπλέον, η παραγωγή τριμεθυλαμίνης (TMA) κατά την αερόβια αναπνοή της *S. putrefaciens* έχει ως συνέπεια την αύξηση του pH (Boskou και Debevere, 2000). Στις MAP συνθήκες, το *B. thermosphacta* και τα Γαλακτικά είναι υπεύθυνα για την μείωση του pH, παράγοντας οργανικά οξέα, στα δείγματα (Parlapani et al., 2015). Επιπλέον, η ικανότητα του CO₂ που βρίσκεται στην συσκευασία MAP, να διαλύεται στους ιστούς των ιχθύων σχηματίζει ανθρακικό οξύ που είναι ικανό να προκαλέσει μία μικρή πτώση του pH (Babic-Milijasevic et al., 2019). Πράγματι, σε σκευασμένα φιλέτα σολομού Ατλαντικού σε ατμόσφαιρα (CO₂:N₂ 60:40)

στους 2 °C για 21 ημέρες η αρχική τιμή pH μειώθηκε από τους 6,4 στο 6,0 – 6,1 στο διάστημα 7 – 14 ημέρες συντήρησης (Hansen et al., 2009).

4.4. Εκτίμηση της μικροβιακής αλλοίωσης: MSI, FTIR, E-nose

Με βάση τα φασματικά δεδομένα της Πολυφασματικής Απεικόνισης (MSI), η μεγαλύτερη ικανότητα συσχέτισης των φασμάτων με τον πληθυσμό της OMX ($R^2 = 0,46$), υπολογίστηκε για την ολόκληρη τσιπούρα τσιπούρας (δέρμα). Αντίστοιχα το μοντέλο που αναπτύχθηκε για την σάρκα του φιλέτου λαβρακιού που συντηρήθηκε υπό MAP είχε την μεγαλύτερη επίδοση από τα δείγματα λαβρακιού ($R^2 = 0,59$). Στην δεύτερη περίπτωση, η πλευρά της σάρκας είχε καλύτερη απόδοση που μπορεί να οφείλεται στο ότι το δέρμα έχει μεγαλύτερη διακύμανση στις φασματικές τιμές από ότι η σάρκα (Fengou et al., 2019). Ωστόσο, αυτό δεν επιβεβαιώνεται από τα δείγματα της τσιπούρας.

Τα μοντέλα PLS-R αναπτύχθηκαν από τα φασματικά δεδομένα της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) στα δείγματα τσιπούρας και λαβρακιού από την πλευρά του δέρματος, καθώς και από την πλευρά της σάρκας στα φιλέτα ιχθύων που συντηρήθηκαν υπό MAP. Από το εύρος των φασμάτων που λαμβάνει το FTIR ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) αξιοποιήθηκαν στα φάσματα $3100-2700$ και 1800 και 900 cm^{-1} , καθώς αυτές οι περιοχές παρέχουν πληροφορίες για την αλλοίωση των δειγμάτων ιχθύων. Οι κορυφές στις φασματικές περιοχές $1750-1705\text{ cm}^{-1}$ και $2995-2860\text{ cm}^{-1}$ έχουν συσχετιστεί με τις λειτουργικές ομάδες των εστέρων, δηλαδή με τις καρβονυλικές και αιθυλικές ομάδες, αντίστοιχα. Η ύπαρξη αυτών των ομάδων μαρτυρά την μεταβολική δραστηριότητα του *Pseudomonas* spp.. Επίσης, η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών διακρίνεται και στις περιοχές $1540-900\text{ cm}^{-1}$, όπου ανακλά την ύπαρξη πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων ως συνέπεια αυτολυτικής ή μικροβιολογικής πρωτεόλυσης. Τέλος, η κορυφή κοντά στο 1640 cm^{-1} οφείλεται στον νερό (δεσμοί O-H) (Fengou et al., 2019). Η επίδοση των μοντέλων ήταν παρόμοια μεταξύ των δειγμάτων τσιπούρας. Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης R^2 για τις τέσσερες διαφορετικές μετρήσεις κυμάνθηκαν από 0,42 έως 0,58 με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο φιλέτο τσιπούρας στον αέρα και την μικρότερη στην πλευρά της σάρκας στο φιλέτο τσιπούρας υπό MAP συνθήκες. Μεγαλύτερη διακύμανση είχαν τα μοντέλα πρόβλεψης στα δείγματα λαβρακιού με τον μεγαλύτερο R^2 να έχει η σάρκα στο φιλέτο λαβρακιού υπό MAP συνθήκες ($R^2 = 0,64$) και την μικρότερη το ολόκληρο λαβράκι ($R^2 = 0,29$). Η μέθοδος FTIR έχει χρησιμοποιηθεί στην μελέτη των Govari et al. (2021) για την εκτίμηση του πληθυσμούς της OMX σε δείγματα λαβρακιού (δέρμα) που είχαν συντηρηθεί στους 0, 4, 8 και 12 °C σε αερόβιες και υπό MAP συνθήκες. Οι επιδόσεις των μοντέλων με βάση τα φασματικά δεδομένα ήταν αρκετά ικανοποιητικές, διαμορφώνοντας R^2 0,75 για τις αερόβιες συνθήκες και 0,99 για την MAP συσκευασία. Επιπλέον, σε μία άλλη μελέτη, το PLS-R μοντέλο που εφαρμόστηκε από την πλευρά του δέρματος σε δείγματα τσιπούρας στον αέρα που είχαν συντηρηθεί σε θερμοκρασίες 0, 4 και 8 °C είχε R^2 0,73 (Fengou et al., 2019).

Η ποιοτική ταξινόμηση των δειγμάτων τσιπούρας και λαβρακιού σε δύο υποκατηγορίες, φρέσκο και αλλοιωμένο, έγινε με βάση το πτητικό προφίλ ως συνέπεια της μικροβιακής δραστηριότητας. Από τα πιο γνωστά αέρια που παράγονται είναι το H_2S ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν H_2S (Fonnesbech-Vogel et al., 2005) με

κύριο εκπρόσωπο τα βακτήρια *S. putrefaciens*, και των Γαλακτικών βακτηρίων, καθώς και η αμμωνία εξαιτίας της δραστηριότητας των *Pseudomonas* spp. (Connil et al., 2002). Άλλες πτητικές ενώσεις που παράγονται στους ιχθύες περιλαμβάνουν την μεθυλμερκαπτάνη (*Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp.), το διμεθυλοδισουλφίδιο (*Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp. και LAB), το διμεθυλτρисуλφίδιο (*Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp.), τη 3-μεθυλ-1-βουτανόλη (*B. thermosphacta*) και τη τριμεθυλαμίνη (*Shewanella* spp. και Enterobacteriaceae) (Vajdi et al., 2019). Η συνολική ακρίβεια των μοντέλων της διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στην αναγνώριση και ταξινόμηση των δειγμάτων τσιπούρας και λαβρακιού ήταν μεταξύ 54,9 – 67,7 %. Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις, όπως είναι τα φιλέτα τσιπούρας και λαβρακιού στον αέρα, υπήρξε αδυναμία αναγνώρισης των φρέσκων δειγμάτων σε σύγκριση με την μεγαλύτερη ικανότητα ταξινόμησης των αλλοιωμένων. Βιβλιογραφικά, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που σχετίζονται με την ηλεκτρονική μύτη και την ικανότητα διάκρισης της αλλοίωσης των ιχθύων. Παρόλα αυτά, οι αισθητήρες της ηλεκτρονικής μύτης μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ των χημικών κατηγοριών αλλά έχουν μικρότερη ικανότητα διάκρισης μεταξύ ενώσεων με την ίδια χημική λειτουργικότητα, σύμφωνα με τους Berna et al. (2009).

4.5. Προσδιορισμός της νοθείας: MSI, FTIR, Fresh Detect

Η απάτη στα προϊόντα με ιχθύες και σε άλλα θαλασσινά είναι ένα ευρέως διαδεδομένο ζήτημα και συχνά κατατάσσονται στις κορυφαίες κατηγορίες προϊόντων τροφίμων που είναι επιρρεπή σε απάτη (Hassoun et al., 2020). Η νοθεία, όπως ορίζεται από τον FDA (2009) είναι η σκόπιμη υποκατάσταση ή προσθήκη μιας ουσίας σε ένα προϊόν με σκοπό την αύξηση της φαινομενικής αξίας του προϊόντος ή τη μείωση του κόστους παραγωγής του, δηλαδή για οικονομικό όφελος. Έτσι, η νοθεία των προϊόντων ιχθύων, όπως είναι τα μπιφτέκια και οι κροκέτες, προκύπτει με την υποκατάσταση των ιχθύων με είδη λιγότερο επιθυμητά ή φθηνότερα (Hassoun et al., 2020). Τα τρόφιμα που στερούνται την μορφολογική δομή, όπως είναι ο κιμάς είναι πιο προσιτά στη νοθεία (Ellis et al., 2015). Ανάμεσα στις τεχνικές που εφαρμόζονται για την παρακολούθηση τέτοιων πρακτικών είναι η ανάλυση DNA και οι μέθοδοι που βασίζονται στις πρωτεΐνες αλλά και στη φασματοσκοπία μάζας (Čapla et al., 2020).

Για την ανίχνευση της νοθείας στα μπιφτέκια ιχθύων χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος της Πολυφασματικής Απεικόνισης (MSI), της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και της Φασματοσκοπίας Φθορισμού (Fresh Detect). Η νοθεία συμβαίνει είτε με την πλήρη αντικατάσταση του ισχυριζόμενου είδους ιχθύ είτε με τη συμπληρωματική προσθήκη ενός οικονομικότερου είδους στα μπιφτέκια (Hassoun et al., 2020). Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν και οι δύο εκδοχές, παρασκευάζοντας μπιφτέκια από σάρκα τσιπούρας, μπιφτέκια από σάρκα παγκάσιους το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως το προϊόν νοθείας, καθώς και μπιφτέκια τσιπούρας με μερική υποκατάσταση από παγκάσιους σε ποσοστό 10, 20, 30, 40 και 50 % w/w. Για την βελτίωση της απόδοσης των μοντέλων που αναπτύχθηκαν προηγήθηκε Standard Normal Variate (SNV) μετασχηματισμός στα φασματικά δεδομένα του MSI και του Fresh Detect.

Το PLS-DA μοντέλο που αναπτύχθηκε από τα φασματικά δεδομένα του MSI διέκρινε πλήρως τα αμιγώς μπιφτέκια τσιπούρας από τα νοθευμένα. Η αναγνώριση των νοθευμένων μπιφτεκιών, ανεξαρτήτου κατηγορίας νοθείας, έγινε σε ποσοστό 73,9 %. Φάνηκε να υπάρχει αδυναμία αντιστοίχισης των νοθευμένων μπιφτεκιών με 10 – 50 % παγκάσιους στις σωστές κατηγορίες. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου ήταν ότι τα μπιφτέκια με 90 % τσιπούρα – 10 % παγκάσιους τα αναγνώρισε σε μεγάλο ποσοστό κοντά στα 76,7 % (23/30 δείγματα) ως καθαρά μπιφτέκια τσιπούρας. Είναι πιθανό τα αποτελέσματα αυτά να βελτιωθούν με μεγαλύτερο όγκο δειγμάτων. Η μέθοδος MSI έχει εφαρμοστεί για την ταχεία ανίχνευση νοθείας χοιρινού κιμά και κοτόπουλου. Από τα 9 επίπεδα νοθείας που εφαρμόστηκαν σε φρεσκοκομμένο κιμά (από 0 % χοιρινός κιμάς – 100 % κοτόπουλου έως 100 % χοιρινός κιμάς – 0 % κοτόπουλου) υπήρχε πλήρης διάκριση του 100 % κιμά κοτόπουλου. Τα ενδιάμεσα επίπεδα νοθείας (10 – 90 % από χοιρινό κιμά) προσδιορίστηκαν ως νοθευμένα με ευαισθησία 100 %, ενώ τα καθαρά δείγματα από χοιρινό κιμά με 78,6 % (Fengou et al., 2021).

Αντίθετα, από τα φάσματα που λήφθηκαν με τη μέθοδο του FTIR δεν υπήρξε διάκριση μεταξύ των μπιφτεκιών αποτελούμενα αποκλειστικά με σάρκα τσιπούρας από τα νοθευμένα μπιφτέκια με παγκάσιους. Επίσης, τα μπιφτέκια στα διάφορα ποσοστά νοθείας δεν μπορούσαν σε ένα μεγάλο μέρος να λάβουν ακριβή ταξινόμηση, αφού το μοντέλο τα ταξινομούσε σε πολλές κατηγορίες ταυτόχρονα. Από τα φάσμα του FTIR για την ανάπτυξη του PLS-DA μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν οι κυματαριθμοί 3100 – 2700 και 1800 – 900 cm^{-1} . Οι περιοχές αυτές περιέχουν κορυφές από λιπίδια, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, και ως αποτέλεσμα είναι πλούσια σε δομικές πληροφορίες. Ταυτόχρονα, οι εντάσεις των κορυφών είναι ανάλογες με τη συγκέντρωση της αντίστοιχης λειτουργικής τους ομάδας (Pare and Belanger, 1997). Η τσιπούρα παρόλο που εμφανίζει διαφορές στην σύνθεση των συστατικών της (πρωτεΐνες, λιπίδια και υγρασία) από το παγκάσιους η μέθοδος του FTIR δεν διέκρινε τις διαφορές στο σύνολο τους. Η ελληνική τσιπούρα ιχθυοτροφείου την περίοδο του καλοκαιριού (όπου διεξήχθη το πείραμα) εμφανίζει ένα εύρος ως προς την σύνθεση της που κυμαίνεται σε 69,91 – 74,40 % υγρασία, 18,30 – 20,27 % συνολική πρωτεΐνη, 3,90 – 10,37 % λίπος και 1,22 – 1,30 % τέφρα (Grigorakis et al., 2002, Grikorakis et al., 2004). Το παγκάσιους, από την άλλη, έχει 83,83 – 85,59 % υγρασία, 12,51 – 14,52 % συνολική πρωτεΐνη, 1,09 – 1,65 % ολικό λίπος και 0,76 – 2,38 % τέφρα (Guimarães et al., 2016). Από την διαθέσιμη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να εφαρμόζουν την μέθοδο FTIR για την ανίχνευση νοθευμένων μπιφτεκιών από ιχθύες. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την διάκριση της νοθείας δειγμάτων σολομού Νορβηγίας από δείγματα σολομού Heilongjiang (σολομός που προέρχεται από τον ποταμό Heilongjiang της Κίνας), αλλά όχι μπιφτεκιών. Οι δύο σολομοί αναγνωρίστηκαν με ακρίβεια 100%, αλλά η μέθοδος απέτυχε να ανιχνεύσει το ακριβές επίπεδο των 20 - 80% των νοθευμένων δειγμάτων σολομού Νορβηγίας (Wu et al., 2018).

Σχετικά με το Fresh Detect, η ευαισθησία του PLS-DA μοντέλου που αναπτύχθηκε πλησιάζει εκείνη του MSI. Παρόλο που αναγνώρισε πλήρως τα αμιγώς μπιφτέκια παγκάσιους, η σωστή ταξινόμηση των αμιγώς μπιφτεκιών τσιπούρας έγινε σε ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 83,3 %. Η ανικανότητα του μοντέλου να κατηγοριοποιήσει τα νοθευμένα μπιφτέκια 10 – 50 % παγκάσιους στην κατηγορία που ανήκουν, φάνηκε και σε αυτή την περίπτωση. Ωστόσο, τα νοθευμένα μπιφτέκια στο σύνολο τους (10 – 50 % από

παγκάσιους και 100 % από παγκάσιους) αναγνωρίστηκαν ως νοθευμένα σε ποσοστό 82,8 %. Ένα μεγάλο ποσοστό των μπιφτεκιών με 10 % παγκάσιους αντιστοιχήθηκαν ως 100 % τσιπούρας (57 %), με αποτέλεσμα η μέθοδος να θεωρηθεί μη αποτελεσματική στην ανίχνευση της ύπαρξης μικρών ποσοστών νοθείας στα μπιφτεκία ιχθύων. Παρόλο που η φασματοσκοπία φθορισμού βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση νοθευμένων προϊόντων, όπως στη διάκριση του παρθένου ελαιολάδου από άλλα έλαια (Poulli et al., 2007), δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να σχετίζονται στην ανίχνευση νοθευμένων δειγμάτων ιχθύων ή ακόμα και κρεάτων. Όσον αφορά τους ιχθύες, ο φθορισμός έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος για την ανίχνευση οστών σε φιλέτα ιχθύων (Huss et al., 1985). Επίσης, ο εγγενής φθορισμός των μυών του ιχθύ έχει αξιολογηθεί ως μια ταχεία και μη καταστροφική μέθοδος για την παρακολούθηση της φρεσκότητας των ιχθύων (Dufour et al., 2003) αλλά και για τη διάκριση των κατεψυγμένων από τους φρέσκους ιχθύες (Karoui et al., 2006). Ακόμα, μια μέθοδος φθορισμού αναπτύχθηκε για την άμεση πρόβλεψη της περιεκτικότητας σε ATP σε κατεψυγμένους ιχθύες διευκολύνοντας τις δραστηριότητες ποιοτικού ελέγχου σε οποιοδήποτε στάδιο της εμπορίας ιχθύων (Shibata et al., 2018). Σε αρκετές μελέτες, αποδείχθηκε η δυνατότητα του φθορισμού για την αξιολόγηση της μικροβιακής ποιότητας του κρέατος, συμπεριλαμβανομένου του βοείου κρέατος (Aït-Kaddour et al., 2011), του χοιρινού και αρνιού (Durek et al., 2016) και του φιλέτου από στήθος κοτόπουλου (Sahar et al., 2011). Τέλος, έχει φανεί η ικανότητα της φασματοσκοπίας φθορισμού να προβλέπει τη σύνθεση του συνολικού λίπους και των λιπαρών οξέων των μυών του βοείου κρέατος και να κάνει διάκριση μεταξύ τριών μυών βοείου κρέατος (*longissimus thoracis, rectus abdominis* και *semitendinosus*) (Aït-Kaddour et al., 2016).

4.6. Ανακεφαλαίωση

Συνοψίζοντας, ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα από την φασματοσκοπία FTIR ως μελλοντική μέθοδο για γρήγορη και μη επεμβατική αξιολόγηση της μικροβιακής αλλοίωσης δειγμάτων τσιπούρας. Μπορεί να έχει εφαρμογή είτε σε φιλέτα είτε σε ολόκληρους ιχθύες συντηρημένα σε αέρα και MAP συνθήκες με μετρήσεις που περιλαμβάνουν τόσο την πλευρά της σάρκας όσο και του δέρματος. Στην περίπτωση των δειγμάτων λαβρακιού βρίσκει καλύτερη εφαρμογή στο φιλέτο σε αερόβιες συνθήκες και στο φιλέτο υπό MAP από την πλευρά της σάρκας. Λιγότερο ικανοποιητικά ήταν τα αποτελέσματα του MSI και της Enose σε σύγκριση με του FTIR.

Το FTIR ως μέσο για την ανίχνευση των νοθευμένων μπιφτεκιών τσιπούρας από παγκάσιους είναι ακατάλληλο, αφού δεν μπορεί να διακρίνει τα αμιγώς καθαρά μπιφτεκία τσιπούρας από παγκάσιους. Η εφαρμογή του MSI θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση της νοθείας κυρίως σε μπιφτεκία τσιπούρας με ποσοστό νοθείας που ξεπερνά το 10 %. Ταυτόχρονα, υπάρχει πλήρη ικανότητα διάκριση σε περίπτωση αντικατάστασης του μπιφτεκιού τσιπούρας με μπιφτεκί από παγκάσιους. Τέλος, το Fresh Detect δίνει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την διάκριση των καθαρών μπιφτεκιών τσιπούρας και παγκάσιους και θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως ταχεία μέθοδος της ανίχνευσης της νοθείας. Χαμηλά ποσοστά νοθείας (10 %) δεν μπόρεσαν να αναγνωριστούν και σε αυτήν την περίπτωση.

Ωστόσο, η ανάπτυξη μοντέλων με εμπλουτισμένα πειραματικά δεδομένα θα μπορούσε να οδηγήσει στο μέλλον σε ακόμη περισσότερα αξιόπιστα αποτελέσματα σχετικά με την ανίχνευση της ποιότητας (φρέσκο ή αλλοιωμένο προϊόν) της ποσότητας (προσδιορισμός της OMX), και της πιθανής νοθείας των ιχθύων και των προϊόντων τους.

Βιβλιογραφία

- Abgrall, B. & Cleret, J. J. (1990). Evaluation of Petrifilm™ SM for the enumeration of the aerobic flora of fish. *Journal of Food Protection*, 3, 213-216.
- Aboras, M., Amasha, H., & Ibraheem, I. (2015). Issa Ibraheem. Early Detection of Melanoma Using Multispectral Imaging and Artificial Intelligence Techniques. *American Journal of Biomedical and Life Sciences. Special Issue: Spectral Imaging for Medical Diagnosis "Modern Tool for Molecular Imaging,"* 3(3), 29-33.
- Ahmed, G. U., Chakma, A., Shamsudin, M., Minar, M.H., Islam, T. and Majumdar, Z. (2013). Growth Performance of Thai Pangus (Pangasianodon Hypophthalmus) Using. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 2(3), 92-102.
- Aït-Kaddour, A., Thomas, A., Mardon, J., Jacquot, S., Ferlay, A., & Gruffat, D. (2016). Potential of fluorescence spectroscopy to predict fatty acid composition of beef. *Meat Science*, 113, 124-131.
- Aït-Kaddour, Abderrahmane, Boubellouta, T., & Chevallier, I. (2011). Development of a portable spectrofluorimeter for measuring the microbial spoilage of minced beef. *Meat Science*, 88(4), 675-681.
- Alasalvar, C., Taylor, K. D., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M. N., & Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*, 72(1), 33-40.
- Ampuero, S., & Bosset, J. O. (2003). The electronic nose applied to dairy products: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 94(1), 1-12.
- Aponte, M., Blaiotta, G., Francesca, N., & Moschetti, G. (2010). Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.) safety and quality? *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), 697-703.
- Asensio, M. A., Ordonez, J. A., & Sanz, B. (1988). Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf- life of refrigerated pork packed in plastic bags. *Journal of Food Protection*, 51, 356-360.
- 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* (Vol. 36).
- 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(1).
- Ballabio, D., & Todeschini, R. (2009). *Multivariate Classification for Qualitative Analysis. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* (1st ed.). Elsevier Inc.
- Banerjee, R., & Maheswarappa, N. B. (2019). Superchilling of muscle foods: Potential alternative for chilling and freezing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1256-1263.
- 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. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), 277-294.
- Barnett, H. J., Stone, F. E., Robert, G. C., Hunter, P. J., Nelson, R. W., & Kwok, J. (1982). *Marine Fisheries Review*, 44(3), 7-11.
- Barton II, F. E. (2002). Theory and principles of near infrared spectroscopy. In Baeten, V., Dardenne, P. (Eds.) (2002). *Spectroscopy: developments in instrumentation and analysis. NIR Spectroscopy*, 14(1), 2-18.
- Bauchot M. L. & Hureau J. C. (1990). Sparidae. Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). *JNIC (Paris)*, (2)790-812.
- Berk, Z. (2009). Refrigeration, chilling and freezing. In Z. Berk (Ed.), *Food Process Engineering and Technology* (pp. 391-411). Academic Press.

- Berkel, B.M., Boogaard B.V. & Heijnen, C. (2004). Preservation of Fish and Meat. *Agromisa Foundation (Netherlands)*.
- Berna, A. Z., Anderson, A. R., & Trowell, S. C. (2009). Bio-benchmarking of electronic nose sensors. *PLoS ONE*, 4(7).
- Beveridge, M., Phillips, M., Dugan, P., & Brummet, R. (2010). Barriers to aquaculture development as a pathway to poverty alleviation and food security. *Advancing the Aquaculture Agenda*, 4(October 2015), 345–359.
- Blanco Romía, M., & Alcalà Bernàrdez, M. (2009). *Multivariate Calibration for Quantitative Analysis. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Elsevier Inc (1st edition).
- Bolivar, A., Costa, J. C. C. P., Posada-Izquierdo, G. D., Pérez-Rodríguez, F., Bascón, I., Zurera, G., & Valero, A. (2017). Characterization of foodborne pathogens and spoilage bacteria in mediterranean fish species and seafood products. *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, (2017), 21–39.
- Boran, G., & Karacam, H. (2011). Seasonal changes in proximate composition of some fish species from the black sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 11, 1–5.
- Boskou, G., & Debevere, J. (2000). Shelf-life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmospheres. *Food Additives and Contaminants*, 17(1), 17–25.
- Boziaris, I. S. (2014). Introduction to Seafood Processing-Assuring Quality and Safety of Seafood. *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*, 1–8.
- Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017). *Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Elsevier Ltd.
- Calvo, J. H., Osta, R., & Zaragoza, P. (2002). Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pâté. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5265–5267.
- Čapla, J., Zajác, P., Čurlej, J., Belej, L., Kročko, M., Bobko, M., ... Vlčko, T. (2020). Procedures for The Identification and Detection of Adulteration of Fish and Meat Products. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2020(14), 978–994.
- Carstensen, J. M., & Folm-Hanse, J. (2003). An apparatus and a method of recording an object.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G. J., Villani, F., & Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45(PA), 83–102.
- Cawthorn, D. M., Steinman, H. A., & Hoffman, L. C. (2013). A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control*, 32(2), 440–449.
- Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R., & Engelsen, S. B. (2006). Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chemical Reviews*, 106(6), 1979–1994.
- Church, N. (1998). MAP Fish and Crustaceans Sensory Enhancement. *Journal of Food Science and Technology*, 12, 73–83.
- Comi, G. & Iacumin, L. (2012). Meat and fish products. In: Gobetti, G., Vincenzini, M., Farris, G.A., Neviani, E. (Eds.), *Food Microbiology*. (Milano, Italy), 153-196.
- Comi, G. (2017). *Spoilage of Meat and Fish. The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Elsevier Ltd.
- Connil, N., Prévost, H., & Dousset, X. (2002). Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 611–617.
- Coton, M., Joffraud, J. J., Mekhtiche, L., Leroi, F., & Coton, E. (2013). Biodiversity and dynamics of the bacterial community of packaged king scallop (*Pecten maximus*) meat during cold storage. *Food Microbiology*, 35(2), 99–107.
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 319–333.

- Dalgaard, P. (2000). Fresh and lightly preserved seafood. In Man C. M. D. & Jones A. A. Shelf-Life Evaluation of Food. *Aspen Publisher* (London, U.K), 110-139.
- Dalgaard, P. (2003). Spoilage of seafood. In Caballero, B., Trugo, L., & Finglas, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition. Academic Press (London)*, 2462-2472.
- Dalgaard, P., Gram, L., & Huss, H.H. (1993). Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 283-294.
- de la Rosa, I., Castro, P.L., Ginés, R. (2021). Twenty Years of Research in Seabass and Seabream Welfare during Slaughter. *Animals*, 11, 2164
- DiChristina, T. J., & DeLong E. F. (1994). Isolation of anaerobic respiratory mutants of *Shewanella putrefaciens* and genetic analysis of mutants deficient in anaerobic growth on Fe". *Journal of Bacteriology*, 176, 1464-1474.
- Diem, M. (1993). Introduction to Modern Vibrational Spectroscopy. *Wiley (New York)*.
- Dissing, B. S., Papadopoulou, O. S., Tassou, C., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2013). Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2268–2279.
- Draper, N. R. (1988). Response surface designs. *Encyclopedia of Statistical Sciences. Wiley (New York)*, 107–119.
- Drosinos, E.H., & Nychas, G.-J.E., 1996. *Brochothrix thermosphacta*, a dominant microorganism in Mediterranean fresh fish (*Sparus aurata*) stored under modified atmosphere. *Italian Journal of Food Science*, 4, 323_330.
- Duda, R. O., Hart, P. E., & Stork, D. G. (2000). *Pattern Classification (2nd edition). Wiley-Interscience (New York)*.
- Duflos, G., Coin, V. M., Cornu, M., Antinelli, J. F., & Malle, P. (2006). Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(4), 600–611.
- Dufour, É., Frenchia, J. P., & Kane, E. (2003). Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. *Food Research International*, 36(5), 415–423.
- Durek, J., Fröhling, A., Bolling, J., Thomasius, R., Durek, P., & Schlüter, O. K. (2016). Non-destructive mobile monitoring of microbial contaminations on meat surfaces using porphyrin fluorescence intensities. *Meat Science*, 115, 1–8.
- Dymerski, T. M., Chmiel, T. M., & Wardencki, W. (2011). Invited Review Article: An odor-sensing system-powerful technique for foodstuff studies. *Review of Scientific Instruments*, 82(11).
- 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(11), 414–424.
- Emborg, J., Laursen, B. G., & Dalgaard, P. (2005). Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C - Effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 101(3), 263–279.
- Erkan, N., & Özden, Ö. (2007). Proximate composition and mineral contents in aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) analyzed by ICP-MS. *Food Chemistry*, 102(3), 721–725.
- Faix, O. (1991). Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood (Wood)*, 45(1), 21–28.
- FAO, (2009). *Sparus aurata. In Cultured aquatic species fact sheets*. Text by Colloca, F. & Cerasi, S. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New.
- FAO, (2019a). *The State of World Fisheries and Aquaculture*.

- FAO, (2019b). *GLOBEFISH Highlights April 2019 ISSUE, with Jan. – Dec. 2018 Statistics – A quarterly update on world seafood markets*. Globefish Highlights. 2-2019
- FAO, (2020): *The State of World Fisheries and Aquaculture*.
- FAO-WHO, (2010). *Fisheries and Aquaculture Report No . 978 Report of the JOINT FAO / WHO EXPERT CONSULTATION ON THE RISKS AND BENEFITS OF FISH CONSUMPTION*, (978).
- Farber, J. M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology - A review. *Journal of Food Protection*, 54(1), 58–70.
- FDA (Food and Drug Administration). (1 May 2009). Public meeting on economically motivated adulteration.
- Fengou, L. C., Lianou, A., Tsakanikas, P., Gkana, E. N., 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(February 2018), 27–34.
- Fengou, L. C., Tsakanikas, P., & Nychas, G. J. E. (2021). Rapid detection of minced pork and chicken adulteration in fresh, stored and cooked ground meat. *Food Control*, 125(108002), 7.
- FGM (2001). *Annual report. Aquaculture in Greece (Grecce)*.
- FGM (2020). *Annual report. Aquaculture in Greece (Grecce)*.
- FGM (2021). *Annual report. Aquaculture in Greece (Grecce)*.
- Filipiak, W., Sponring, A., Baur, M. M., Filipiak, A., Ager, C., Wiesenhofer, H., ... Amann, A. (2012). Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. *BMC Microbiology*, 12(1), 1.
- Fonnesbech-Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Satomi, M., & Gram, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6689–6697.
- Fumière, O., Veys, P., Boix, A., von Holst, C., Baeten, V., & Berben, G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 13(SPEC. ISSUE), 59–70.
- Gardner, G. A. (1981). Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. In: Roberts, T. A., Hobbs, G., Christian, J. H. B., & Skovgaard, N. (Eds.), *Brochothrix thermosphacta in Spoilage of Meats*. Academic Press (London), 139-173.
- Ghaly, a E., Dave, D., Budge, S., & Brooks, M. S. (2010). Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques : Review Department of Process Engineering and Applied Science , Dalhousie University Halifax , Nova Scotia , Canada. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), 859–877.
- Gibson, R. S., Yeudall, F., Drost, N., Mtitimuni, B. M., & Cullinan, T. R. (2003). Experiences of a Community-Based Dietary Intervention to Enhance Micronutrient Adequacy of Diets Low in Animal Source Foods and High in Phytate: A Case Study in Rural Malawian Children. *Journal of Nutrition*, 133(11), 3992–3999.
- Gill, C. D., & Molin, G. (1991). Modified atmospheres and vacuum packaging. In Rusell, N.J., & Gould, G.W. (Eds.). *Food Preservatives* (Blackie, Glasgow), 172-199.
- Gill, O.-C. (2004). SPOILAGE , FACTORS AFFECTING. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 1324–1330.
- Goulas, A. E., Chouliara, I., Nessi, E., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2005). Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), 752–760.
- Govari, M., Tryfinopoulou, P., Parlapani, F. F., Boziaris, I. S., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2021). Quest of intelligent research tools for rapid evaluation of fish quality: FTIR spectroscopy and multispectral imaging versus microbiological analysis. *Foods*, 10(2).

- Gram, L. (2009). Microbiological spoilage of fish and seafood products. In: Spenser, W.H., Doyle, M.P. (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Food and Beverages*. Springer Science (New York), 87-119.
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121-137.
- Gram, L., & Huss, H. H. (2000). Fresh and processed fish and shellfish. In Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W., (Eds.) (1990). *The Microbiological Safety and Quality of Foods*. Chapman and Hall (London, UK), 472-506.
- Gram, L., Trolle, G., & Huss, H. H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0-degrees-C) and high (20-degrees-C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4(1), 65-72.
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C., & Huss, H. H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, 10, 303-316.
- Gram, Lone, & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria - Problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262-266.
- Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, 272(1-4), 55-75.
- Grigorakis, K., Alexis, M. N., Anthony Taylor, K. D., & Hole, M. (2002). Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(5), 477-484.
- Grigorakis, K., Alexis, M., Gialamas, I., & Nikolopoulou, D. (2004). Sensory, microbiological, and chemical spoilage of cultured common sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice: A seasonal differentiation. *European Food Research and Technology*, 219(6), 584-587.
- Grimmler, C., Kuhfuß, T., Heiden, M., & Schmidt, H. (2018). Non-invasive assessment of the bioburden of minced pork using a hand-held fluorescence device. *Technisches Messen*, 85(3), 177-183.
- Guillen, M., & Cabo, N. (1997). Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 1-11.
- Guimarães, C. F. M., Mársico, E. T., Monteiro, M. L. G., Lemos, M., Mano, S. B., & Conte Junior, C. A. (2016). The chemical quality of frozen Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets. *Food Science and Nutrition*, 4(3), 398-408.
- Hall, J. W., Valentine, K. G., Lefrant, S., Mevellec, J. Y., & Mulazzi, E. (1996). Spectroscopic properties of polyacetylenes synthesized via three modifications of Ziegler-Natta catalytic system. *Synthetic Metals*, 79, 183-88.
- Hansen, A. Å., Høy, M., & Pettersen, M. K. (2009). Prediction of optimal CO2 emitter capacity developed for modified atmosphere packaging of fresh salmon fillets (*Salmo salar* L.). *Packaging Technology and Science*, 22(4), 199-208.
- Hansen, J. F. (1999). PhD thesis. On chromatic and geometrical calibration. Technical University of Denmark.
- Hassoun, A., Måge, I., Schmidt, W. F., Temiz, H. T., Li, L., Kim, H.-Y., ... Cozzolino, D. (2020). Fraud in Animal Origin Food Products: Advances in Emerging Spectroscopic Detection Methods over the Past Five Years. *Foods*, 9, 1069.
- Hassoun, A., Sahar, A., Lakhal, L., & Ait-Kaddour, A. (2019). Fluorescence spectroscopy as a rapid and non-destructive method for monitoring quality and authenticity of fish and meat products: Impact of different preservation conditions. *Lwt*, 103(December 2018), 279-292.
- Hauzoukim, S., Stud, B. M.-J. E. Z., & 2020, U. (2020). Modified atmosphere packaging of fish and fishery products: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(4), 651-659.

- Herbert, R. A., & Shewan J. M. (1976). Roles played by bacterial and autolytic enzymes in the production of volatile sulphides in spoiling North Sea cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, 89-94.
- Heydt, C., Fassunke, J., Künstlinger, H., Ihle, M. A., König, K., Heukamp, L. C., ... Merkelbach-Bruse, S. (2014). Comparison of pre-analytical FFPE sample preparation methods and their impact on massively parallel sequencing in routine diagnostics. *PLoS ONE*, 9(8).
- Hubalkova, Z., Kralik, P., Tremlova, B., & Rencova, E. (2007). Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic: A review. *Veterinarni Medicina*, 52(7), 273-292.
- Huidobro, A., Pastor, A., Lopez-Caballero, M. E., & Tejada, M. (2001). Washing effect on the quality index method (QIM) developed for raw gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology*, 212, 408-412.
- Huis In't Veld, J. H. J. H. I. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1-18.
- Hultin, H. O. (1994). Oxidation of lipids in seafoods. *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*, 49-74.
- Huss, H. H., Sigsgaard, P., & Jensen, S. A. (1985). Fluorescence of fish bones. *Journal of Food Protection*, 48(5), 393-396.
- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, 348
- Hwang, G. C., H. Ushio, S. Watabe, M. Iwamoto & Hashimoto K. (1991). The effect of thermal acclimation on rigor mortis progress of carp stored at different temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 3.
- Illikoud, N., Gohier, R., Werner, D., Barrachina, C., Roche, D., Jaffrès, E., & Zagorec, M. (2019). Transcriptome and Volatilome Analysis During Growth of *Brochothrix thermosphacta* in Food: Role of Food Substrate and Strain Specificity for the Expression of Spoilage Functions. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1-14.
- Jabłoński, A. (1993). Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes. *Nature*, 131, 839-40.
- Jenkins, D. J. A., Sievenpiper, J. L., Pauly, D., Sumaila, U. R., Kendall, C. W. C., & Mowat, F. M. (2009). Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable? *Cmaj*,
- Joffraud, J. J., Leroi, F., Roy, C., & Berdagué, J. L. (2001). Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66(3), 175-184.
- Karl, H., I. Lehmann, H. Rehbein, & Schubring, R. (2010). Composition and quality attributes of conventionally and organically farmed *Pangasius fillets* (*Pangasius hypophthalmus*) on the German market. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 56-66.
- Karoui, R., Thomas, E., & Dufour, E. (2006). Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets. *Food Research International*, 39(3), 349-355.
- Khayat, A., & Schwall, D. (1983). Lipid Oxidation in Seafood. *Food Technology*, 37, 130-140.
- Kietzmann, U., Priebe, K., Rakou, D., & Reichstein, K. (1969). Seefisch als Lebensmittel. Paul Parey Verlag Hamburg (Berlin).
- Kilcher, S., Loessner, M. J., & Klumpp, J. (2010). *Brochothrix thermosphacta* bacteriophages feature heterogeneous and highly mosaic genomes and utilize unique prophage insertion sites. *Journal of Bacteriology*, 192(20), 5441-5453.
- Koutsoumanis, K. P., Taoukis, P. S., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (2000). Applicability of an arrhenius model for the combined effect of temperature and CO2 packaging on the spoilage microflora of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3528-3534.
- 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 and Environmental Microbiology*, 65(2), 698-706.

- Koutsoumanis, Konstantinos, Lampropoulou, K., & Nychas, G. J. E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15°C. *Journal of Food Protection*, 62(4), 398–402.
- Kyrana, V. R., & Lougovois, V. P. (2002). Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(3), 319–328.
- 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(4), 339–347.
- Lakowicz, J. R. (2006). *General features of protein fluorescence*. (J. R. Lakowicz, Ed.), *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Third). Springer.
- Lannelongue, M., Hanna, M. O., Finne, G., Nickelson, R., & Vanderzant, C. (1982). Storage characteristics of fin-fish fillets (*Archosargus probatocephalus*) packaged in modified gas atmospheres containing carbon dioxide. *Journal of Food Protection*, 45, 440–444.
- Laursen, B. G., Leisner, J. J., & Dalgaard, P. (2006). Carnobacterium Species: Effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3604–3611.
- Limbo, S., Sinelli, N., Torri, L., & Riva, M. (2009). Freshness decay and shelf life predictive modelling of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) applying chemical methods and electronic nose. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 977–984.
- Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11(2), 67–77.
- Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M. F., Dousset, X., & Joffraud, J. J. (2012). Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiology*, 30(1), 164–172.
- Magiati, M., Myridaki, V. M., Christopoulos, T. K., & Kalogianni, D. P. (2019). Lateral flow test for meat authentication with visual detection. *Food Chemistry*, 274(April 2018), 803–807.
- Malle, P., & Poumeyrol, M. (1989). A new chemical criterium for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of Food Protection*, 52, 419–423.
- Maricou, H., Pereira, D., Verschuere, L., Philips, S., & Verstraete, W. (1997). Measurement of Some Volatile Compounds by Means of the Electronic Nose. *Water, Air, and Soil Pollution*, 107, 423–442.
- Markovich, R. J. (1991). Introduction to Fourier transform infrared spectroscopy and applications in the pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical Research*, 8(6):663–75.
- Masniyom, P. (2011). Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33(2), 181–192.
- McClure, W. F. (2003). Review: 204 Years of near infrared technology: 1800–2003. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 11, 487–518.
- McKellar, R. C., & Lu, X. (2003). Primary models. In *Modeling Microbial Responses in Food* (pp. 21–62). CRC Press LLC.
- Messina, C. M., Bono, G., Renda, G., La Barbera, L., & Santulli, A. (2015). Effect of natural antioxidants and modified atmosphere packaging in preventing lipid oxidation and increasing the shelf-life of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) fillets. *Lwt*, 62(1), 271–277.
- Mireles Dewitt, C. A., & Oliveira, A. C. M. (2016). Modified atmosphere systems and shelf life extension of fish and fishery products. *Foods*, 5(3), 1–27.
- Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010.

- Journal of Food Science*, 77(4).
- Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144-167.
- Mousavi, S. M., Jahed Khaniki, G., Eskandari, S., Rabiei, M., Mirab Samiee, S., & Mehdizadeh, M. (2015). Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 47–51.
- Mousdis, G., & Mellou, F. (2017). Vibrational and Fluorescence Spectroscopy. *Food Authentication*, 298–324.
- Mushahida-Al-Noor, S., M. D. Hossain, & Islam, M. A. (2012). The study of fillet proximate composition, growth performance and survival rate of striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) fed with diets containing different amounts of alpha-tocopherol (vitamin-e). *Journal of Bioscience*, 20, 67–74.
- Nixon, G., & Burns, M. (2017). *Final report: Application of multispectral imaging (MSI) to food and feed sampling and analysis*.
- Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Bartkevičs, V., & Bērziņš, A. (2016). Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, 66(1), 1–15.
- Nowasad, A. (2007). Post-mortem changes and assessment of fish quality. *Participatory Training of Trainers: A New Approach Applied in Fish Processing*, (June), 329 p.
- Osborne, B. G. (2000). *Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Wiley (Chichester).
- Osman M. A., Ashoor S. H., & Marsh P. C. (1987). Liquid chromatographic identification of common fish species. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 70, 618–625.
- 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.
- Pare, J. R. J., & Belanger, J. M. R., (1997). *Instrumental Methods in Food Analysis*. Elsevier (New York).
- Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, K. A., & Boziaris, I. S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology*, 33(1), 85–89.
- Parlapani, Foteini 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.
- Parlapani, Foteini 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, Foteini 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.
- Peris, M., & Escuder-Gilabert, L. (2009). A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Analytica Chimica Acta*, 638(1), 1–15.
- Peter, C., Brünen-Nieweler, C., Cammann, K., & Borchers, T. (2004). Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. *European Food Research and Technology*, 219(3), 286–293.
- Puong, N. T., & Oanh, D. T. H. (2010). Striped catfish aquaculture in Vietnam: a decade of unprecedented development *Success stories in Asian aquaculture*. Springer, 131-147.
- Poulli, K. I., Mousdis, G. A., & Georgiou, C. A. (2007). Rapid synchronous fluorescence

- method for virgin olive oil adulteration assessment. *Food Chemistry*, 105(1), 369–375.
- Pournis, N., Papavergou, A., Badeka, A., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2005). Shelf-life extension of refrigerated Mediterranean mullet (*Mullus surmuletus*) using modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2201–2207.
- Primrose, S., Woolfe, M., & Rollinson, S. (2010). Food forensics: Methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 21(12), 582–590.
- Roberts, T. A. (1989). Combinations of antimicrobials and processing methods. *Food Technology*, 43,156–163.
- Roberts, T. R., & Vidthayanon, C. (1991). Systematic Revision of the Asian Catfish Family Pangasiidae, with Biological Observations and Descriptions of Three New Species. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 143, 97-143.
- Rodríguez-Méndez, M. L., Gay, M., Apetrei, C., & De Saja, J. A. (2009). Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensor system based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta*, 54(27), 7033–7041.
- Roels, J. A., & Kossen, N. W. F. (1978). On the modeling of microbial metabolism. *Progress in Industrial Microbiology*, 14, 95-203.
- 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., 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.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001). Chilled bulk storage of gutted hake (*Merluccius merluccius* L.) in CO₂ and O₂ enriched controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 74(3), 317–325.
- Rutherford, T. J., Marshall, D. L., Andrews, L. S., Coggins, P. C., Wes Schilling, M., & Gerard, P. (2007). Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. *Food Microbiology*, 24(7–8), 703–710.
- Sahar, A., Boubellouta, T., & Dufour, É. (2011). Synchronous front-face fluorescence spectroscopy as a promising tool for the rapid determination of spoilage bacteria on chicken breast fillet. *Food Research International*, 44(1), 471–480.
- Şakalar, E., Abasiyanik, M. F., Bektik, E., & Tayyrov, A. (2012). Effect of Heat Processing on DNA Quantification of Meat Species. *Journal of Food Science*, 77(9).
- Schormüller, J. (1968). Handbuch der Lebensmittelchemie (Band III/2). *Springer*.
- Scott, J. H., & Nealson K. H. (1994). A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 176, 3408-3411
- Shenk, J. S., Workman, J. J., & Weterhans, M. O. (2001). Application of NIRS to agricultural products. In Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (Ed.). *Handbook of Near-Infrared Analysis (New York)*, 16, 419–74.
- Shibata, M., ElMasry, G., Moriya, K., Rahman, M. M., Miyamoto, Y., Ito, K., ... Okazaki, E. (2018). Smart technique for accurate monitoring of ATP content in frozen fish fillets using fluorescence fingerprint. *LWT - Food Science and Technology*, 92(August 2017), 258–264.
- Sikorska, E., Khmelinskii, I., & Sikorski, M. (2019). *Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation. Evaluation Technologies for Food Quality*. Elsevier Inc.
- Sikorski, Z. E., Lolakowska, A., & Pan, B. S. (1990). The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In Sikorski Z. E. (Ed.) (1990), *Resources Nutritional Composition and Preservation*. CRC Press-Inc (Boca Raton, Florida), 30–52.

- 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(2), 107–127.
- Sotelo C. G., Pineiro C., Gallardo J. M., & Perez-Martin R. I. (1993). Fish species identification in seafood products. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 395–401.
- Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the Public Health Threat of Food Fraud. *Journal of Food Science*, 76(9).
- Spyrelli, E. D., Doulgeraki, A. I., Argyri, A. A., Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & George-John, E. N. (2020). Implementation of multispectral imaging (MSI) for microbiological quality assessment of poultry products. *Microorganisms*, 8(4).
- Spyrelli, E. D., Ozcan, O., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2021). Spoilage assessment of chicken breast fillets by means of fourier transform infrared spectroscopy and multispectral image analysis. *Current Research in Food Science*, 4(September 2020), 121–131.
- Stansby, M. E. (1976). Chemical characteristics of fish caught in the northeast Pacific Ocean. *Marine Fisheries Review*, 38, 1–11.
- Surette, C. E. (2008). The science behind dietary omega-3 fatty acids. *Canadian Medical Association Journal*, 178(1), 177–180.
- Surette, M.E., Gill T. A., & Leblanc P. J. (1988). Biochemical basis of post-mortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 19–22.
- Suzuki, T. (1981). Fish and krill protein. *Applied Science Publishers Ltd. (Barking, Essex, England)*.
- Tavares, J., Martins, A., Fidalgo, L. G., Lima, V., Amaral, R. A., Pinto, C. A., ... Saraiva, J. A. (2021). Fresh Fish Degradation and Advances in Preservation Using Physical Emerging Technologies, 1–20.
- Torri, L., Baroni, B., & Baroni, M. R. (2009). Modified Atmosphere, *Food Packages Free Press* (Porto Ceresio, Italy).
- 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(1), 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(3), 711–721.
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Panagou, E., & Nychas, G. J. (2016). Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*, 161, 606–614.
- Tsironi, T. N., & Taoukis, P. S. (2010). Modeling microbial spoilage and quality of gilthead seabream fillets: Combined effect of osmotic pretreatment, modified atmosphere packaging, and nisin on shelf life. *Journal of Food Science*, 75(4).
- Tsironi, T., Tsevdou, M., Velliou, E., & Taoukis, P. (2008). Modelling the effect of temperature and CO₂ on microbial spoilage of chilled gilthead seabream fillets. *Acta Horticulturae*, 802, 345–350.
- Tsironi, Theofania, Ntzimani, A., Gogou, E., Tsevdou, M., Semenoglou, I., Dermesonlouoglou, E., & Taoukis, P. (2019). Modeling the effect of active modified atmosphere packaging on the microbial stability and shelf life of gutted sea bass. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(23), 1–17.
- Turner, M. E., Bradley, E. L., Kirk, K. A. & Pruitt, K. M. (1976). A theory of growth. *Mathematical Biosciences*, 29, 367–373.
- Vajdi, M., Varidi, M. J., Varidi, M., & Mohebbi, M. (2019). Using electronic nose to recognize fish spoilage with an optimum classifier. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1205–1217.
- Varlet, V., & Fernandez, X. (2010). Review. sulfur-containing volatile compounds in

- seafood: Occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Food Science and Technology International*, 16(6), 463–503.
- Von Bargaen, C., Brockmeyer, J., & Humpf, H. U. (2014). Meat authentication: A new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9428–9435.
- Werlang, P., Fagundes, M. Q., Adamatti, D. F., Machado, K. S., Von Groll, A., Da Silva, P. E. A., & Werhli, A. V. (2014). Multi-agent-based simulation of mycobacterium tuberculosis growth. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 8235 LNAI(May), 131–142.
- Whiting, R. C., & Buchanan, R. L. (1992). Use of predictive modeling in a HACCP program. In Amgar, A. (Ed). *Proceedings of the 2nd ASPET International Conference Predictive Microbiology and HACCP. ASEPT (Laval, France)*, 125–141.
- Who, F. A. O. (2010). *FAO Fisheries and Aquaculture Report No . 978 Report of the JOINT FAO / WHO EXPERT CONSULTATION ON THE RISKS AND BENEFITS OF FISH CONSUMPTION* (Vol. 978).
- Wilson, A. D., & Baietto, M. (2009). Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors*, 9(7), 5099–5148. <https://doi.org/10.3390/s90705099>
- Wojnowski, W., Majchrzak, T., Dymerski, T., Gębicki, J., & Namieśnik, J. (2017). Electronic noses: Powerful tools in meat quality assessment. *Meat Science*, 131, 119–131.
- Wolf, C., Burgener, M., Hübner, P., & Lüthy, J. (2000). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: Differentiation of fish species. *LWT - Food Science and Technology*, 33(2), 144–150.
- Wu, T., Zhong, N., & Yang, L. (2018). Identification of Adulterated and Non-adulterated Norwegian Salmon Using FTIR and an Improved PLS-DA Method. *Food Analytical Methods*, 11(5), 1501–1509.
- Xiong, Y., Xiao, X., Yang, X., Yan, D., Zhang, C., Zou, H., ... Yan, Y. (2014). Quality control of *Lonicera japonica* stored for different months by electronic nose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91(December), 68–72.
- Xu, G., Liao, C., Ren, X., Zhang, X., Zhang, X., Liu, S., ... Wang, X. (2014). Rapid assessment of quality of deer antler slices by using an electronic nose coupled with chemometric analysis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(6), 716–721.
- Zhang, M., Zhan, Z. G., Wang, S. J., & Tang, J. M. (2008). Extending the shelf-life of asparagus spears with a compressed mix of argon and xenon gases. *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 686–691.