



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών
Διαδικασιών

Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη ενεργής και έξυπνης συσκευασίας
φρέσκων προϊόντων λαβρακιού για τον έλεγχο
της ψυκτικής αλυσίδας**

Γκικοπούλη Χριστίνα



Επιβλέπων καθηγητής: Ταούκης Πέτρος

ΑΘΗΝΑ, 2022

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Πέτρου Ταούκη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την καθοδήγηση του στη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επίσης, ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Κατσούλη Μαρία και την υποψήφια διδάκτορα Σεμένογλου Ιωάννα για τη βοήθεια και την καθοδήγηση τους αλλά και την υπομονή και το χρόνο που μου αφιέρωσαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω και την επίκουρη καθηγήτρια Γώγου Ελένη για τη συνεργασία που είχαμε, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία και το ιδιαίτερα φιλικό και ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε.

Ακόμη, ένα ευχαριστώ στις εταιρείες Avramar A.E και SELECTFISH A.E για την εξασφάλιση της προμήθειας και της συσκευασίας της πρώτης ύλης προκειμένου να διεξαχθεί η μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους και συμφοιτητές μου για την υπομονή και την στήριξη σε αυτό το αξέχαστο ταξίδι.

Περίληψη

Τα ιχθυηρά και τα προϊόντα τους αποτελούν εξαιρετικά ευαλλοίωτα προϊόντα, τα οποία υποβαθμίζονται ποιοτικά, κυρίως μέσω της ανάπτυξης μικροοργανισμών. Το γεγονός αυτό, έχει οδηγήσει στη μελέτη και στην ανάπτυξη συστημάτων τα οποία μπορούν να παρατείνουν την διατηρησιμότητα των προϊόντων αυτών, όπως είναι καινοτόμες εφαρμογές όσον αφορά τη συσκευασία. Στις εφαρμογές αυτές εντάσσεται η ενεργή (active) και η έξυπνη (smart) συσκευασία. Για την παράταση του χρόνου ζωής των ιχθυηρών, λοιπόν, από τις πλέον μελετώμενες και δοκιμασμένες είναι η συσκευασία με τη χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας, δηλαδή ένα μείγμα αερίων, συννηθέστερα οξυγόνου (O_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και αζώτου (N_2), που αντικαθιστά τον αέρα στη συσκευασία των τροφίμων. Η ενεργή συσκευασία αποτελεί ένα, ακόμη, σύστημα που έχει μελετηθεί, στην οποία το τρόφιμο και το περιβάλλον της συσκευασίας αλληλοεπιδρούν οδηγώντας έτσι σε ακόμα μεγαλύτερη παράταση της διάρκειας ζωής του τροφίμου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας ενεργής συσκευασίας είναι η προσθήκη εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα στο εσωτερικό της συσκευασίας, τα συστατικά των οποίων αντιδρούν με την υγρασία του συσκευασμένου τροφίμου εκλύοντας διοξείδιο του άνθρακα.

Η διατήρηση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων, και ιδιαίτερα των ιχθυηρών, εξαρτάται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Αποτελεί, επομένως, επιτακτική ανάγκη η ορθή διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας, από την παραγωγή έως και την κατανάλωση. Οι αποκλίσεις που παρατηρούνται στις προτεινόμενες θερμοκρασίες αποθήκευσης, οδηγούν στην ταχύτερη ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων, και πιθανώς στην έκθεση του καταναλωτή σε κίνδυνο. Η έξυπνη συσκευασία αποτελεί την καινοτόμα τεχνολογία που μελετάται για τον έλεγχο της ψυκτικής αλυσίδας. Οι χρονοθερμοκρασιακοί ολοκληρωτές ή δείκτες ΤΤΙ, αποτελούν το πλέον μελετώμενο και εφαρμοζόμενο παράδειγμα έξυπνης συσκευασίας, είναι διατάξεις χαμηλού κόστους που τοποθετούνται στη συσκευασία των προϊόντων και οι οποίοι με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή (ορατή αλλαγή που είναι συνήθως χρωματική), εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία και το χρόνο, μπορούν να προσδιορίζουν πληροφορίες για το χρονοθερμοκρασιακό προφίλ του προϊόντος. Οι δείκτες ΤΤΙ μπορούν να λειτουργήσουν επικουρικά με την ημερομηνία λήξης, και να προσφέρουν πληροφορίες για την πιθανή κακομεταχείριση των προϊόντων.

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της κινητικής αλλοίωσης φιλέτων και απεντερωμένου ολόκληρου λαβρακιού ιχθυοκαλλιέργειας συσκευασμένων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και η επίδραση της ενεργής συσκευασίας με τη χρήση διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων εκπομπών CO_2 (CO_2 emitters, αναφερόμενοι στην παρούσα εργασία ως PADs) στην επιβράδυνση της ποιοτικής υποβάθμιση και στην παράταση ζωής του ιχθυηρού. Ο δεύτερος στόχος, της

παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορά την κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών κατάλληλου συνδυασμού ενζύμου-υποστρώματος, ώστε οι χρόνοι απόκρισης και η θερμοκρασιακή εξάρτηση να αντιστοιχεί στην κινητική αλλοίωσης του μελετώμενου προϊόντος. Επομένως, από την κινητική μελέτη της ποιοτικής υποβάθμισης του ιχθυηρού και την κινητική της απόκρισης των ολοκληρωτών ΤΤΙ μπορεί να επιλεγθεί ο κατάλληλος δείκτης για κάθε επιλεγμένο μελετώμενο προϊόν, με απώτερο στόχο την παρακολούθηση της ασφάλειας του λαβρακιού στην ψυκτική αλυσίδα. Σε αυτό το πλαίσιο, στο τελευταίο μέρος της παρούσας διπλωματικής η επιλογή των βέλτιστων ΤΤΙ επαληθεύτηκε σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακά συνθήκες αποθήκευσης.

Σε πρώτο στάδιο έγινε η μελέτη της ποιοτικής υποβάθμισης φιλέτων και ολόκληρου απεντερωμένου λαβρακιού, που περιλάμβανε τον προσδιορισμό της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών και τη μελέτη διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, συγκεκριμένα στους 0, 2.5, 5 και 10°C, και συσκευάστηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (για το ολόκληρο λαβράκι 20% O₂-20% CO₂-60% N₂, για το φιλέτο 60% CO₂-40% αέρα) χωρίς και με τη χρήση εκπομπών CO₂, διαφορετικών διαστάσεων με κωδικοποίηση PAD1, PAD2 (για το ολόκληρο) και PAD3 (για το φιλέτο), και στην περίπτωση του ολόκληρου απεντερωμένου λαβρακιού δείγματα αποθηκεύτηκαν επίσης και σε αερόβιες συνθήκες συσκευασίας. Όσον αφορά τη μικροβιακή ανάλυση, αναπτύχθηκαν τα μαθηματικά μοντέλα περιγραφής της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, ολικής μικροβιακής χλωρίδας, ψευδομονάδων, εντεροβακτηρίων και βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο, με την ανάπτυξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας να αποτελεί και τον βασικό παράγοντα στον υπολογισμό της διατηρησιμότητας των ιχθυηρών. Από το μοντέλο Baranyi έγινε ο υπολογισμός των ρυθμών αύξησης των μικροοργανισμών, συγκεκριμένα για το ολόκληρο λαβράκι η ταχύτερη ανάπτυξη εμφανίζεται στα αερόβια αποθηκευμένα δείγματα, ενώ είναι φανερή η θετική επίδραση των εκπομπών CO₂, κυρίως στην ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας, μέσω της οποίας καθορίζεται ο χρόνος διατηρησιμότητας του λαβρακιού, και των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο, η ανάπτυξη των οποίων επιδρά σημαντικά στην οργανοληπτική υποβάθμιση του προϊόντος. Για τα δείγματα φιλέτου, παρατηρήθηκαν αντίστοιχα αποτελέσματα, με τη θετική επίδραση του PAD να είναι εμφανής στους 5°C σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα δείγματα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Για κάθε συνθήκη αποθήκευσης υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης E_α για την εξάρτηση των ρυθμών μικροβιακής ανάπτυξης από τη θερμοκρασία για το ολόκληρο απεντερωμένο λαβράκι από το μοντέλο Arrhenius και τα αποτελέσματα για τη μικροβιακή χλωρίδα ήταν 83.1, 63.5, 84.4 και 94.0 kJ/mol για αερόβια συσκευασία, για τα δείγματα συσκευασμένα σε MAP, και για τα δείγματα με χρήση PAD1 και PAD2 αντίστοιχα. Ενώ αντίστοιχα υπολογίστηκε η E_α 131,9 kJ/mol για το φιλέτο λαβρακιού με χρήση PAD3.

Τα αποτελέσματα της διατηρησιμότητας έδειξαν παράταση του χρόνου ζωής σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, και ακόμα μεγαλύτερη παράταση σε συνθήκες ενεργής συσκευασίας, τόσο για το φιλέτο όσο και για το ολόκληρο. Οι χρόνοι ζωής, για το ολόκληρο λαβράκι βρέθηκαν ίσοι με 9, 6, 4 και 2 μέρες για τα συσκευασμένα αερόβια δείγματα, για τα συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 14, 8, 7 και 3 ημέρες, για τα συσκευασμένα με τη χρήση του PAD1 18, 10, 7 και 3 ημέρες, και για τα συσκευασμένα με χρήση PAD2 18, 10, 8 και 3 ημέρες, σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5 και 10°C, αντίστοιχα. Για το φιλέτο, η διατηρησιμότητα ήταν 22, 13, 6 και 4 ημέρες στα συσκευασμένα με χρήση PAD3 δείγματα σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5 και 10°C, αντίστοιχα, και 5 ημέρες για τα δείγματα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 5°C.

Οι υπόλοιποι δείκτες ποιότητας που μελετήθηκαν για το λαβράκι, ήταν η αέρια σύσταση, το pH, το χρώμα, η υφή και η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Τα αποτελέσματα για τη μεταβολή της σύστασης του οξυγόνου έδειξαν μείωση καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης, η οποία παρατηρήθηκε λιγότερο έντονη στα δείγματα υπό τροποποιημένες συνθήκες συγκριτικά με τα αερόβια. Η σύσταση του CO₂ αρχικά παρουσιάζει μείωση, και στη συνέχεια αυξάνεται, με την εμφάνιση του ελαχίστου σημείου να διακρίνεται πιο γρήγορα στα δείγματα υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα έναντι των δειγμάτων με τη χρήση εκπομπών CO₂. Επιπλέον, για το ολόκληρο λαβράκι η συγκέντρωση CO₂ των δειγμάτων με τη χρήση PAD έφτασε σε τιμές 35-40%, ενώ στις συσκευασίες σε συνθήκες MAP δεν ξεπέρασε το 25%. Οι αντίστοιχες μέγιστες τιμές CO₂ για την περίπτωση του φιλέτου ήταν 40% για τις συνθήκες MAP ενώ έφτασε έως και 70% με τη χρήση του PAD. Η μεταβολή του pH παρουσίασε αρχικά μείωση ακολουθούμενη από αύξηση, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην παραγωγή γαλακτικού οξέος και στις μεταβολικές δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα στο μυϊκό ιστό των ιχθύων, αντίστοιχα. Όσον αφορά, την ανάλυση υφής και χρώματος, παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις σε όλες τις συνθήκες, με την σκληρότητα της υφής να παρουσιάζει μια αυξητική τάση. Καταληκτικά, για την οξείδωση των λιπαρών οξέων δεν εξήχθη κάποια τάση με το χρόνο αποθήκευσης, αξίζει όμως να σημειωθεί πως κανένα δείγμα δεν ξεπέρασε το όριο αποδοχής προς κατανάλωση, δηλαδή την τιμή 7 mg MDA/kg.

Στο δεύτερο σκέλος του πειραματικού μέρους έγινε κινητική μελέτη ενζυμικών δεικτών TTI, που έχουν ως αρχή λειτουργίας την αντίδραση του ενζύμου λιπάσης από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα, με συγκέντρωση ενζύμου 15u και 20u σε θερμοκρασίες 2.5, 5 και 10°C και 25u, 50u, 75u και 100u, σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5 και 10°C. Τα πειραματικά σημεία προσαρμόστηκαν σε κατάλληλα σιγμοειδή μοντέλα για κάθε ενεργότητα και κάθε θερμοκρασία και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές, οι οποίες προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Arrhenius.

Αναπτύχθηκε επίσης ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο συσχέτισης της απόκρισης των δεικτών με τη συγκέντρωση του περιεχόμενου ενζύμου, το χρόνο αποθήκευσης και τη θερμοκρασία για τον ενζυμικό δείκτη τύπου M και η ενέργεια ενεργοποίησης που υπολογίστηκε είχε τιμή 96,99 kJ/ mol. Οι χρόνοι απόκρισης που υπολογίστηκαν μέσω του μοντέλου αυτού, για ενδεικτική θερμοκρασία 5 °C, έχουν τιμές 10.4, 7.9, 6.4, 3.4, 2.3 και 1.8 για συγκέντρωση ενζύμου 15u, 20u, 25u, 50u, 75u, 100u, αντίστοιχα. Για την αξιολόγηση του μοντέλου έγινε συσχέτιση των πειραματικών χρόνων ζωής με τους χρόνους ζωής που προκύπτουν από το μοντέλο, το οποίο θεωρείται αξιόπιστο με συντελεστή προσαρμογής R^2 ίσο με 0,96.

Στο τελευταίο μέρος της εργασίας, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση για την επιλογή του κατάλληλου δείκτη TPI προσαρμοσμένου στη συσκευασία του λαβρακιού (ολόκληρο και φιλέτο) για την παρακολούθηση της ασφάλειας του. Η επαλήθευση της επιλογής του κατάλληλου δείκτη επιβεβαιώθηκε και με πείραμα σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακά συνθήκες οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις στις οποίες μπορεί να εκτεθεί το τρόφιμο στην ψυκτική αλυσίδα, που αντιστοιχεί σε ισοθερμοκρασιακή συντήρηση σε ενεργή θερμοκρασία $T_{eff}=4,8$. Για τη συσχέτιση του δείκτη με το τρόφιμο, πρέπει να έχει τις κατάλληλες τιμές χρόνου απόκρισης και θερμοκρασιακής εξάρτησης (διαφορά ενέργειας ενεργοποίησης <40 kJ/mol). Από τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα, ως καταλληλότερος δείκτης επιλέχθηκε το M-25u διότι στις υψηλότερες θερμοκρασίες εμφάνισε ελαφρά μικρότερο χρόνο απόκρισης (ζωής), επομένως θα λειτουργεί προστατευτικά σε περίπτωση έκθεσης του προϊόντος σε ακατάλληλες συνθήκες, ενώ στις ενδεικνυόμενες θερμοκρασίες για το προϊόν ο χρόνος ζωής θα καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης. Συγκεκριμένα, ο χρόνος απόκρισης του δείκτη υπολογίστηκε σε 13.8, 9.3, 6.4 και 3.0 ημέρες για θερμοκρασίες 0, 2.5, 5 και 10°C αντίστοιχα, οι οποίοι εμφανίζονται παραπλήσιοι με τους χρόνους ζωής που αναφέρθηκαν για τα δείγματα λαβρακιού σε τροποποιημένες συνθήκες. Για το πείραμα επαλήθευσης, οι χρόνοι ζωής των δειγμάτων λαβρακιού μετρήθηκαν σε 7, 8, 9 και 9 ημέρες για τα δείγματα ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες MAP, MAP-PAD1, MAP-PAD2 και φιλέτου για συνθήκη MAP-PAD3 αντίστοιχα. Η συμπεριφορά τόσο των δειγμάτων λαβρακιού όσο και του επιλεγμένου δείκτη στις μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακά συνθήκες επιβεβαίωσε την επιλογή καθώς παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά, ιδιαίτερα όταν το ιχθυηρό φτάνει στο όριο αποδεκτότητας.

Implementation of smart packaging and new control tools in fish cold chain management

Fish and fish products are highly perishable products, and deteriorate rapidly due to a combination of microbial breakdown mechanisms, autolytic biochemical reactions and chemical oxidation of lipids. The limited and variable shelf life of chilled fish, creates a major problem to quality assurance and commercial viability, thus, the application of new preservation methods which can permit the extension of shelf-life is needed. Modified Atmosphere Packaging (MAP) which refers to replacement of air in the food package and alteration in the package headspace, can extend the shelf life of refrigerated fish. The most commonly used gases in MAP are oxygen (O₂), carbon dioxide (CO₂) and nitrogen (N₂) and their mixtures. Complementary to MAP is also suggested the use of carbon dioxide emitters inside the packaging, thus creating an active packaging, in which the food and the packaging environment interact, leading to an even longer shelf life extension of the food.

The maintenance of food safety and quality, particularly of fish, depends greatly on temperature storage despite the packaging method. It has been reported that in a substantial percentage of chilled foods, there are significant temperature deviations from the recommended temperature range during their distribution. The deviations in the proposed storage temperatures lead to faster quality degradation of food, and possibly exposing consumers to risk. Therefore, it is imperative the effective monitoring and control of storage conditions and especially of temperature throughout the cold chain of fresh fish products, from production to consumption. Time Temperature Integrators or Indicators (TTI), are low-cost smart labels placed in the product packaging and can show an easily measurable and time-temperature dependent change (usually visually color change), which is related with time-temperature profile of the product in which they are attached. TTI can be used ancillary to the expiration date and more precisely if the product is exposed at abused temperatures, the TTI will signal poor quality, otherwise the end of shelf life will be determined by the expiration date.

The aim of this diploma thesis is the evaluation and mathematical modeling of the effect of active modified atmosphere packaging by the incorporation of commercially available CO₂ emitters (PAD) into the package on the microbial stability and shelf life extension of gutted sea bass and sea bass fillets during refrigerated storage. Moreover, the response of TTIs was kinetically modelled as a function of enzyme concentration and storage temperature in order to define the appropriate TTI that can monitor the quality of fish under any selected storage conditions in the range studied. The applicability of the selected TTIs in the real cold chain and the predictive models of quality deterioration based on microbial growth were also validated by a simulation experiment in variable temperature storage conditions.

The first step was the study of the quality deterioration of fillets and gutted sea bass, which included the determination of the growth of spoilage microorganisms and the study of various physico-chemical parameters. The samples were stored under controlled isothermal conditions (0, 2.5, 5 and 10 °C) and packed in modified atmosphere conditions (gutted seabass 20% O₂-20% CO₂-60% N₂, fillet 60% CO₂-40% air) with and without the use of commercially available CO₂ emitters. Two different PADs were tested for gutted sea bass coded as PAD1 and PAD2, while the CO₂ emitter used in fillets, was coded as PAD3. In case of the gutted sea bass, the samples were also stored under aerobic packaging conditions. With regards to microbial analysis, total viable count (TVC), *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* spp. and H₂S-producing bacteria have been studied and mathematically modelled with Baranyi's model. The shelf-life of chilled gutted sea bass and fillets was based on TVC and the limit of acceptability was equal to 7 log(CFU)/g for gutted and sea bass fillets. In case of gutted sea bass, the growth rates of each microorganism in aerobically stored samples were significantly higher compared to all the other samples. In addition, the positive effect of CO₂ emitters was evident, especially in TVC, which is the main spoilage microorganism, and the H₂S-producing bacteria, which have significant impact on the sensory degradation of the product. In terms of fillet samples, similar results were observed. The positive effect of active packaging was tested and was evident in 5°C compared to stored sample in MAP. For each storage condition and microorganism, the activation energy was calculated through the Arrhenius equation and the results for the TVC were equal to 83.1, 63.5, 84.4 and 94.0 kJ/mol for aerobically packaged samples, for MAP samples, and for samples using PAD1 and PAD2, respectively. The E_A value was equal to 131.9 kJ/mol for sea bass fillet using PAD3.

The shelf-life study results showed an extended shelf life in modified atmosphere conditions, and an even longer extension in active packaging for both fillet and gutted sea bass. The shelf life for gutted sea bass was equal to 9, 6, 4 and 2 days for aerobically packed samples, for MAP samples 14, 8, 7 and 3 days, for PAD1 18, 10, 7 and 3 days and for PAD2 18, 10, 8 and 3 days, at 0, 2.5, 5 and 10 °C, respectively. In case of sea bass fillet, the shelf-life estimated 22, 13, 6 and 4 days in the samples packed using PAD3 at 0, 2.5, 5 and 10 °C, respectively, and 5 days for the MAP samples at 5 °C.

Moreover, the effect of packaging system on the gas concentration in the headspace of the package and on quality parameters such as pH, color, texture and oxidation of fatty acids was examined. The results showed that the oxygen concentration decreased during storage period and exhibited zero levels due to the increased microbial growth. The decrease was less pronounced in samples under MAP and MAP-PAD conditions than aerobic conditions. The composition of carbon dioxide initially decreased due to CO₂ dissolution in fish flesh and then increased due to the metabolic

activity of spoilage microorganisms. The minimum carbon dioxide concentration was observed sooner in the samples under modified atmosphere than samples using CO₂ emitters. In addition, the CO₂ concentration of gutted sea bass samples using PAD reached a value of 35-40%, while in samples in MAP the CO₂ concentration did not exceed 25%. The maximum CO₂ values for the fillet were 40% for MAP conditions and reached up to 70% with the use of PAD. The changes in pH initially showed a decrease followed by an increase which can be attributed to the production of lactic acid and metabolic activities occurring in the muscle tissue of fish, respectively. Regarding texture and color analysis, it was not observed a specific trend in all tested conditions. However, the hardness of fish tissue was increased during storage. Finally, similar results for the oxidation of fatty acids were observed as the results were not conclusive, but it is worth noting that no sample exceeded the limit of acceptance for consumption, i.e. 7 mg MDA/kg.

In the second part of this study, a kinetic study was performed for M-type enzymatic TTI. The response (colour change) of TTI is the result of a controlled hydrolysis using a *Rhizopus oryzae* lipase and methyl myristate as substrate. The effect of the enzyme concentration and temperature was studied and more precisely of M-15u and M-20u were tested at 2.5, 5 and 10°C and M-25u, M-50u, M-75u and M-100u at 0, 2.5, 5 and 10 °C. The experimental results were fitted to appropriate sigmoidal model and the kinetic rates were calculated for each activity and temperature. Then, the rates were fitted to the Arrhenius equation and the activation energy (E_a) was calculated.

An overall mathematical model was also developed for M-type TTI correlating the response of the indicators with the enzyme concentration, storage time and temperature and the activation energy was calculated equal to 96.99 kJ/mol. The reliability of the model was confirmed by comparing the experimental shelf-life values with the ones derived from the model.

In the last part of the work, an independent validation experiment was carried out in order to confirm the kinetic models for microbial growth rates and the reliability of the selected TTIs for chilled and packed sea bass. Gutted and sea bass fillets were stored at controlled variable temperature conditions (from 2.5 to 10°C) which represent the temperature variations in which the food can be exposed during the distribution in the cold chain and the effective temperature was $T_{eff}=4.8^\circ\text{C}$. Prerequisites for the correlation of the studied food and TTI indicator is that their activation energies and response times to be similar. Using the developed mathematical models, M25u was chosen as the most suitable indicator because at higher temperature it had a slightly shorter response times compared to sea bass products, so it will work protective in case of exposure at unsuitable conditions, while at lower temperatures the shelf life will be determined from the expiration date. In particular, the shelf life of M25u calculated through the mathematical model was 13.8,

9.3, 6.4 and 3.0 days at 0, 2.5, 5 and 10 °C respectively, which were close to these reported for sea bass under MAP and PAD conditions. For the verification experiment, the shelf life of the sea bass samples was found 7, 8, 9 and 9 days for the whole sea bass samples under conditions of MAP, MAP-PAD1 and MAP-PAD2 and fillet MAP-PAD3 conditions respectively. Finally, M25u enzymatic TTI was selected and validated for monitoring quality deterioration of different sea bass products during refrigerated storage.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	2
Περίληψη	3
English extended summary	7
Κεφάλαιο 1	1
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΙΧΘΥΗΡΩΝ	1
1.1 Γενικά	1
1.2 Ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο	1
1.3 Ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα	3
Κεφάλαιο 2	7
ΙΧΘΥΕΣ- ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ, ΣΥΣΤΑΣΗ, ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	7
2.1 Εισαγωγή	7
2.2 Σύσταση και βιολογική αξία ιχθύων	7
2.2.1 Υγρασία	7
2.2.2 Πρωτεΐνες	8
2.2.3 Άλλες αζωτούχες ενώσεις	9
2.2.4 Λίπη, λιπαρά οξέα	10
2.2.5 Υδατάνθρακες	10
2.2.6 Βιταμίνες	10
2.2.7 Ανόργανα συστατικά	11
2.3 Μεταθανάτιες αλλοιώσεις	11
2.4 Αλλοιώσεις ιχθυηρού	13
2.4.1 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθυηρών	13
2.4.2 Οξειδωση των λιπαρών οξέων	16
2.4.3 Μεταβολή των φυσικών χαρακτηριστικών	16
2.4.4 Μεταβολή οργανοληπτικών χαρακτηριστικών	16
2.5 Λαβράκι	17
2.4.1 Μορφολογία λαβρακιού	17
2.4.2 Βιολογική αξία λαβρακιού	18
Κεφάλαιο 3	20
ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΙΧΘΥΗΡΩΝ- ΕΝΕΡΓΗ ΚΑΙ ΕΞΥΠΝΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	20

3.1 Εισαγωγή	20
3.2 Ενεργή συσκευασία	20
3.3 Έξυπνη συσκευασία-Χρονοθερμοκρασιακοί ολοκληρωτές ΤΤΙ	25
3.3.1 Ορισμός χρονοθερμοκρασιακών δεικτών	25
3.3.2 Αρχή λειτουργίας ΤΤΙ	25
3.3.3 Κατηγοριοποίηση των ΤΤΙ	26
3.3.4 Σύγχρονα συστήματα ΤΤΙ	27
3.3.4.1 Δείκτες διάχυσης	27
3.3.4.2 Χημικοί δείκτες	27
3.3.4.2 Φωτοχημικοί δείκτες	27
3.3.4.3 Πολυμερικοί δείκτες	28
3.3.4.4 Μικροβιολογικοί δείκτες	28
3.3.4.5 Ενζυμικοί δείκτες	28
3.3.5 Αντιστοίχιση απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών με την ποιότητα των τροφίμων	30
3.3.6 Πλεονεκτήματα και προβλήματα στη χρήση δεικτών ΤΤΙ	31
Κεφάλαιο 4	32
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
4.1 Εισαγωγή	32
4.2 Πειραματικός Σχεδιασμός	33
4.3 Πειραματική Διαδικασία	34
4.3.1 Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΤΙs	34
4.3.2 Παραλαβή και αποθήκευση δειγμάτων ιχθυηρού	36
4.4 Αναλυτικές μέθοδοι	39
4.4.1 Μικροβιακή ανάλυση	39
4.4.1.1 Αποστείρωση εξοπλισμού και υλικών	39
4.4.1.2 Δειγματοληψία	40
4.4.1.3 Προετοιμασία διαδοχικών αραιώσεων	40
4.4.1.4 Επίστρωση και ενσωμάτωση δειγμάτων στα υποστρώματα	41
4.4.1.5 Επώαση και καταμέτρηση των αποικιών	42
4.4.2 Μέτρηση αέριας σύστασης	42
4.4.3 Μέτρηση pH	43

4.4.4 Μέτρηση υφής	43
4.4.5 Μέτρηση χρώματος	44
4.4.6 Προσδιορισμός οξειδωσης λιπαρών οξέων (TBARS)	45
4.5 Επεξεργασία αποτελεσμάτων	47
4.5.1 Κινητική απόκρισης χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI	47
4.5.2 Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης λαβρακιού	48
Κεφάλαιο 5	51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	51
5.1 Εισαγωγή	51
5.2 Μελέτη διατηρησιμότητας και ποιότητας ολόκληρου λαβρακιού	52
5.2.1 Μελέτη μικροβιακής αλλοίωσης ολόκληρου απεντερωμένου λαβρακιού	52
5.2.1.1 Ανάπτυξη Ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC)	53
5.2.1.2 Ανάπτυξη των ψευδομονάδων (<i>Pseudomonas</i> spp.)	56
5.2.1.3 Ανάπτυξη εντεροβακτηρίων (<i>Enterobacteriaceae</i> spp.)	59
5.2.1.4 Ανάπτυξη βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο H ₂ S (<i>Shewanella</i>)	62
5.2.2 Εφαρμογή μοντέλου Baranyi στα πειραματικά δεδομένα	64
5.2.3 Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης	67
5.2.4 Προσδιορισμός χρόνου ζωής	68
5.2.5 Μέτρηση της μεταβολής αέριας σύστασης	70
5.2.6 Μέτρηση μεταβολής της πρόσληψης υγρασίας από τα PAD	74
5.2.7 Μέτρηση μεταβολής του pH	76
5.2.8 Ανάλυση μεταβολής υφής	79
5.2.9 Ανάλυση μεταβολής χρώματος	81
5.2.10 Μελέτη μεταβολής των λιπαρών οξέων	82
5.3 Μελέτη διατηρησιμότητας και ποιότητας φιλέτου λαβρακιού	85
5.3.1 Μελέτη μικροβιακής ανάλυσης	85
5.3.1.1 Ανάπτυξη Ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC)	85
5.3.1.2 Ανάπτυξη των ψευδομονάδων (<i>Pseudomonas</i> spp.)	87
5.3.1.3 Ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων (<i>Enterobacteriaceae</i> spp.)	89
5.3.1.4 Ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο H ₂ S (<i>Shewanella</i>)	91
5.3.2 Εφαρμογή μοντέλου Baranyi στα πειραματικά δεδομένα	92
5.3.3 Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης	94
5.3.4 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής	96

5.3.5 Μέτρηση μεταβολής αέριας σύστασης	97
5.3.6 Μέτρηση μεταβολής της πρόσληψης υγρασίας από τα PADs	99
5.3.7 Μέτρηση μεταβολής του pH	100
5.3.8 Ανάλυση μεταβολής υφής	101
5.3.9 Ανάλυση μεταβολής χρώματος	102
5.3.10 Μελέτη μεταβολής των λιπαρών οξέων	104
5.4 Μελέτη απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI	105
5.4.1 Κινητική μελέτη της απόκρισης των TTI	105
5.4.1.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 15u	105
5.4.1.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 20u	108
5.4.1.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 25u	110
5.4.1.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 50u	112
5.4.1.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 75u	114
5.4.1.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 100u	116
5.4.2 Διάρκεια ζωής των ενζυμικών δεικτών	118
5.5 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών δεικτών	119
5.6 Διερεύνηση για την επιλογή κατάλληλου TTI για τα δείγματα ολόκληρου και φιλέτου λαβρακιού	120
5.7 Έλεγχος αξιοπιστίας ενζυμικών TTI και λαβρακιού με την έκθεση σε εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ	125
5.7.1 Μικροβιακή ανάλυση	126
5.7.1.1 Ολική μικροβιακή χλωρίδα	126
5.7.1.2 Ψευδομονάδες (<i>Pseudomonas</i> spp.)	127
5.7.1.3 Εντεροβακτήρια (<i>Enterobacteriaceae</i> spp.)	128
5.7.1.4 Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (<i>Shewanella</i>)	129
5.7.2 Σύγκριση πειραματικών και υπολογισμένων με βάση το μοντέλο ρυθμών	130
5.7.3 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής	131
5.7.4 Σύγκριση αλλοίωσης λαβρακιού και απόκρισης των δεικτών TTI σε μεταβαλλόμενες συνθήκες	131
Κεφάλαιο 6	134
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	134
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	140
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	144

Κεφάλαιο 1

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΙΧΘΥΗΡΩΝ

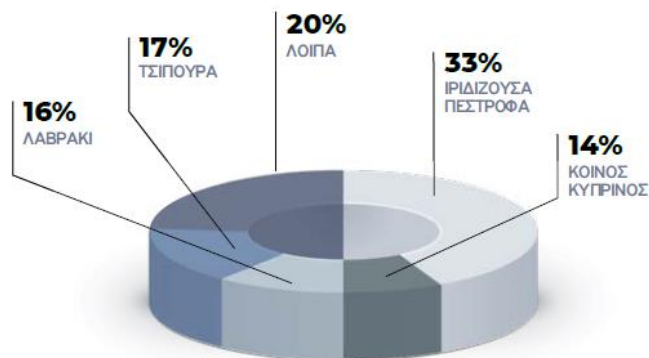
1.1 Γενικά

Η ανθρώπινη διατροφή τις τελευταίες δεκαετίες έχει στραφεί έντονα στην κατανάλωση ιχθυηρών και διαφόρων προϊόντων τους, με την κατανάλωση τους τα τελευταία 20 χρόνια να έχει υπερδιπλασιαστεί. Με τον όρο ιχθυηρά, περιγράφονται οι ιχθύες, τα οστρακόδερμα και όλοι οι προς κατανάλωση ζωντανοί υδρόβιοι οργανισμοί (Tsironi, 2010). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο, οι οποίες μέχρι και σήμερα αποτελούν την ταχύτερα εξελισσόμενη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων, παγκοσμίως. Οι ιχθυοκαλλιέργειες, εκτρέφουν καθημερινώς ιχθυηρά, λειτουργώντας σε ένα ελεγχόμενο, κατά το δυνατόν, περιβάλλον, προκειμένου να καλύψουν τις καθημερινές ανάγκες της ζήτησης των καταναλωτών (ΕΛΟΠΥ, 2021).

1.2 Ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο

Η υδατοκαλλιέργεια αφορά την εκτροφή ή καλλιέργεια υδρόβιων ζώων και φυτών. Αποτελεί μια συνεχή και ταχύτατα εξελισσόμενη βιομηχανία με εντυπωσιακά υψηλό ρυθμό αύξησης τις τελευταίες δεκαετίες. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization- FAO), η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιεργειών είχε ετήσια αύξηση, για το διάστημα 1980-2000, που ανέρχεται στο 9,8%, η οποία εν συνεχεία για το διάστημα 2000-2016 κυμάνθηκε στο 5,8% (Gutierrez *et al.*, 2020).

Ο αναπτυσσόμενος αυτός τομέας, συνεχίζει μέχρι και σήμερα να κυριαρχεί στην παραγωγή υδρόβιων τροφίμων παγκοσμίως. Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του FAO, ο συνολικός όγκος παραγωγής υδατοκαλλιεργειών στην Ευρωπαϊκή Ένωση ήταν 1.141.290 τόνοι, εκ των οποίων το 47% αποτελεί η παραγωγή ψαριών, το 52,9% η παραγωγή μαλακίων και το υπόλοιπο ποσοστό αφορά λοιπά είδη υδατοκαλλιεργειών, όπως τα υδρόβια φυτά. Η παραγωγή ψαριών υδατοκαλλιεργειών για το 2019 στην Ευρώπη ανήλθε σε 535.788 τόνους, με κυριότερα είδη την ιριδίζουσα πέστροφα, όπου αντιπροσωπεύει το 33% του όγκου, την τσιπούρα και το λαβράκι, όπως φαίνονται και στην Εικόνα 1 (ΕΛΟΠΥ, 2021).



Εικόνα 1: Ποσοστιαία παραγωγή ειδών ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας ως προς το συνολικό όγκο στην ΕΕ για το έτος 2019 (ΕΛΟΠΥ, 2021).

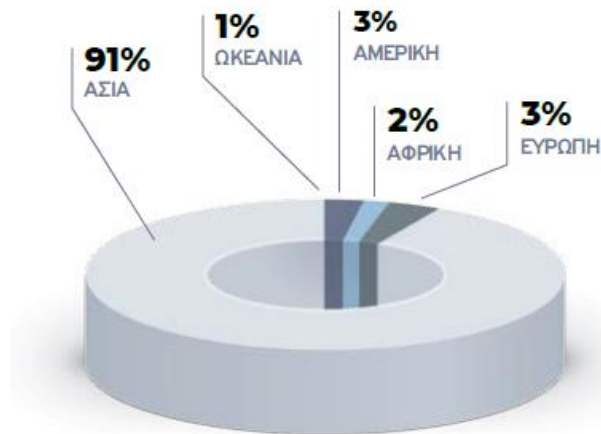
Ένα μέρος των υδατοκαλλιεργειών αφορά την παραγωγή ιχθύων για ανθρώπινη κατανάλωση ή για άλλες εφαρμογές μέσω των ιχθυοκαλλιεργειών, οι οποίες ελέγχουν όλες ή μέρος των φάσεων ανάπτυξης των ιχθύων. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή ιχθυηρών μέσω ιχθυοκαλλιεργειών υπερβαίνει κατά μεγάλο ποσοστό, πλέον, την παραγωγή μέσω αλιευτικών δραστηριοτήτων. Συγκεκριμένα, για το 2019 η παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανήλθε σε 155,77 εκατομμύρια τόνους, σημειώνοντας 3% αύξηση από το 2018, ενώ η αλιεία, σημειώνοντας μείωση -4,1%, ανήλθε σε 93,59 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2019). Η Κίνα κατέχει με διαφορά την πρώτη θέση στην παραγωγή και εξαγωγή ψαριών και αλιευτικών προϊόντων (ΕΛΟΠΥ, 2021).

Για το έτος 2019, σύμφωνα με τον FAO, η παραγωγή ανήλθε συνολικά σε 120,1 εκατομμύρια τόνους προϊόντων. Για το έτος αυτό, η παραγωγή ψαριών καταλαμβάνει, σχεδόν το 50% της παγκόσμιας παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών, πιο συγκεκριμένα, ανήλθε σε 56,33 εκατομμύρια τόνους, με αύξηση 3,5% σε σχέση με το έτος 2018. Ακολουθούν τα υδρόβια φυτά, αντιπροσωπεύοντας το 29% του συνολικού όγκου παραγωγής, κατόπιν τα μαλάκια αντιπροσωπεύοντας το 15%, μετά τα καρκινοειδή και τέλος με ποσοστό σχεδόν 1% τα ασπόνδυλα. (ΕΛΟΠΥ, 2021). Στην Εικόνα 2, φαίνεται η εξέλιξη της παραγωγής ιχθυοκαλλιέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο, ξεκινώντας από το 1950.



Εικόνα 2: Εξέλιξη παραγωγής ιχθυοκαλλιέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο από το 1950 κι έπειτα.

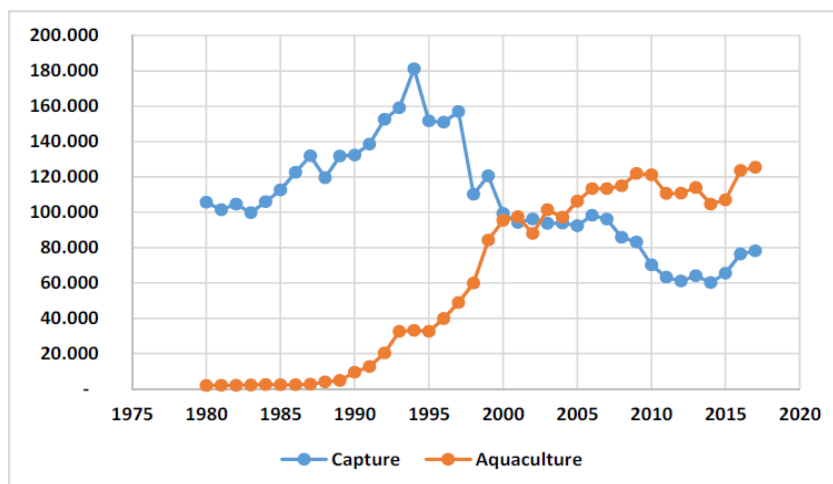
Στην Εικόνα 3, παρουσιάζεται για το έτος 2019 η παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανά ήπειρο.



Εικόνα 3: Ποσοστιαία παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανά ήπειρο για το 2019 (FAO).

1.3 Ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Αν και η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών στην Ελλάδα είναι γνωστή αιώνες, η υδατοκαλλιέργεια εμφάνισε αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης από τη δεκαετία του 1980 κι έπειτα. Η διαρκώς αυξανόμενη ζήτηση αλιευτικών προϊόντων σε συνδυασμό με το κατάλληλο κλίμα, την ποιότητα των υδάτων αλλά και την εκτεταμένη ακτογραμμή, ώθησε στην ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας. Το 1980, μόλις το 2% της παραγωγής αλιευτικών προϊόντων, στην Ελλάδα, προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια, συγκεκριμένα 2.000 τόνοι, ενώ το υπόλοιπο 98%, ήτοι 105.651 τόνοι, από την συλλεκτική αλιεία (ΕΛΟΠΥ, 2021). Η αναλογία αυτή ξεκίνησε να μεταβάλλεται με την ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας, και από το 2003, η παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας, υπερβαίνει αυτήν της αλιείας. Στην Εικόνα 4, αποτυπώνεται ευδιάκριτα η αύξηση της παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών, έναντι της αλιείας (Κγνελου, Ιεραπετρίτις, 2020).

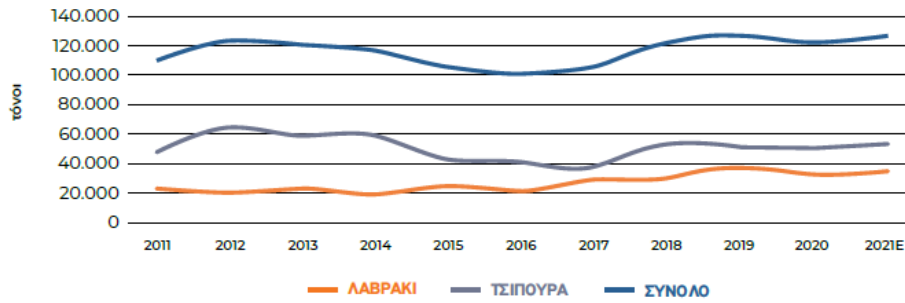


Εικόνα 4: Συνολική παραγωγή σε τόνους αλιευτικών προϊόντων (μπλε χρώμα) και υδατοκαλλιέργειών (πορτοκαλί χρώμα) στην Ελλάδα, 1980-2017 (Κγνελου, Ιεραπετρίτις, 2020).

Συνοψίζοντας, η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί πλέον τον κορυφαίο τομέα στην Ελλάδα. Η εκτροφή των ψαριών είναι μια παραγωγική διαδικασία που αντιγράφει τους μηχανισμούς της φύσης, έχει διάρκεια περίπου 16-18 μήνες κι απαιτεί κατάρτιση και εξειδικευμένη τεχνογνωσία. Η διατροφή των ιχθύων τηρεί αυστηρές προδιαγραφές, ώστε τα ψάρια να λαμβάνουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία. Αξιοσημείωτο είναι πως η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα, ξεκίνησε από 12 μονάδες με συνολική παραγωγή 100 τόνους περίπου, και έφτασε σήμερα να υπάρχουν 280 μονάδες, η παραγωγή των οποίων ξεπερνά του 110.000 τόνους (ΕΛΟΠΥ, 2021). Σημαντική κατηγορία, αποτελεί και η οστρακοκαλλιέργεια, με την Ελλάδα να εκτρέφει σχεδόν αποκλειστικά το μεσογειακό μύδι.

Τα κυριότερα είδη που παράγονται μέσω των υδατοκαλλιεργειών στη χώρα μας είναι οι θαλάσσιοι μεσογειακοί ιχθύες σε ποσοστό, για το έτος 2020 περίπου 85% του συνολικού όγκου, ενώ το υπόλοιπο τμήμα αφορά την εκτροφή οστρακοειδών και υδρόβιων φυτών με τα τελευταία να αποτελούν λιγότερο από 1% του συνολικού όγκου παραγωγής. Από τα εκτρεφόμενα είδη ιχθύων, τα κυριότερα αποτελούν η τσιπούρα, και το λαβράκι, αποτελώντας το 94% των πωλήσεων, ενώ το υπόλοιπο 4% αντιστοιχεί σε άλλα Μεσογειακά είδη όπως είναι το λυθρίνι, η συναγρίδα και ο κρανιός. Ειδικότερα, για το έτος 2020 η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε στους 117.000 τόνους, με την τσιπούρα να αποτελεί το 56% του όγκου παραγωγής και το λαβράκι το υπόλοιπο 44% (ΕΛΟΠΥ, 2021). Στην Εικόνα 5, παρουσιάζεται η διακύμανση της παραγωγής λαβρακιού και τσιπούρας, όπως αυτή προσδιορίστηκε για το διάστημα 2011-2020.

Παραγωγή τσιπούρας & λαβρακιού

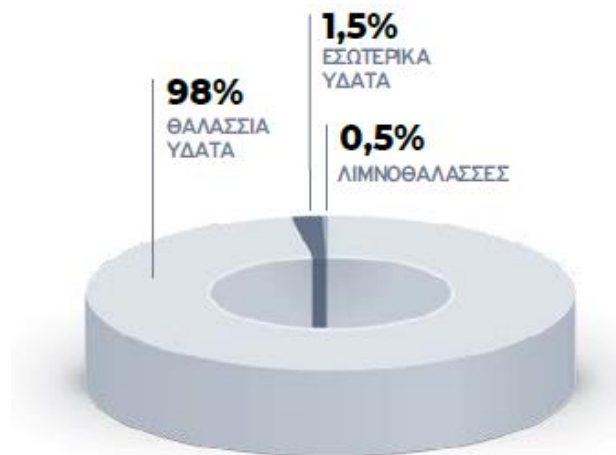


Εικόνα 5: Διακύμανση παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού στην Ελλάδα για τα έτη 2011-2020.

Σύμφωνα με τον ΕΛΟΠΥ, ο συνολικός όγκος παραγωγής για το έτος 2019 ανήλθε στους 151.372 τόνους, με συνολική αύξηση από το προηγούμενο έτος 3,9%. Η εκτροφή ψαριών, συγκεκριμένα, για το έτος 2019 ανήλθε σε 127.738 τόνους, αντιπροσωπεύοντας το 84% του συνολικού όγκου, ενώ το υπόλοιπο 16%, ήτοι 23.364 τόνοι προήλθε από την παραγωγή οστρακοειδών.

Στην Εικόνα 6, παρουσιάζεται η ποσοστιαία προέλευση της παραγωγής των εκτρεφόμενων ψαριών. Όπως φαίνεται, το 98,2% προέρχεται από τη θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, ενώ μόλις το 1,8% από την ιχθυοκαλλιέργεια εσωτερικών υδάτων (ΕΛΟΠΥ, 2021).

Περιβάλλον εκτροφής



Εικόνα 6: Ποσοστιαία προέλευση παραγωγής ψαριών στην Ελλάδα σύμφωνα με το περιβάλλον εκτροφής.

Για το έτος 2020, σύμφωνα με δεδομένα της ΕΛΣΤΑΤ, ο συνολικός όγκος εξαγωγών στην Ελλάδα, ανήλθε σε 147.925 τόνους, εκ των οποίων το 62% αποτελούσαν εξαγωγές ελληνικής τσιπούρας και λαβρακιού ιχθυοτροφείου. Είναι από τις πιο σημαντικές χώρες παραγωγής υδατοκαλλιέργειας, συγκεκριμένα, για το 2019 κατατάσσεται στην 5^η θέση της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ως προς το συνολικό όγκο

παραγωγής υδατοκαλλιέργειας, ενώ είναι η μόνη χώρα που παράγει πάνω από 100.000 τόνους ψαριών ετησίως (ΕΛΟΠΥ, 2021).

Κεφάλαιο 2

ΙΧΘΥΕΣ- ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ, ΣΥΣΤΑΣΗ, ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ

2.1 Εισαγωγή

Τα ιχθυηρά κατέχουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή καθώς περιέχουν όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Συγκεκριμένα, αποτελούν κύρια πηγή πολύτιμων ζωικών πρωτεϊνών και απαραίτητων αμινοξέων, ωφέλιμων λιπιδίων (ω-3 λιπαρών οξέων), βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Ωστόσο, η χημική σύσταση διαφέρει αισθητά ανάλογα με το είδος, την ηλικία και το περιβάλλον ανάπτυξης του κάθε ιχθυηρού.

Τα ψάρια, ανήκουν σε μία ομάδα προϊόντων υπέρ-ευαίσθητων στην αλλοίωση. Αποτελεί, επομένως, ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα η μελέτη της σύστασης, της μορφολογίας αλλά και των βασικών αλλοιώσεων που λαμβάνουν χώρα και η γνώση τους σε βαθύτερο επίπεδο.

Η ποιότητα της σάρκας τους είναι το αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου συνόλου χαρακτηριστικών που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, παράγοντες όπως η χημική σύνθεση, η υφή και το χρώμα. Οι παράμετροι αυτές επηρεάζονται τόσο από εγγενείς, όπως το είδος και το μέγεθος του ιχθυηρού, όσο και εξωγενείς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα του νερού και η εποχή (Borrgensen, 1992).

2.2 Σύσταση και βιολογική αξία ιχθύων

Η κατανάλωση της σάρκας των ιχθυηρών έχει υψηλή βιολογική αξία, καθώς αποτελεί κύρια πηγή ζωικών πρωτεϊνών, με περιεκτικότητα σε ακατέργαστη πρωτεΐνη περίπου 17-20%, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ποιότητα και απορροφησιμότητα. Αντιθέτως, η περιεκτικότητα σε λιπαρά και νερό, ποικίλει ανάλογα το είδος του ιχθυηρού. Συγκεκριμένα, τα μη λιπαρά είδη έχουν περιεκτικότητα σε λίπος από 0,1% έως 0,4%, ενώ άλλα είναι εξαιρετικά λιπαρά με περιεκτικότητα που κυμαίνεται από 16 έως 26% (Belitz *et al.*, 2009).

Επιπλέον, τα ψάρια είναι πρωτογενής φυσική πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι απαραίτητα από τον ανθρώπινο οργανισμό, ο οποίος δεν μπορεί να τα συνθέσει μόνος του. Κρίνεται, επομένως, αναγκαίο να λαμβάνονται αυτού του είδους τα λιπαρά από την διατροφή, τα οποία θεωρούνται πως ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων, όπως η μείωση της χοληστερίνης και οι αντικαρκινικές ιδιότητες (Paschos, 2008).

2.2.1 Υγρασία

Το νερό είναι το κύριο συστατικό στις σάρκες των ιχθύων, και απαντάται είτε ως δεσμευμένο είτε ως ελεύθερο. Η περιεκτικότητα του εξαρτάται από το περιεχόμενο

λίπος του ιχθυηρού, για παράδειγμα στα άπαχα ψάρια αντιπροσωπεύει περίπου το 80% κ.β. (Haard, 1992). Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε λίπος και νερό αθροίζεται στο 80% περίπου του μυϊκού βάρους.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε νερό είναι ποικίλοι, όπως η ηλικία του ψαριού και η διατροφή του. Γενικά η περιεκτικότητα σε υγρασία μειώνεται στους ιχθύες με την αύξηση της ηλικίας, λόγω της αύξησης της λιποπεριεκτικότητάς τους. Τα ψάρια που προέρχονται από υδατοκαλλιέργειες τείνουν να έχουν μικρότερη περιεκτικότητα νερού στο μυϊκό τους ιστό, σε σύγκριση με εκείνα που ζουν ελεύθερα (Haard, 1992). Το λαβράκι έχει περιεκτικότητα σε υγρασία 69,68% ($\pm 0,67$) και σε τέφρα 1,95% ($\pm 0,02$) (Ozden & Erkan, 2008).

2.2.2 Πρωτεΐνες

Τα ψάρια αποτελούν κύρια πηγή ζωικών πρωτεϊνών, με περιεκτικότητα 17-20%, αλλά υπάρχουν κι αναφορές που σημειώνουν ποσοστό μικρότερο του 6% αλλά και μεγαλύτερο του 25% (Belitz *et al.*, 2009). Το λαβράκι συγκεκριμένα έχει περιεκτικότητα ίση με 21,70% ($\pm 1,32\%$) (Ozden & Erkan, 2008). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς είναι αξιοποιήσιμες από τον ανθρώπινο οργανισμό σε ποσοστό 93-97% (Haard, 1995) και περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα σε κατάλληλη σύνθεση. Το πρωτεϊνικό άζωτο στους μυϊκούς ιστούς των ψαριών κυμαίνεται μεταξύ 2-3%. Οι μυϊκές πρωτεΐνες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες είναι οι εξής,

- Συσταλτικές ή μυοϊνικές, οι οποίες είναι διαλυτές στα άλατα και αποτελούν το 65-75% της συνολικής πρωτεΐνης, στις οποίες ανήκει η μυοσίνη και η τροπονίνη. Αυτές είναι υπεύθυνες για την υψηλή αφομοίωση των πρωτεϊνών των ψαριών έναντι άλλων τροφών.
- Σαρκοπλασματικές, οι οποίες είναι υδατοδιάλυτες, π.χ. αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη, απαρτίζονται σε μεγάλο βαθμό από ένζυμα και εμφανίζονται σε ποσοστό 20-30%
- Πρωτεΐνες συνδετικού ιστού, όπου είναι αδιάλυτες και αποτελούν, το υπόλοιπο, μόλις 1-3% της συνολικής πρωτεΐνης, έχοντας κύριο συστατικό το κολλαγόνο (έως και 90%) και την ελαστική. Στην αναλογία αυτών οφείλεται η τρυφερότητα στις σάρκας των ψαριών (Belitz *et al.*, 2009; Torpe *et al.*, 2007).

Στον Πίνακα 1, παρατίθενται οι αναλογίες των επιμέρους συστατικών των μυοϊνικών πρωτεϊνών στους ιχθύες.

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα των συστατικών πρωτεϊνών των ψαριών (Belitz *et al.*, 2009).

Πρωτεΐνη	Περιεκτικότητα
Μυοσίνη	50-58
Ακτίνη G	15-20
Τροπομυοσίνη	4-6

Τροπονίνη	4-6
Παραμυοσίνη	2-19* (*υψηλό ποσοστό στους λείους μύες μυδιών και καλαμαριών)

2.2.3 Άλλες αζωτούχες ενώσεις

Η περιεκτικότητα σε μη πρωτεϊνικό άζωτο (N) είναι το 9-18% της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο. Τέτοιες ουσίες αποτελούν τα ελεύθερα αμινοξέα, τα πεπτίδια, το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης, η ουρία, τα νουκλεοτίδια και τα νουκλεϊκά οξέα. Η περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα των υδρόβιων ζώων είναι συνήθως υψηλότερη από εκείνη των χερσαίων, και κυμαίνεται προσεγγιστικά από 0,5% έως και 2% κ.β. του βάρους του μυϊκού ιστού (Haard, 1992).

Οι ενώσεις αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γεύση και στο άρωμα των ιχθυηρών. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα τους μπορεί να είναι η αλατότητα του νερού, η ηλικία του ψαριού και η εποχή. Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικότερα οι σημαντικότερες κατηγορίες των μη αζωτούχων ενώσεων που εντοπίζονται στους ιχθύες:

- **Αμινοξέα, πεπτίδια:** Η ιστιδίνη είναι το κυρίαρχο ελεύθερο αμινοξύ στα ψάρια με σκουρόχρωμη σάρκα, όπως ο τόνος, με περιεκτικότητα σε αυτήν 0,6-1,3% νωπού βάρους (η οποία μπορεί να ξεπεράσει και το 2%), σε αντίθεση με τα ιχθυηρά ανοιχτόχρωμης σάρκας στα οποία κυμαίνεται μεταξύ 0,005-0,05%. Κατά την αποσύνθεση του ψαριού από την περιεχόμενη ιστιδίνη σχηματίζεται μεγάλη ποσότητα ισταμίνης η οποία αποτελεί δείκτη αλλοίωσης αυτών των προϊόντων. Περιέχονται επίσης ανσερίνη, καρνοσίνη και σε μεγαλύτερη ποσότητα ταυρίνη (500mg/kg νωπού ιστού) (Belitz *et al.*, 2009).
- **Οξείδια αμινών:** Τα ιχθυηρά περιέχουν οξείδιο τριμεθυλαμίνης (TMAO), το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης. Σε αυτά του θαλασσινού νερού, το TMAO, βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες (40-120 mg/kg), ενώ στα ιχθυηρά του γλυκού νερού κυμαίνεται σε μόλις 0 έως 5 mg/kg. Κατά τη μεταθανάτια φάση αυτό διασπάται από βακτήρια σε τριμεθυλαμίνη, κι από ένζυμα σε διμεθυλαμίνη και φορμαλδεΐδη. Οι ουσίες αυτές είναι υπεύθυνες για την χαρακτηριστική οσμή του αλλοιωμένου ψαριού και την αύξηση της σκληρότητας της σάρκας του, συγκεκριμένα, μέσω μείωσης της διαλυτότητας πρωτεϊνών, ως αποτέλεσμα αντιδράσεων της διμεθυλαμίνης και φορμαλδεΐδης με πρωτεΐνες. Για τους παραπάνω λόγους θεωρείται ότι αποτελούν δείκτη της ποιότητας των ιχθύων (Τούλη, 2013).
- **Ουρία:** Βρίσκεται στον μυϊκό ιστό σε αρκετά υψηλά επίπεδα, 1.3-2.1 g/kg, και μετατρέπεται, κατά την αποσύνθεση του ψαριού, σε αμμωνία.

2.2.4 Λίπη, λιπαρά οξέα

Το λίπος των ιχθυηρών αποτελείται από λίπη και έλαια, όπως οι γλυκερόλες, άλλα ουδέτερα λιπίδια, όπως οι στερόλες και οι εστέρες, και πολικά λιπίδια, τα φωσφολιπίδια. Η περιεκτικότητα σε λίπος στους ιχθύες παρουσιάζει μεγάλες μεταβολές, αναλόγως του είδους, καθώς επίσης επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία και τη διατροφή του ψαριού καθώς κι από την εποχή.

Ανάλογα με την περιεκτικότητα της σάρκας τους σε λίπος, τα ψάρια χωρίζονται σε άπαχα, ημίπαχα και λιπαρά (Belitz *et al.*, 2009). Τα άπαχα ψάρια αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια, ενώ το αποθηκευμένο λίπος των λιπαρών περιέχει, συνήθως, τριγλυκερίδια (Haard, 1998). Στα λιπαρά ψάρια, είναι υψηλό και το ποσοστό λίπους στα κόκκαλα (έως και 320 g/kg ψαριού), ενώ στα μη λιπαρά φτάνει μέχρι 21 g/kg (Torpe *et al.*, 2007). Το λαβράκι εμφανίζει περιεκτικότητα σε λιπαρά ίση με 6,5% ($\pm 0,7\%$) (Ozden & Erkan, 2008).

Όπως είναι γνωστό, τα ψάρια είναι πηγή ω-3 λιπαρών οξέων, τα οποία είναι πολύτιμα για τη διατροφή του ανθρώπου. Στους ιχθύες που ζουν ελεύθερα εμφανίζεται μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ω-3 λιπαρά, σε αντίθεση με τους ιχθύες των υδατοκαλλιεργειών οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη λιποπεριεκτικότητα αλλά μικρότερη συγκέντρωση ω-3 λιπαρών οξέων. Ωστόσο, παρά τα οφέλη τους, οι υψηλές τιμές ακόρεστων λιπαρών οξέων, καθιστούν τα ψάρια ευοξειδωτα, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα κατά τη συντήρησή τους. Συγκεκριμένα, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες υποβάθμισης της ποιότητας των ιχθυηρών.

2.2.5 Υδατάνθρακες

Η περιεκτικότητα του μυϊκού ιστού σε υδατάνθρακες είναι μικρότερη του 1%, με κύριο το γλυκογόνο. Συγκεκριμένα, το λαβράκι έχει περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες 0,17% ($\pm 0,19\%$) (Ozden & Erkan, 2008). Τα ψάρια που βρίσκονται σε καλή «βιολογική κατάσταση» έχουν επαρκή αποθέματα γλυκογόνου στους μύες τους καθώς και αποθέματα γλυκογόνου και λιπιδίων στο ήπαρ (Love, 1997). Η ποσότητα του μυϊκού γλυκογόνου είναι ένας πολύ καθοριστικός παράγοντας για την ποιότητα της σάρκας του ψαριού, καθώς το γλυκογόνο είναι που καθορίζει το γλυκολυτικό δυναμικό και το τελικό pH της σάρκας (Ang & Haard, 1985; Love, 1997). Το χαμηλό pH προσδίδει στη σάρκα πιο σφιχτή υφή, η οποία, βέβαια, καθορίζεται και από τον ρυθμό μείωσης του στο μυϊκό ιστό κατά τη μεταθανάτια φάση, καθώς η ταχεία πτώση του οδηγεί σε μαλακή και υδαρή υφή (Haard, 1992).

2.2.6 Βιταμίνες

Τα ψάρια αποτελούν, ως γνωστόν, υψηλή πηγή βιταμινών, όπως είναι οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A και D. Πέραν αυτών, απαντώνται και άλλα είδη όπως, οι βιταμίνες E και K, καθώς και σε μεγαλύτερες ποσότητες, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες θειαμίνη, ριβοφλαβίνη και νιασίνη.

2.2.7 Ανόργανα συστατικά

Οι μύες του ψαριού περιέχουν σχεδόν όλα τα μεταλλικά στοιχεία που υπάρχουν στον υδάτινο βιότοπο στον οποίο βρίσκεται και τα οποία είναι απαραίτητα σε μικροποσότητες και για τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι ιχθύες αποκτούν μέσω της τροφής τους σημαντικές ποσότητες μετάλλων, και κυρίως φωσφόρου (P). Η συγκέντρωση ορισμένων μετάλλων αυξάνεται με την ηλικία και το μέγεθος του ψαριού, συμπεριλαμβανομένων και των τοξικών μετάλλων, αρσενίου, καδμίου και υδραργύρου (Love, 1997). Στον Πίνακα 2, φαίνονται οι ποσότητες των βασικών μεταλλικών στοιχείων που περιέχονται στους ιχθύες.

Πίνακας 2: Μεταλλικά στοιχεία που απαντώνται στα ιχθυηρά (Belitz et al., 2009).

Στοιχείο	Περιεχόμενη ποσότητα ($\frac{mg}{kg}$)
Ca	48-420
Mg	240-310
P	1730-2170
Fe	5-248
Cu	0,4-1,7
I	0,1-1,0

Στον Πίνακα 3, συνοψίζονται τα θρεπτικά συστατικά των ψαριών καθώς και η μέγιστη, η ελάχιστη και η μέση διακύμανση της περιεκτικότητάς τους.

Πίνακας 3: Διακύμανση περιεκτικότητας των θρεπτικών συστατικών των ιχθύων (% επί υγρής βάσης) (Love, 1980).

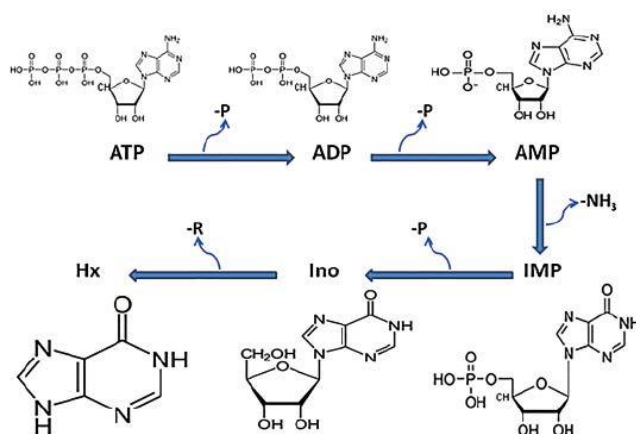
	Ελάχιστη ποσότητα (%)	Συνήθης διακύμανση (%)	Μέγιστη ποσότητα (%)
Πρωτεΐνη	6	16-21	28
Λίπος	0,1	0,2-25	67
Υδατάνθρακες		<0,5	
Τέφρα	0,4	1,2-1,5	1,5
Υγρασία	28	66-81	96

2.3 Μεταθανάτιες αλλοιώσεις

Μετά τη θανάτωση του ιχθύος, λόγω της παύσης λειτουργίας της καρδιάς και του ελέγχου του σώματος από τον εγκέφαλο, η τροφοδοσία των ιστών με οξυγόνο καθίσταται προβληματική (Tsironi, 2010). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών, οι οποίες ακολουθούνται από την αποικοδόμηση των φωσφορικών, όπως η φωσφορική κρεατίνη, την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και την διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η οποία παράγεται από το ATP όταν αυτό καταναλώνεται σε μεταβολικές διεργασίες. Συνέπεια αυτού είναι η μοναδική πηγή ενέργειας του οργανισμού να προέρχεται από την αντίδραση της γλυκόλυσης στους

μυϊκούς ιστούς, η οποία παράγει γαλακτικό οξύ, που οδηγεί στην πτώση του pH τους. Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκογόνο των μυών του ψαριού, η πτώση του pH είναι μικρή, συγκεκριμένα παρατηρούνται τιμές κοντά στο 6,2. Το pH του φρέσκου ψαριού κυμαίνεται μεταξύ του 6,0 και του 6,5, με όριο ανεκτικότητας για κατανάλωση την τιμή 6,8, ενώ φτάνει και σε τιμές 7 και άνω όταν το προϊόν δεν είναι πλέον καταναλώσιμο, λόγω του σχηματισμού αμμωνίας και αμινών (Belitz *et al.*, 2009). Όταν η συγκέντρωση του ATP μειωθεί κατά το ήμισυ, ο μυϊκός ιστός αρχίζει και χάνει την ελαστικότητά του, συστέλλεται, κι από εύκαμπτος και μαλακός μετατρέπεται σε σκληρό και άκαμπτο. Αυτό το φαινόμενο αποτελεί την νεκρική ακαμψία.

Στην Εικόνα 7, παρουσιάζεται η αποικοδόμηση του ATP κατά το φαινόμενο της νεκρικής ακαμψίας στον μυϊκό ιστό του ψαριού.



Εικόνα 7: Πορεία αποικοδόμησης ATP προς παραγωγή οξέος κατά την νεκρική ακαμψία.

Η νεκρική ακαμψία διακρίνεται σε δύο στάδια, από την στιγμή της θανάτωσης έως και το τέλος της. Το πρώτο στάδιο αφορά το χρονικό διάστημα από την θανάτωση του ψαριού μέχρι την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας, ενώ το δεύτερο από την έναρξη έως και το τέλος του φαινομένου. Ο σημαντικότερος παράγοντας που την επηρεάζει είναι η θερμοκρασία, η οποία σε υψηλότερα επίπεδα οδηγεί στην επιτάχυνση του φαινομένου, γεγονός επιζήμιο για την διατήρηση της ποιότητας του προϊόντος, καθώς κατά τη νεκρική ακαμψία παρατηρείται έντονη επιβράδυνση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επομένως, επιβραδύνεται και η αλλοίωση του ιχθυηρού και διατηρεί τα χαρακτηριστικά της φρεσκότητας του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η επιμήκυνση του φαινομένου της νεκρικής ακαμψίας παρατηρείται και στα ιχθυηρά των υδατοκαλλιεργειών, καθώς η θανάτωση του ψαριού δεν επέρχεται όπως κατά την αλιευτική παραγωγή, δηλαδή περιορίζεται η μυϊκή δραστηριότητα και η αγωνία του αλιεύματος πριν την σύλληψη, φτάνοντας στη θανάτωση με υψηλά αποθέματα γλυκογόνου και ATP, ενώ αποθηκεύεται και υπό ψύξη άμεσα (Παπαναστασίου, 1990).

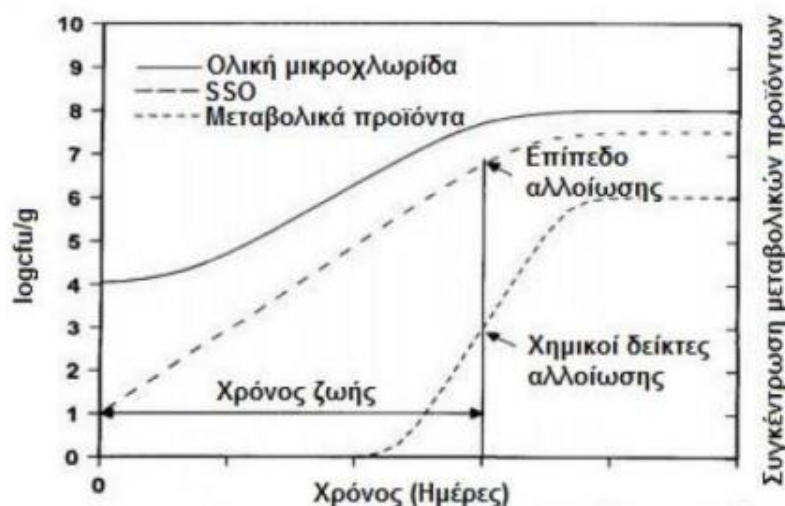
2.4 Αλλοιώσεις ιχθυηρού

Η αλλοίωση των τροφίμων ορίζεται ως η υποβάθμιση της ποιότητας τους, δηλαδή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, με αποτέλεσμα να οδηγεί στην απόρριψη του προϊόντος από τους καταναλωτές. Οι νωποί ιχθύες είναι εξαιρετικά ευαλλοίωτοι συγκριτικά με άλλα προϊόντα τροφίμων. Επομένως, για να επεκταθεί ο χρόνος ζωής είναι σημαντικό να αναγνωρίζονται οι αιτίες που οδηγούν στην ποιοτική υποβάθμιση. Σημαντικότερο παράγοντα αλλοίωσης αποτελεί η μικροβιακή ανάπτυξη, και αναλόγως το είδος, το χρόνο και τον τρόπο συντήρησης ακολουθούν οι χημικές αλλοιώσεις υποβάθμισης όπως η οξείδωση των λιπαρών αλλά και οι μεταβολές των φυσικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.

2.4.1 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθυηρών

Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να παρουσιάζει ποικίλες μορφές αλλά όλες προέρχονται από την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα διαφόρων μικροοργανισμών. Τα νωπά τρόφιμα περιέχουν τεράστια ποικιλία μικροοργανισμών, εκ των οποίων μόνο ένα μέρος μπορεί να αναπτύξει αποικίες σε βαθμό ικανό να επηρεάσει την ποιότητα και την αλλοίωσή τους. Αυτοί αναφέρονται με τον όρο «ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί» (specific spoilage organisms-SSO) και αποτελούν το είδος της συνολικής μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση. Η ανάπτυξη της αλλοίωσης μπορεί να εξελιχθεί διαφορετικά, ακόμη και σε προϊόντα ίδιας κατηγορίας, εξαρτώμενη από την προέλευση και άλλες άγνωστες παραμέτρους, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Οι ιχθύες και τα προϊόντα τους έχουν πολύ υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο, που επηρεάζεται σημαντικά από το περιβάλλον που αναπτύσσονται (π.χ. ευρύ φάσμα βιοτόπων, βαθμός ρύπανσης) καθώς και από την ανθρώπινη διαχείριση, όπως οι συνθήκες αποθήκευσης, η συσκευασία και οι ποικίλες μέθοδοι επεξεργασίας στις οποίες πιθανόν υποβάλλονται. Επιπλέον, οι ιχθύες, αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για τη μικροβιακή ανάπτυξη, λόγω ενδογενών παραγόντων, δηλαδή, του υψηλού pH της σάρκας, της χαμηλής περιεκτικότητας υδατανθράκων, της παρουσίας υψηλού φορτίου μη πρωτεϊνικού αζώτου, της υψηλής υγρασίας και του υδάτινου περιβάλλοντος ανάπτυξης (Gram & Huss, 1996). Στην Εικόνα 8, περιγράφεται γραφικά η αλλοίωση των ιχθυηρών, ως συνδυασμός της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, των ειδικών αλλοιογόνων οργανισμών και των χημικών δεικτών αλλοίωσης.



Εικόνα 8: Περιγραφή αλλοίωσης ιχθυηρών (Tsironi, 2010).

Η ποικιλόθερμη φύση των ψαριών επιτρέπει σε βακτήρια με ευρύ φάσμα θερμοκρασιών να αναπτυχθούν, παραδείγματος χάριν, η μικροχλωρίδα των ψαριών εύκρατου νερού είναι οι ψυχρότροφοι Gram-αρνητικοί μικροοργανισμοί, τα ραβδόμορφα βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella* και *Vibrionaceae*, ενώ ανιχνεύονται και ορισμένοι Gram-θετικοί μικροοργανισμοί, όπως *Bacillus*, *Lactobacillus* και *Clostridium* (Gram & Huss, 1996). Από αυτούς τους μικροοργανισμούς, οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.) φαίνεται να αποτελούν τους ειδικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς των ψαριών της Μεσογείου, γόπας (*Boops boops*) και τσιπούρας (*Sparus aurata*), αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες (Katsoumanis & Nychas, 1999) και το *Photobacterium phosphoreum* ευθύνεται για την αλλοίωση του μπακαλιάρου, αποθηκευμένου σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας (Daalgard *et al.*, 1993).

Δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο μια ομάδα μικροοργανισμών υπερισχύει άλλων, αλλά είναι γνωστό πως ακόμη και μικρές μεταβολές στην επεξεργασία και την αποθήκευση των προϊόντων ιχθυηρών, μπορεί να προκαλέσουν δραματικές αλλαγές στην ανάπτυξη και σύνθεση των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Gram & Huss, 1996).

Γενικότερα, η αλλοίωση που αναπτύσσεται σε ιχθυηρά, αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες, συσχετίζεται, συνήθως, με την ύπαρξη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Επομένως, η χλωρίδα που χαρακτηρίζει τα αποθηκευμένα αερόβια υπό κατάψυξη ψάρια, αποτελείται, σχεδόν αποκλειστικά, από ψευδομονάδες και *Shewanella Putrefaciens* (Gram & Huss, 1996). Στα συσκευασμένα υπό κενό και κατάψυξη ιχθυηρά, ο αριθμός των ψευδομονάδων μειώνεται αλλά η *Shewanella*, χρησιμοποιώντας το οξείδιο τριμεθυλαμίνης (TMAO) αυξάνεται σε επίπεδα 10^6 - 10^8 CFU/g, παράγοντας τριμεθυλαμίνη, που οδηγεί σε οργανοληπτική υποβάθμιση και απόρριψη του προϊόντος (Gram & Huss, 1996; Dalgaard *et al.*, 1993). Ακόμη, κατά τη συντήρηση των ιχθυηρών σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Modified Atmosphere

Package-MAP), παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη σύσταση της χλωρίδας. Παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των ψευδομονάδων και η κυρίαρχη αλλοιογόνος μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από Gram θετικά βακτήρια όπως είναι τα γαλακτικά βακτήρια και τα *Brochothrix thermosphacta*. Η αλλοίωση προϊόντων ιχθυηρών, συσκευασμένα είτε σε ατμόσφαιρα CO₂ είτε υπό κενό έχει συσχετιστεί διαπιστωμένα με την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων (Koutsoumanis *et al.*, 1997, Tsironi *et al.*, 2008). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση των ιχθυηρών της τροπικής και της εύκρατης ζώνης, αποθηκευμένα υπό ψύξη και συσκευασμένα σε διαφορετικές συνθήκες.

Πίνακας 4: Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί ιχθυηρών κατά την συντήρηση υπό ψύξη (Tsironi, 2010).

Ατμόσφαιρα	Εύκρατη ζώνη	Τροπική ζώνη
Αέρας	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i> spp.
Κενό	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i> Γαλακτικά βακτήρια <i>Brochothrix thermosphacta</i> Άλλοι Gram-θετικοί	Γαλακτικά βακτήρια Άλλοι Gram-θετικοί
CO ₂	<i>Photobacterium phosphoreum</i> Γαλακτικά βακτήρια <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Γαλακτικά βακτήρια Άλλοι Gram-θετικοί TMAO-ανάγοντα βακτήρια

Η υποβάθμιση της ποιότητας επέρχεται σταδιακά. Αρχικά, προσδιορίζεται από απώλεια της χαρακτηριστικής γεύσης φρέσκου ιχθυηρού, και κατόπιν μιας περιόδου, κατά την οποία η οσμή και γεύση περιγράφονται ως ουδέτερες, ξεκινούν να ανιχνεύονται δυσάρεστες οσμές και αλλοιώσεις στη γεύση, οι οποίες εντείνονται με το χρόνο και οδηγούν στην απόρριψη του προϊόντος. Στον Πίνακα 5, παρουσιάζονται οι φυσικοχημικές μεταβολές που προκύπτουν κατά την αλλοίωση του ιχθυηρού.

Πίνακας 5: Μικροβιακή αλλοίωση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ιχθυηρού (Gram & Huss, 1996).

Μικροβιολογική δραστηριότητα	Οργανοληπτική εκδήλωση
Διάσπαση συστατικών προϊόντος	Παραγωγή αλλοιωμένης οσμής και γεύσης
Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαρικού υλικού	Παραγωγή γλοιώδους υγρού
Ανάπτυξη μυκήτων, βακτηρίων, ζυμών	Εμφάνιση ορατών έγχρωμων ή μη αποικιών
CO ₂ -από υδατάνθρακες ή αμινοξέα	Παραγωγή αερίων

Είναι, σαφώς, ουσιαστικής σημασίας, η αναγνώριση των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών (SSO) και το εύρος συνθηκών υπό τις οποίες οδηγούν στο φαινόμενο της αλλοίωσης, προκειμένου να υπάρξει προσεγγιστική εκτίμηση της ποιότητας και διάρκειας ζωής των ψαριών. Η μοντελοποίηση της ανάπτυξης των SSO ως συνάρτηση των συνθηκών αποθήκευσης, ιδιαίτερα της θερμοκρασίας, παρέχει τα μέσα για την αξιόπιστη πρόβλεψη της διάρκειας ζωής του ιχθυηρού (Koutsoumanis *et al.*, 2000).

2.4.2 Οξείδωση των λιπαρών οξέων

Η μεγάλη περιεκτικότητα των ιχθυηρών σε λιπαρά, ιδιαίτερα ακόρεστα λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια, έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των ιχθυηρών λόγω της οξείδωσης αυτών των λιπαρών. Η οξείδωση αυτή, είναι εμφανώς, πιο σημαντικός παράγοντας αλλοίωσης στα λιπαρά ιχθυηρά, σε εκείνα δηλαδή με υψηλή περιεκτικότητα λιπαρών, αλλά επηρεάζεται και από εξωτερικούς παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία και το φως στα οποία εκτίθεται το ιχθυηρό, καθώς και η παρουσία οξυγόνου προκειμένου να αναπτυχθούν οι κατάλληλες συνθήκες (Botta, 1995). Η οξείδωση των λιπαρών ξεκινάει με τη θανάτωση του ιχθύος, και με την ανάπτυξη της, υποβαθμίζει την ποιότητα προσδίδοντας στο τρόφιμο ανεπιθύμητη γεύση και ακατάλληλη οσμή. Συγκεκριμένα, βέβαια, για το λαβράκι, έχει παρατηρηθεί ότι η αυτό-οξείδωση των λιπαρών του υπό κατάψυξη αποτελεί μικρής σημασίας παράγοντα αλλοίωσης (Kyraia & Lougonois, 2002).

2.4.3 Μεταβολή των φυσικών χαρακτηριστικών

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ιχθυηρών και των προϊόντων τους, αποτελούν βασικό κριτήριο στην αποδοχή αυτών των τροφίμων από τους καταναλωτές, αλλά και εξίσου σημαντική παράμετρο, πέραν των μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών, για την ποιότητα του προϊόντος. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η υφή, το χρώμα, το σχήμα και η ομοιομορφία του. Οι μετρήσεις του χρώματος αφορούν τον προσδιορισμό τριών παραμέτρων L,a,b της κλίμακας CIE (Commision International de l'Éclairage) Lab. Η υφή προσδιορίζεται από τη μέτρηση διαφόρων χαρακτηριστικών όπως η σκληρότητα, η μασητικότητα και η προσκολλησιμότητα, στη σάρκα του ιχθύος (Tsironi, 2010).

2.4.4 Μεταβολή οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

Μία ακόμη πολύ σημαντική παράμετρος αποδοχής των τροφίμων, γενικότερα, και ειδικότερα των ιχθυηρών, αποτελεί η εμφάνιση και η οσμή, δηλαδή τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών αυτών πραγματοποιείται είτε για την επιβεβαίωση πως το προϊόν ανταπεξέρχεται

στις απαιτήσεις των καταναλωτών, από τις εταιρείες παραγωγής, είτε για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας του προϊόντος από ειδικευμένους ελεγκτές (Botta, 1995).

Στον Πίνακα 6, παρουσιάζεται η μεταβολή στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για το λαβράκι, αποθηκευμένο υπό ψύξη, όπως αυτή αποτυπώθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης (Cakli *et al.*, 2007).

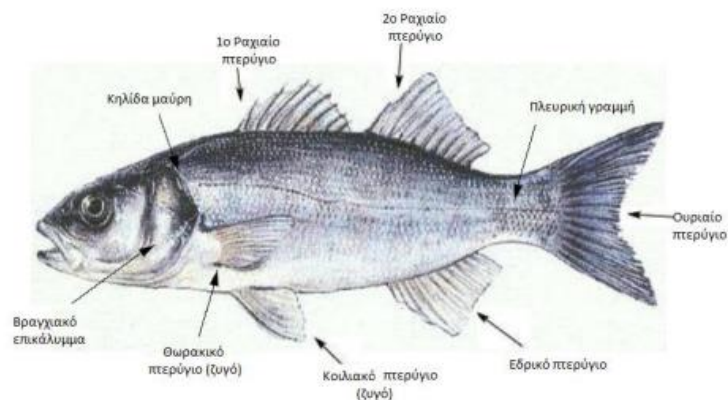
Πίνακας 6: Φυσικοχημικές και οργανοληπτικές μεταβολές συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης λαβρακιού υπό ψύξη (Cakli *et al.*, 2007).

	Χρόνος αποθήκευσης (days)						
	1	3	5	8	12	15	18
Εμφάνιση	Πολύ λαμπερό	Πολύ λαμπερό	Λαμπερό	Λαμπερό	Λαμπερό	Λαμπερό	Θαμπό
Δέρμα	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Μαλακό
Κολλώδες υγρό	Ανύπαρκτο	Ανύπαρκτο	Ελαφρώς κολλώδες	Ελαφρώς κολλώδες	Ελαφρώς κολλώδες	Ελαφρώς κολλώδες	Κολλώδες
Ακαμψία	Εύκαμπτο	Εύκαμπτο	Εύκαμπτο	Εύκαμπτο	Εύκαμπτο	Εύκαμπτο	Εύκαμπτο
Καθαρότητα ματιού	Καθαρό	Καθαρό	Καθαρό	Ελαφρώς θαμπό	Ελαφρώς θαμπό	Ελαφρώς θαμπό	Θαμπό
Σχήμα	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Βυθισμένο
Αίμα	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Ελαφρώς ματωμένο
Οσμή	Φρέσκια	Φρέσκια	Ουδέτερη	Χαρακτηριστική ιχθυηρού	Χαρακτηριστική ιχθυηρού	Χαρακτηριστική ιχθυηρού	Χαλασμένου
Αποχρωματισμός κοιλιάς	Ιριδίζον λευκό	Ιριδίζον λευκό	Κιτρινωπό	Κιτρινωπό	Κιτρινωπό	Κιτρινωπό	Κιτρινωπό
Υφή	Σφιχτό	Σφιχτό	Σφιχτό	Μαλακό	Μαλακό	Μαλακό	Βυθισμένο

2.5 Λαβράκι

2.4.1 Μορφολογία λαβρακιού

Το λαβράκι, με ονομασία *Dicentrarchus Labrax*, Linnaeus ή κατά το Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) European seabass, ανήκει στην οικογένεια Serranidae και έχει σώμα ατρακτοειδούς σχήματος, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους, που κυμαίνεται συνήθως από 22-46 cm. Φέρει δύο χωριστά ραχιαία πτερύγια, ένα εδρικό κι ένα ουριαίο, καθώς κι ένα ζεύγος θωρακικών κι ένα ζεύγος κοιλιακών πτερυγίων. Τα δόντια του είναι μικρά κι έχουν σχήμα ημισελήνοειδές, βρίσκονται στις σιαγόνες, περιφερειακά και στη μέση της γλώσσας και στον ουρανίσκο. Το χρώμα του είναι γκρίζο-ασημί στη ράχη, ασημί στα πλευρά και είτε λευκό είτε υποκίτρινο στην κοιλιά. Τα νεαρά ηλικιακά φέρουν σκούρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματος τους, οι οποίες εξαφανίζονται στην ενηλικίωση (Καββαδίας, 2002).



Εικόνα 9: Μορφολογία λαβρακιού.

Είναι ευρύαλο είδος, με δυνατότητα των μεγάλων ατόμων να επιβιώνουν και σε γλυκά νερά, ενώ το εύρος της αλατότητας στο οποίο μπορεί να επιβιώσει κυμαίνεται από 0,5 έως 100% (Καββαδίας, 2002). Επίσης, αποτελεί ευρύθερμο είδος, δηλαδή, μπορεί να επιβιώσει σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από τους 8°C έως και τους 30°C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 22°C.

Το λαβράκι συναντάται συνηθέστερα στη Μεσόγειο και στις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού Ωκεανού, και πιο σπάνια στη Μαύρη Θάλασσα. Τα νεαρά λαβράκια ζουν σε κοπάδια, σε αντίθεση με τα ενήλικα που συναντώνται πιο μοναχικά (FAO, 2020). Είναι αρπακτικά ζώα, καθώς τρέφονται με σχετικά μεγάλου μεγέθους οργανισμούς, για παράδειγμα καβούρια, γαρίδες και χέλια της άμμου.

2.4.2 Βιολογική αξία λαβρακιού

Τα τελευταία χρόνια το λαβράκι παρουσιάζει αυξημένη ζήτηση λόγω της θρεπτικής αξίας, της γεύσης, του αρώματος και συνολικά της ποιότητας του. Η διατροφική αξία, γενικότερα, των ψαριών είναι υψηλής σημασίας διότι αποτελούνται από πολλά ωφέλιμα στοιχεία τα οποία αναλύθηκαν. Ειδικότερα, στον Πίνακα 7, παρατίθενται τα περιεχόμενα διατροφικά στοιχεία του λαβρακιού, συγκεκριμένα, όπως αυτά έχουν οριστεί από το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (United States Department of Agriculture, USDA).

Πίνακας 7: Διατροφική αξία λαβρακιού (USDA).

Διατροφικά στοιχεία (ανά 100g λαβρακιού)		
Ενέργεια	97 kcal/406 kJ	
Πρωτεΐνη	18,4 g	
Λιπαρά	2 g	
Νερό	78,3 g	
Μεταλλικά στοιχεία	Φωσφόρος	194 mg
	Κάλιο	256 mg
	Νάτριο	68 mg

	Ασβέστιο	10 mg
	Σίδηρος	0.29 mg
	Μαγνήσιο	41 mg
	Χαλκός	0.019 mg
	Ψευδάργυρος	0.4 mg
	Μαγγάνιο	0.015 mg
	Σελήνιο	36.5 µg
Βιταμίνες	B1	0.11 mg
	B2	0.12 mg
	B3	1.6 mg
	B5	0.75 mg
	B6	0.4 mg
	B9	5 mg
	B-12	0.3 mg
	A	46.2 µg
	E	0.84 mg
	D	5.6 µg
Λιπαρά	K	0.1 µg
	Κορεσμένα	0,511 g
	Πολυακόρεστα	0.743 g
	Μονοακόρεστα	0.424 g
	Χοληστερίνη	41 mg

Κεφάλαιο 3

ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΙΧΘΥΗΡΩΝ- ΕΝΕΡΓΗ ΚΑΙ ΕΞΥΠΝΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

3.1 Εισαγωγή

Πολλές φορές οι αλλοιώσεις που υποβαθμίζουν την ποιότητα των τροφίμων προέρχονται από την έκθεση και την αλληλεπίδραση τους με το φως, τον αέρα, ειδικότερα, το οξυγόνο και την υγρασία του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, με συνέπεια την οξείδωση και την ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Είναι, επομένως, κατανοητό πως το περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται το τρόφιμο, δηλαδή οι συνθήκες της συσκευασίας στην οποία βρίσκεται, κατέχουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο για την ποιότητα και ως επακόλουθο το χρόνο ζωής του, ιδιαίτερα, σε ευαλλοίωτα προϊόντα όπως είναι τα ιχθυηρά.

Η σύγχρονη, λοιπόν, συσκευασία δεν έχει πλέον αποκλειστικά τον παθητικό ρόλο της προστασίας και διαφύμισης του προϊόντος, αλλά διαδραματίζει ολοένα και περισσότερο ενεργό ρόλο στη συντήρηση και διατήρηση της ποιότητας και της ασφάλειας του τροφίμου στην αλυσίδα διανομής. Οι συσκευασίες των τροφίμων, έχουν αναπτυχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, κατά κύριο λόγο, εξαιτίας των αυξημένων απαιτήσεων στην ασφάλεια των προϊόντων, την επέκταση του χρόνου ζωής, τη διευκόλυνση των καταναλωτών καθώς και τη σχέση κόστους/ αποτελεσματικότητας (Taoukis & Labuza, 2003). Οι έξυπνες συσκευασίες, μπορούν επιπλέον, να παρακολουθούν την ποιότητα των προϊόντων και το ιστορικό του προϊόντος κατά τα κρίσιμα στάδια στην αλυσίδα ανεφοδιασμού.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, θα μελετηθούν οι συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, καθώς αποτελεί το κυρίαρχο τεχνολογικό εργαλείο για την συντήρηση και διατήρηση των ιχθυηρών τις τελευταίες δεκαετίες (Sivertsvik, 2002), η χρήση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα σε συνδυασμό με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα, δηλαδή η χρήση της ενεργής συσκευασίας καθώς και η έξυπνη συσκευασία με χρήση χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών (Time Temperature Integrators-TTI).

3.2 Ενεργή συσκευασία

Τα συσκευασμένα τρόφιμα με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Package-MAP) εμφανίζονται ολοένα και περισσότερο διαθέσιμα, στην προσπάθεια των κατασκευαστών τροφίμων να ανταποκριθούν στις αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών για φρέσκα προϊόντα, υπό ψύξη με εκτεταμένη διάρκεια ζωής. Τα συνήθη αέρια που χρησιμοποιούνται στο MAP, συγκεκριμένα για τα ιχθυηρά, είναι το οξυγόνο (O_2), το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και το άζωτο (N_2), καθώς και ο

συνδυασμός των συγκεντρώσεων τους σε διάφορες αναλογίες στη συσκευασία. Η επιλογή των αερίων και οι αναλογίες τους στην συσκευασία καθορίζονται από το εκάστοτε είδος ψαριού και το μηχανισμό αλλοίωσης που οδηγεί στην μείωση του χρόνου ζωής του τελικού προϊόντος (Tsironi *et al.*, 2019). Το διοξείδιο του άνθρακα είναι το συνηθέστερο αέριο που χρησιμοποιείται στο MAP της συσκευασίας των ψαριών, καθώς είναι υπεύθυνο για την επίδραση που έχει η τροποποιημένη ατμόσφαιρα στην αναστολή ή επιβράδυνση της ανάπτυξης βακτηρίων. Εξάλλου, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση αυξημένου επιπέδου διοξειδίου του άνθρακα παρατείνει τη ζωή των τροφίμων επιβραδύνοντας τη μικροβιακή ανάπτυξη (Stiles, 1991).

Η αρχή με την οποία λειτουργεί το MAP είναι η αντικατάσταση του αέρα στη συσκευασία με ένα διαφορετικό μείγμα αερίων καθορισμένης σύστασης. Μόλις εισαχθεί το μείγμα αερίων δεν πραγματοποιείται περαιτέρω έλεγχος της σύστασης του αερίου, η οποία θα αλλάξει αναπόφευκτα. Η τροποποίηση της ατμόσφαιρας δεν είναι καινοτόμα τεχνολογία, καθώς το 1882 δημοσιεύθηκε το πρώτο άρθρο σχετικά με την συντηρητική επίδραση του διοξειδίου του άνθρακα στα τρόφιμα, το οποίο παρουσίασε εκτεταμένη διάρκεια αποθήκευσης βοδινού κρέατος αποθηκευμένου υπό CO₂, ενώ η πρώτη πιο εκτενής έρευνα για τη χρήση του διοξειδίου του άνθρακα σε ιχθυηρά παρουσιάστηκε το 1930 (Sivertsvik *et al.*, 2002). Έκτοτε έχουν γίνει πολλές μελέτες για την επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε μεγάλο εύρος τροφίμων.

Στα ιχθυηρά, συγκεκριμένα, μελέτες έχουν υποδείξει πως η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας οδηγεί στην παράταση του χρόνου ζωής του προϊόντος κατά πολλές ημέρες, αναλόγως του είδους και της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Παρατηρείται, βέβαια, σημαντική διαφοροποίηση στα κυρίαρχα αλλοιογόνα βακτήρια των συσκευασμένων υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα ιχθύων, η οποία αποδίδεται στην γεωγραφική προέλευση καθώς και στις διαφορές στη θερμοκρασία του νερού και τις συνθήκες αποθήκευσης του κάθε δείγματος (Tsironi *et al.*, 2019).

Το οξυγόνο προκαλεί την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών και μπορεί να αναστείλει υπό συνθήκες την ανάπτυξη μόνο των αναερόβιων βακτηρίων, καθώς οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας στο οξυγόνο (Farber, 1991). Χρησιμοποιείται για την διατήρηση του κόκκινου χρώματος σε μη επεξεργασμένα κρέατα, είτε για να επιτρέψει την αναπνοή φρέσκων προϊόντων. Όμως, εκτός από την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών η παρουσία του οξυγόνου οδηγεί σε αντιδράσεις οξειδωσης, προάγοντας το σχηματισμό αλδεϋδών, κετονών και καρβοξυλικών οξέων χαμηλού μοριακού βάρους, ιδιαίτερα στα πολύ λιπαρά ψάρια, οι οποίες αλλοιώνουν το τρόφιμο και επομένως η παρουσία του πρέπει να αποφεύγεται (Fellows, 2000).

Το διοξείδιο του άνθρακα έχει υψηλή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη βακτηρίων, κυρίως αερόβιων όπως είναι οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*) και η *Shewanella*, με το μηχανισμό δράσης του να μην είναι πλήρως κατανοητός (Sivertsvik *et al.*, 2002).

Έχει τεκμηριωθεί όμως ότι μόνο η ποσότητα του CO₂ που έχει διεισδύσει στη σάρκα ιχθυηρού αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η επιθυμητή δράση του CO₂ μεγιστοποιείται όταν το προϊόν είναι αποθηκευμένο σε χαμηλές θερμοκρασίες, διότι με αύξηση της θερμοκρασίας η διαλυτότητα του διοξειδίου του άνθρακα στην σάρκα του ιχθυηρού μειώνεται.

Το άζωτο είναι αδρανές αέριο, που παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και στα λιπίδια. Χρησιμοποιείται για την εκτόπιση του οξυγόνου από τη συσκευασία, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του οξειδωτικού ταγγισμού και την αναστολή των αερόβιων μικροοργανισμών του συσκευασμένου προϊόντος (Farber, 1991).

Η σύνθεση των αερίων που χρησιμοποιείται κατά τη συσκευασία υπό συνθήκες MAP, εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε λιπαρά του ιχθύος που θα συσκευαστεί. Ειδικότερα, για ιχθύες με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, έχουν προταθεί μείγματα αερίων σύστασης 40%-60% CO₂, 10%-30% N₂ και 30% O₂, ενώ στους λιπαρούς ιχθύες ένα μείγμα σύστασης 40-60% CO₂ σε ισορροπία με τη σύσταση του N₂, 60-40% N₂ (Heidmann *et al.*, 2003).

Είναι σημαντικό να επισημανθεί, πως η αποτελεσματική χρήση των συνθηκών τροποποιημένης ατμόσφαιρας, απαιτεί πρώτη ύλη με χαμηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο και διασφάλιση της θερμοκρασίας που επιλέγεται. Επιπλέον, προϋποθέτει τη διατήρηση της σύστασης αερίων εντός της συσκευασίας αναλλοίωτη, επομένως η εφαρμογή της συνοδεύεται αναπόφευκτα από τη χρήση υλικών συσκευασίας χαμηλής διαπερατότητας σε αέρια και υγρασία. Στον Πίνακα 8, παρουσιάζεται η επίδραση της συσκευασίας MAP σε σύγκριση με την συσκευασία αέρα, σε διάφορα προϊόντα (Fellows, 2000).

Πίνακας 8: Σύγκριση διάρκειας ζωής διάφορων προϊόντων συσκευασμένα σε αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Fellows, 2000)

	Προϊόν	Διάρκεια ζωής (days)	
		Σε αέρα	Σε MAP
Συντήρηση υπό ψύξη	Βοδινό κρέας	4	9
	Χοιρινό κρέας	4	12
	Κοτόπουλο	6	18
	Ψάρια	2	10
	Παστεριωμένα προϊόντα κρέατος	7	28
	Νωπά προϊόντα κρέατος	3-4	11
	Νωπά ζυμαρικά	2	28
	Νωπή πίτσα	6	21
	Σάντουιτς	2	21
	Ψωμί	7	21

Συντήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	Κέικ	14	180
	Καφές	3	548

Παρότι η σημασία της τεχνολογίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας στην βιομηχανία ιχθυηρών είναι καλά τεκμηριωμένη, με αρκετές μελέτες να αξιολογούν την επίδραση της στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των ψαριών, έχει αναπτυχθεί, μόνο, ένας μικρός αριθμός μαθηματικών μοντέλων προκειμένου να εκφραστεί η συνδυασμένη επίδραση της θερμοκρασίας και της σύστασης της συσκευασίας στην ανάπτυξη αλλοιογόνων βακτηρίων. Παρά τα πλεονεκτήματα του MAP στην επέκταση του χρόνου ζωής των ιχθύων και των προϊόντων τους, η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει το μειονέκτημα πως προκειμένου να παρουσιάσει υψηλή συντηρητική επίδραση, απαιτεί υψηλή αναλογία όγκου αερίου ανά όγκο προϊόντος, επομένως μεγαλύτερη σε όγκο συσκευασία. Ωστόσο η υψηλή συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα, μπορεί να οδηγήσει σε διάλυση του αερίου στη σάρκα του ιχθύος επηρεάζοντας τα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Πέραν, λοιπόν, μόνο της χρήσης τροποποιημένης ατμόσφαιρας, υπάρχουν και αρκετές άλλες τεχνολογίες που προσφέρουν τη δυνατότητα περαιτέρω αύξησης της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής των προϊόντων υπό συνθήκες MAP, οι οποίες επιλύουν τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω για την απλή MAP συσκευασία. Μία από αυτές τις εναλλακτικές είναι η χρήση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα (PAD), οι οποίοι κατατάσσονται στην κατηγορία της ενεργής συσκευασίας και χρησιμοποιούν το οξυγόνο του υπερκείμενου χώρου της συσκευασίας, προς σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα, ενισχύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη συγκέντρωση της συσκευασίας σε μείγμα αερίου CO₂/N₂, χωρίς την πρόσθετη εισαγωγή αερίου (Tsironi *et al.*, 2019).

Η ενεργή συσκευασία αποτελεί μια τεχνολογία, ως απάντηση στις συνεχείς αλλαγές των απαιτήσεων των καταναλωτών, στην οποία αλληλοεπιδρούν τρόφιμα, συσκευασία και περιβάλλον, με αποτέλεσμα την επέκταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων. Η χρήση αυτών των συστημάτων μόνα τους είτε σε συνδυασμό με συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, παρατείνουν την εμπορική ζωή του προϊόντος. Τα συστήματα της ενεργής συσκευασίας ποικίλουν, για παράδειγμα υπάρχουν υλικά δέσμευσης οξυγόνου, με μηχανισμό δράσης βασιζόμενο στην οξείδωση του σιδήρου και αλάτων σιδήρου, που αντιδρούν με το νερό και καθιστούν τη συσκευασία οξειδωτικά σταθερή (Prasad *et al.*, 2014). Αποτελούν ανεξάρτητα συστήματα, όπως για παράδειγμα σακούλες, τα οποία είναι ενσωματωμένα στη συσκευασία αλλά αποτελούν ξεχωριστά στοιχεία. Ένα άλλο είδος συστήματος ενεργής συσκευασίας, αποτελούν τα συστήματα εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα. Το διοξείδιο του άνθρακα, όπως αναφέρθηκε και στην ανάλυση για την τροποποιημένη ατμόσφαιρα, καταστέλλει τη μικροβιακή δράση. Έτσι, μια συμπληρωματική προσέγγιση για τη δέσμευση του οξυγόνου είναι ο εμπλουτισμός μιας συσκευασίας με σύστημα παραγωγής CO₂ ή η προσθήκη του CO₂ σε μορφή φακελίσκου. Δεδομένου, βέβαια, ότι η διαπερατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα

είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη του οξυγόνου, θα πρέπει να παράγεται συνεχώς CO₂ στη συσκευασία προκειμένου να διατηρείται η επιθυμητή συγκέντρωση. Εξαιτίας των αλλοιώσεων στη γεύση που μπορεί να προκαλέσουν τα υψηλά επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα, οι εκπομπές CO₂ βρίσκουν εφαρμογή μόνο σε ορισμένα προϊόντα όπως είναι τα ιχθυηρά, τα φρέσκα κρέατα και πουλερικά και τα τυριά (Prasad *et al.*, 2014). Μερικές ακόμη ενεργές συσκευασίες, είναι τα συστήματα δέσμευσης αιθυλενίου, που χρησιμοποιείται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά και τα συστήματα σταδιακής απελευθέρωσης οσμών.

3.3 Έξυπνη συσκευασία-Χρονοθερμοκρασιακοί ολοκληρωτές TTI

Η ποιότητα και η διάρκεια ζωής ενός τρόφιμου, πέραν των εσωτερικών παραγόντων του ίδιου του τρόφιμου, εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η μηχανική καταπόνηση και άλλες παραμέτρους. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία αποτελεί έναν απρόβλεπτο παράγοντα που συνδέεται στενά με την αλλοίωση του τρόφιμου, και επομένως, είναι καίριας σημασίας η παρακολούθηση του ιστορικού της θερμοκρασίας του προϊόντος, από την παραγωγή έως τη διανομή, και από την αποθήκευση έως την κατανάλωση.

Συνήθως, ο προσδιορισμός του χρόνου ζωής ενός προϊόντος βασίζεται σε παραδοχές, όπως σε μία πιθανή μέση τιμή θερμοκρασίας έκθεσης του προϊόντος είτε στην χειρότερη πιθανή θερμοκρασία έκθεσης αυτού. Αυτές οι παραδοχές, οδηγούν είτε σε υποβαθμισμένης ποιότητας προϊόντα πριν το δηλωμένο χρόνο ζωής τους, σε περίπτωση που το προϊόν εκτεθεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τις αναμενόμενες, είτε στην περίπτωση που ο δηλωμένος χρόνος ζωής έχει προσεγγιστεί συντηρητικά, σε σπατάλη προϊόντων τα οποία απορρίπτονται και έχουν αποδεκτή ποιότητα (Taoukis & Labuza, 1989). Επομένως, για τη διασφάλιση της μικροβιακής ασφάλειας, αλλά και τη μείωση της σπατάλης καταναλώσιμων προϊόντων, απαιτείται συνεχής παρακολούθηση και έλεγχος των συνθηκών αποθήκευσης. Ιδιαίτερα, σε προϊόντα όπως είναι τα ιχθυηρά, όπου ο σημαντικότερος παράγοντας υποβάθμισης της ποιότητας τους είναι η θερμοκρασία. Ένα τέτοιο σύστημα αποτελούν οι έξυπνες συσκευασίες, με τους χρονοθερμοκρασιακούς ολοκληρωτές (Time Temperature Integrators-TTI) να αποτελούν μια συνιστώσα αυτών. Οι TTI μπορούν να παρακολουθούν και να καταγράφουν την αλυσίδα διανομής των τροφίμων, παρουσιάζοντας δυναμικά την υπολειπόμενη διάρκεια ζωής, βασιζόμενοι στις αθροιστικές επιδράσεις τόσο της θερμοκρασίας όσο και του χρόνου αποθήκευσης.

3.3.1 Ορισμός χρονοθερμοκρασιακών δεικτών

Οι χρονοθερμοκρασιακοί ολοκληρωτές ή δείκτες αποτελούν μία απλή, χαμηλού κόστους διάταξη, η οποία δύναται με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, να προσδιορίσει ολόκληρο ή μέρος του θερμοκρασιακού ιστορικού του τρόφιμου, στο οποίο έχει προσαρμοστεί (Taoukis & Labuza, 1989).

3.3.2 Αρχή λειτουργίας TTI

Η αρχή λειτουργίας των χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών βασίζεται σε μία μη αντιστρεπτή μηχανική, χημική, ηλεκτροχημική, ενζυμική ή μικροβιολογική αλλαγή η οποία εκφράζεται ως μια ορατή απόκριση, με τη μορφή μηχανικής παραμόρφωσης, μετακίνησης κάποιας ένδειξης ή ακόμα και με τη χρωματική αλλαγή. Ο ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιείται αυτή η αλλαγή εξαρτάται από το χρόνο και τη θερμοκρασία και αυξάνεται με την αύξηση της. Δηλαδή, η ορατή απόκριση παρουσιάζει μια αθροιστική ένδειξη των συνθηκών αποθήκευσης, στις οποίες εκτέθηκε ο δείκτης TTI (Taoukis, 2001).

3.3.3 Κατηγοριοποίηση των TTI

Έχει προταθεί και μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός δεικτών, βασισμένων σε ένα εύρος φυσικοχημικών αρχών. Ένα πρώτο σύστημα ταξινόμησης, αναγνωρίστηκε από τους Schoen & Byrne (1972), όπου αναθεωρήθηκε από τον δεύτερο, αντιλαμβανόμενος πως η βασική διαφορά στη λειτουργία έγκειται στο αν η ανταπόκριση του δείκτη θα είναι είτε συνεχής είτε βασισμένη σε κάποιο προεπιλεγμένο όριο θερμοκρασίας. Παρόμοιο σύστημα ταξινόμησης, προτάθηκε από τους Singh and Wells, το 1986, όπου αναφερόταν σε δείκτες κακομεταχείρισης, δηλαδή σε έκθεση του προϊόντος σε πολύ υψηλή θερμοκρασία. Ενώ η πιο πρόσφατη κατηγοριοποίηση, προτάθηκε από τους Taoukis and Labuza (2003), η οποία κατατάσσει τους δείκτες σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες είναι οι εξής:

Δείκτες κρίσιμης θερμοκρασίας (Critical Temperature Indicators-CTI)

Οι δείκτες αυτοί δίνουν απόκριση άνω ή κάτω μίας συγκεκριμένης θερμοκρασίας αναφοράς. Δεν προσδιορίζουν το ιστορικό έκθεσης σε σχέση με την θερμοκρασία αναφοράς αλλά δίνουν την πληροφορία πως το τρόφιμο εκτέθηκε σε ακατάλληλη θερμοκρασία για ικανό χρονικό διάστημα ώστε να προκληθεί κρίσιμη μεταβολή για την ασφάλεια και την ποιότητα του. Αποτελούν προειδοποίηση σε περίπτωση ασυνέχειας στο ρυθμό αντιδράσεων, όπως στην ανάπτυξη κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού.

Ολοκληρωτές κρίσιμης θερμοκρασίας/χρόνου (Critical Temperature/Time Integrators-CTTI)

Η απόκριση αυτών των δεικτών αντικατοπτρίζει την αθροιστική έκθεση πέραν των ορίων της θερμοκρασίας αναφοράς. Η απόκριση αυτή, δύναται να μεταφραστεί σε ισοδύναμο χρόνο έκθεσης στην κρίσιμη θερμοκρασία. Είναι χρήσιμοι για την ενημέρωση ύπαρξης προβλημάτων στην αλυσίδα διακίνησης προϊόντων, είτε της έκθεσης του προϊόντος σε κρίσιμη, για την ποιότητα του, θερμοκρασία.

Χρονοθερμοκρασιακοί ολοκληρωτές ή δείκτες (Time Temperature Integrators-TTI)

Οι δείκτες αυτοί, δίνουν μια συνεχή απόκριση, η οποία εξαρτάται από το θερμοκρασιακό ιστορικό του προϊόντος. Ολοκληρώνουν, σε μία μέτρηση, το συνολικό χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του προϊόντος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να δείξουν μια μέση θερμοκρασία διακίνησης του. Επιπλέον, μπορούν να συσχετιστούν με αντιδράσεις υποβάθμισης της ποιότητας των προϊόντων, οι οποίες είναι εξαρτώμενες της θερμοκρασίας.

Οι τελευταίοι δείκτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και με βάση την αρχή λειτουργίας τους σε φυσικά, ενζυμικά και βιολογικά συστήματα. Τα συστήματα χρονοθερμοκρασιακών δεικτών παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3.3.4.

3.3.4 Σύγχρονα συστήματα TTI

Εδώ και πολλά χρόνια γίνονται επιστημονικές και βιομηχανικές δοκιμές, για την ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων συστημάτων χρονοθερμοκρασιακών δεικτών που ικανοποιούν τις προδιαγραφές ενός επιτυχημένου δείκτη TTI. Οι δείκτες που έχουν εξελιχθεί έως σήμερα ως εμπορικά διαθέσιμοι δείκτες TTI παρουσιάζονται παρακάτω (Ταουκίς & Λαβούζα, 2003).

3.3.4.1 Δείκτες διάχυσης

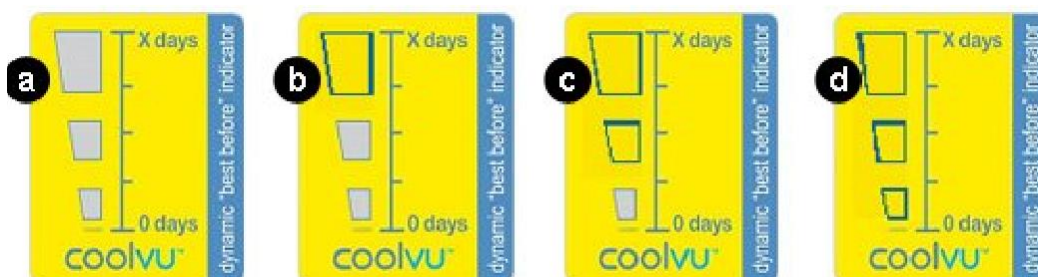
Οι δείκτες διάχυσης (Εικόνα 10) έχουν ως αρχή λειτουργίας τη διάχυση ιξωδοελαστικού υλικού σε μια φωτοαντανακλαστική πορώδη μήτρα, με ρυθμό εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία. Αυτή η αντίδραση οδηγεί σε μια εξελισσόμενη μεταβολή στη διαπερατότητα του φωτός μέσα από την πορώδη μήτρα. Μια από τις πρώτες αξιοσημείωτες χρήσεις αυτού του τύπου δεικτών, ήταν από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας για την παρακολούθηση αποστολών εμβολίων υπό ψύξη.



Εικόνα 10: Μεταβολή απόκρισης δείκτη διάχυσης Monitor Mark™

3.3.4.2 Χημικοί δείκτες

Η αρχή λειτουργίας τους είναι μια φυσικοχημική αντίδραση και ενεργοποιούνται όταν έρχονται σε επαφή με την ετικέτα ενεργοποίησης τους. Η οπτική μεταβολή είναι ο αποχρωματισμός του δείκτη (Εικόνα 11).



7: CoolVu labels, a - freshly activated label, b - early mid-life label, c - late mid-life lab

Εικόνα 11: Αποχρωματισμός του δείκτη διάχυσης CoolVu

3.3.4.2 Φωτοχημικοί δείκτες

Αρχή λειτουργίας τους αποτελεί μια φωτοχημική αντίδραση. Ο δείκτης (Εικόνα 12) ενεργοποιείται σε υπεριώδη ακτινοβολία, και η οπτική απόκριση είναι ο σταδιακός αποχρωματισμός, από το αρχικό σκούρο μπλε χρώμα, του δείκτη. Ο ρυθμός με τον

οποίο συμβαίνει η μεταβολή εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το χρόνο και την ένταση της ακτινοβολίας στην οποία εκτίθενται (Wang *et al.*, 2018).



Εικόνα 12: Οπτική μεταβολή αποχρωματισμού φωτοχημικού δείκτη Onnu™

3.3.4.3 Πολυμερικοί δείκτες

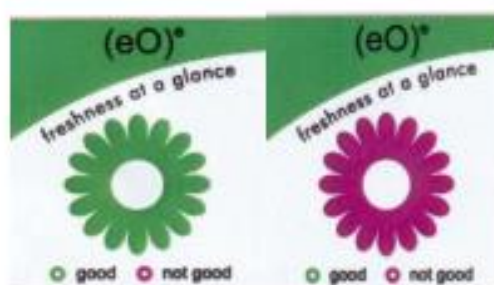
Αποτελεί τον παλαιότερο τύπο ΤΤΙ (Εικόνα 13) και η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται σε μια αντίδραση πολυμερισμού, η οποία λαμβάνει χώρα σε στερεά κατάσταση ενός μονομερούς και ο ρυθμός αυτής της αντίδρασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η οπτική απόκριση αποτελεί μια μεταβολή του δείκτη προς σκούρο χρώμα.



Εικόνα 13: Μεταβολή απόκρισης του πολυμερικού δείκτη Fresh-Check®

3.3.4.4 Μικροβιολογικοί δείκτες

Η αρχή λειτουργίας των μικροβιολογικών δεικτών έγκειται στην αλλαγή του pH, στη μείωση συγκεκριμένα, λόγω ανάπτυξης γαλακτικών βακτηρίων. Η οπτική απόκριση είναι μια αλλαγή από πράσινο σε φούξια χρώμα, ή ο αποχρωματισμός τους (Εικόνα 14).

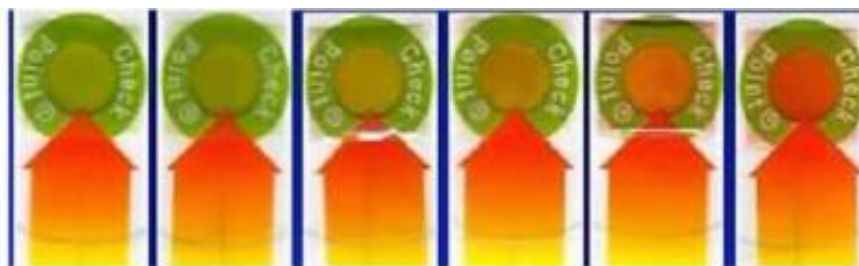


Εικόνα 14: Μεταβολή απόκρισης μικροβιολογικού δείκτη

3.3.4.5 Ενζυμικοί δείκτες

Η αρχή λειτουργίας των ενζυμικών δεικτών είναι η χρωματική αλλαγή, ως το αποτέλεσμα μείωσης του pH, λόγω ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός λιπαρού

υποστρώματος. Πριν την ενεργοποίηση του δείκτη, το ένζυμο και το λιπαρό υπόστρωμα βρίσκονται σε δύο ξεχωριστούς θαλαμίσκους. Κατά την ενεργοποίηση, το φράγμα που χωρίζει τους θαλάμους σπάει με επιβολή μηχανικής πίεσης και το υπόστρωμα με το ένζυμο αναμιγνύονται. Η υδρόλυση αυτή προκαλεί μεταβολή του pH, η οποία μεταφράζεται με σταδιακή χρωματική μεταβολή από πράσινο σε κίτρινο χρώμα, στους δίχρωμους δείκτες, ή από πράσινο σε κίτρινο/πορτοκαλί και τελικά σε κόκκινο, στους τρίχρωμους δείκτες.



Εικόνα 15: Μεταβολή απόκρισης τρίχρωμου ενζυμικού δείκτη Vitsab

Το αρχικό και τελικό χρώμα αναφοράς βρίσκονται εκτυπωμένα στη συσκευασία, για ευκολία στην αναγνώριση και εκτίμηση της μεταβολής του χρώματος. Η συνεχής αυτή μεταβολή, μπορεί να μετρηθεί και ενόργανα (Ταουκίς & Labuza, 1989).

Οι ενζυμικοί δείκτες ΤΤΙ, πέραν της ταξινόμησης με βάση τη χρωματική αλλαγή, μπορούν τα ταξινομηθούν με βάση το είδος ενζύμου-υποστρώματος και την αναλογία συγκέντρωσης ενζύμου-υποστρώματος. Στον Πίνακα 9 και 10, παρουσιάζονται τα είδη των ενζυμικών δεικτών βάσει του περιεχόμενου ενζύμου-υποστρώματος, και την αναλογία ενζύμου-υποστρώματος, αντίστοιχα.

Πίνακας 9: Είδη ενζυμικών δεικτών Vitsab ΤΤΙ με βάση το περιεχόμενο ενζύμου-υποστρώματος

Τύπος δείκτη	Ένζυμο	Υπόστρωμα
L	Λιπάση <i>Rhizopus oryzae</i>	Τριλαουρίνη
P	Λιπάση <i>Rhizopus oryzae</i>	Τριπαλμιτίνη
B	Λιπάση <i>Rhizopus oryzae</i>	Τριβουτυρίνη
C	Λιπάση <i>Rhizopus oryzae</i>	Τρικαπροΐνη
M	Λιπάση <i>Rhizopus oryzae</i>	Μυριστικός μεθυλεστέρας
LP	Λιπάση <i>Rhizopus oryzae</i>	Μίγμα τριλαουρίνης τριπαλμιτίνης
LM	Λιπάση <i>Rhizopus oryzae</i>	Μίγμα τριλαουρίνης μυριστικού μεθυλεστέρα

Πίνακας 10: Είδη ενζυμικών δεικτών Vitsab ΤΤΙ με βάση την αναλογία συγκέντρωσης ενζύμου-υποστρώματος

Τύπος δείκτη	Θερμοκρασία	Διάρκεια ζωής
--------------	-------------	---------------

M4-30	4 °C	30 ημέρες
M4-5	4 °C	5 ημέρες
L5-24	5 °C	24 ημέρες
L5-8	5 °C	8 ημέρες
LM10-2	10 °C	2 ημέρες

Με αυτή την κατηγορία ενζυμικών δεικτών ασχολείται η παρούσα διπλωματική εργασία, και συγκεκριμένα με τους τριχρωμους ενζυμικούς δείκτες τύπου M, με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα.

3.3.5 Αντιστοίχιση απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών με την ποιότητα των τροφίμων

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες ένδειξης της διάρκειας ζωής ενός τρόφιμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένοι, με ευκολία στην ανάγνωση τους από τον καταναλωτή. Προκειμένου, να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ένα σύστημα βασισμένο στους δείκτες ΤΠΙ, χρειάζονται μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν την επίδραση της θερμοκρασίας στην εξέλιξη της αλλοίωσης υπό δυναμικές συνθήκες αποθήκευσης. Επιπλέον, απαιτείται κινητική μελέτη και της απόκρισης των δεικτών ΤΠΙ. Με βάση αξιόπιστα μοντέλα του χρόνου ζωής και της κινητικής τόσο του μελετώμενου προϊόντος όσο και της απόκρισης του δείκτη, η επίδραση της θερμοκρασίας μπορεί να παρακολουθηθεί και να μεταφραστεί ποσοτικά στην ποιότητα των τροφίμων, από το σημείο παραγωγής έως και το σημείο κατανάλωσης (Taoukis & Labuza, 2003).

Τέτοιες μελέτες συσχέτισης δεικτών ΤΠΙ έχουν πραγματοποιηθεί για ορισμένα προϊόντα, σε διαφορετικές θερμοκρασίες προκειμένου να σχεδιαστεί η απόκριση του δείκτη σε συνάρτηση με το χρόνο και τις τιμές των επιλεγμένων ποιοτικών παραμέτρων του μελετώμενου προϊόντος. Μερικά από τα προϊόντα που έχουν μελετηθεί είναι,

- Παγωτό (Dolan *et al.*, 1985)
- Κατεψυγμένα φιλέτα μπακαλιάρου (Tinker *et al.*, 1985)
- Παστεριωμένο πλήρες γάλα (Mistry & Kosikowski, 1983, Grisius *et al.*, 1987, Chen & Zall, 1987)
- Έτοιμες σαλάτες υπό ψύξη (Cambell, 1986)
- Κατεψυγμένος φρέσκος σολομός (Ronnow *et al.*, 1999)
- Κατεψυγμένος τόνος συσκευασμένος υπό κενό (Tsironi *et al.*, 2008)
- Φιλέτο τσιπούρας συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Tsironi *et al.*, 2011)
- Κατεψυγμένος γλαυκοκαρχαρίας και θράψαλο Ν.Ζηλανδίας (Giannoglou *et al.*, 2014)

- Καπνιστό χέλι και πέστροφα συσκευασμένα υπό κενό (Giannoglou *et al.*, 2019)

3.3.6 Πλεονεκτήματα και προβλήματα στη χρήση δεικτών ΤΤΙ

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αλυσίδα εφοδιασμού, ιδιαίτερα για τη βιομηχανία ευαλλοίωτων προϊόντων, από την παραγωγή και τη συσκευασία μέχρι και την αγορά από τον καταναλωτή. Είναι ικανοί να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες τόσο στον καταναλωτή για την ποιότητα του προϊόντος που επιλέγει, όσο και στους σχετιζόμενους με την ίδια την αλυσίδα εφοδιασμού για τυχόν σημεία στα οποία δεν τηρούνται οι κατάλληλες συνθήκες. Πλεονεκτούν δηλαδή, όσον αφορά την ικανοποίηση των αυξανόμενων απαιτήσεων των καταναλωτών ως προς την ποιότητα των προϊόντων επιλογής τους, αλλά και όσον αφορά την εξασφάλιση της ορθής διακίνησης τους και τη μείωση στις σπατάλες καταναλώσιμων προϊόντων.

Παρόλα αυτά, παραμένουν αρκετοί περιορισμοί όπως η ανακρίβεια στην παρακολούθηση της θερμοκρασίας και το υψηλό κόστος στην εμπορική εφαρμογή των δεικτών αλλά και πιθανά προβλήματα που αφορούν την ασφάλεια του τρόφιμου. Αναλυτικότερα, οι δείκτες περιέχουν οργανικές ή ανόργανες ενώσεις που μπορεί να είναι τοξικές και γενικά, λόγω της στενής τους επαφής με τις συσκευασίες τροφίμων, οι ενώσεις αυτές μπορεί να μεταναστεύσουν στα τρόφιμα, μολύνοντας τα κατά τη διαδικασία διανομής. Επιπλέον, λόγω της ποικιλομορφίας και της πολυπλοκότητας του περιβάλλοντος, τα μαθηματικά μοντέλα που αναπτύσσονται και χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής στερούνται καθολικότητας στην εφαρμογή, με αποτέλεσμα το κόστος πρόβλεψης για την εφαρμογή των δεικτών να είναι μεγάλο. Ακόμη, ανησυχία αποτελεί και το γεγονός πως οι δείκτες παρακολουθούν τη θερμοκρασία της εξωτερικής συσκευασίας έναντι της πραγματικής θερμοκρασίας του τρόφιμου. Τέλος, το κόστος της εμπορικής εφαρμογής του ΤΤΙ θα πρέπει να μειωθεί, δεδομένου ότι χρησιμοποιείται σε συσκευασίες τροφίμων. Η μείωση βέβαια του κόστους θα επιτευχθεί μέσω αύξησης της ζήτησης των δεικτών ΤΤΙ, που θα επέλθει από τη διευθέτηση των υπόλοιπων περιορισμών. Επομένως, υπάρχει περιθώριο βελτίωσης, προκειμένου οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες να αποτελέσουν εμπορικά διαθέσιμα και αξιόπιστα προϊόντα.

Κεφάλαιο 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Εισαγωγή

Μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης που αναλύθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, γίνεται σαφές ότι η παρακολούθηση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων κατά την αποθήκευση είναι επιτακτική ανάγκη. Ιδιαίτερα, των εξαιρετικά ευαλλοίωτων τροφίμων, όπως είναι τα ιχθυηρά, που αποτελούν το επιλεγμένο θέμα μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ο κύριος παράγοντας αλλοίωσης του ιχθυηρού είναι η θερμοκρασία, όπως έχει αναλυθεί, επομένως είναι ουσιαστικής σημασίας η παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού προφίλ στο οποίο εκτίθενται κατά τη διακίνηση και αποθήκευση τους. Ένα κατάλληλο εργαλείο για αυτόν τον σκοπό είναι οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες (ΤΤΙ), οι οποίοι ολοκληρώνουν το θερμοκρασιακό προφίλ στο οποίο έχει εκτεθεί το τρόφιμο σε μία μέτρηση, που μεταφράζεται από μια ευκρινή χρωματική αλλαγή. Πέραν της θερμοκρασίας, εξίσου μεγάλης σημασίας είναι και οι συνθήκες συσκευασίας στις οποίες αποθηκεύεται το προϊόν. Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 3.2, οι συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στις συσκευασίες των ιχθυηρών, αλλά και σε μεγάλο βαθμό η χρήση της ενεργής συσκευασίας (εκπομπών CO₂), μπορούν να συμβάλλουν στην επέκταση του χρόνου ζωής του και στη διατήρηση της φρεσκότητας του προϊόντος, έναντι άλλων συνθηκών συσκευασίας.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της κινητικής της αλλοίωσης φιλέτων και απεντερωμένων λαβρακιών συσκευασμένων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και η μελέτη της επίδρασης της ενεργής συσκευασίας στην επιβράδυνση των φαινομένων αλλοίωσης και την επέκταση του χρόνου ζωής. Σε αυτό το πλαίσιο μελετώνται σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης η μικροβιακή ανάπτυξη των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών των ιχθυηρών και άλλοι ποιοτικοί φυσικοχημικοί δείκτες.

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορά τη μελέτη της κινητικής απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΤΙ κατάλληλου συνδυασμού ενζύμου-υποστρώματος σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες. Από την κινητική μελέτη της απόκρισης των ΤΤΙ και της ποιοτικής υποβάθμισης των ιχθυηρών μπορεί να επιλεγεί ο κατάλληλος δείκτης για το κάθε επιλεγμένο προς μελέτη τρόφιμο, τόσο για το φιλέτο όσο και για ολόκληρο απεντερωμένο λαβράκι, με απώτερο στόχο την παρακολούθηση της ασφάλειας του λαβρακιού (φιλέτο, ολόκληρο) στην ψυκτική αλυσίδα.

Η επιλογή του κατάλληλου δείκτη ΤΤΙ για κάθε τρόφιμο επαληθεύεται σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες οι οποίες προσομοιάζουν τις

πραγματικές θερμοκρασιακές συνθήκες στις οποίες εκτίθεται ένα τρόφιμο ιχθυηρών κατά μήκος της ψυκτικής του αλυσίδας.

4.2 Πειραματικός Σχεδιασμός

Όπως αναφέρθηκε, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η συσχέτιση της κινητικής απόκρισης διαφόρων ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών με την κινητική μελέτη αλλοίωσης διαφορετικά συσκευασμένων (με και χωρίς τη χρήση εκπομπών CO₂) λαβρακιών.

Το πρώτο μέρος της εργασίας, αφορά την κινητική μελέτη ολόκληρου απεντερωμένου, αποβραγχιωμένου κι απολεπισμένου λαβρακιού καθώς και φιλέτου λαβρακιού, σε ένα πλήθος θερμοκρασιών αποθήκευσης και συνθηκών συσκευασίας (σε αέρα ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα, με ή χωρίς τη χρήση εκπομπών CO₂).

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, επομένως, μελετήθηκε ένα ευρύ φάσμα ενεργότητας του ενζύμου λιπάση από *Rhizopus oryzae* για το είδος M του ενζυμικού δείκτη ΤΠΙ, σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών αποθήκευσης, λαμβάνοντας ανά ημέρα, ή σε κάποιες περιπτώσεις ανά κάποιες ώρες, μέτρηση της χρωματικής μεταβολής των δεικτών.

Τα αποτελέσματα αυτά συνδυάστηκαν με τα αποτελέσματα της μελέτης των ΤΠΙ κι επιλέχθηκαν συγκεκριμένης συγκέντρωσης δείκτες τύπου M τόσο για το φιλέτο όσο και για το ολόκληρο λαβράκι συσκευασμένα σε απλή συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας και σε ενεργή συσκευασία. Οι θερμοκρασίες αποθήκευσης που επιλέχθηκαν για την εξαγωγή των κινητικών μοντέλων ήταν τέσσερις ισοθερμοκρασιακές (0, 2.5, 5, 10°C) αλλά και μια μεταβαλλόμενη χρονοθερμοκρασιακά συνθήκη με μέση δραστική θερμοκρασία αποθήκευσης $T_{eff}=4.8^{\circ}C$. Η μεταβαλλόμενη συνθήκη επιλέχθηκε προκειμένου να επαληθευτεί η αξιοπιστία των επιλεγμένων δεικτών ΤΠΙ. Όσον αφορά τις συνθήκες αποθήκευσης, όλα τα δείγματα βρίσκονταν σε σφραγισμένες συσκευασίες, σε συνθήκες είτε αέρα, είτε τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP), είτε τροποποιημένης ατμόσφαιρας με τη χρήση διαφορετικών διαστάσεων επιθεμάτων εκπομπής CO₂ (CO₂ emitters, αναφερόμενα στο εξής, στην παρούσα εργασία ως PADs). Για το ολόκληρο λαβράκι εξετάστηκαν 2 διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα PADs, ενώ στην περίπτωση του φιλέτου μελετήθηκε 1 PAD. Στα δείγματα μελετήθηκε ο προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης του μικροβιακού φορτίου (ολική μικροβιακή χλωρίδα, γαλακτικά βακτήρια, ψευδομονάδες, εντεροβακτήρια, *Shewanella*) καθώς και η μεταβολή της σύστασης των αερίων, της υφής, του χρώματος, του pH και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων.

4.3 Πειραματική Διαδικασία

4.3.1 Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTIs

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι ενζυμικού τύπου οι οποίοι βασίζονται στην αντίδραση ενζύμου - λιπαρού υποστρώματος. Η συγκεκριμένη αντίδραση οδηγεί σε σταδιακή ενζυμική υδρόλυση του λιπαρού υποστρώματος η οποία οδηγεί σε μείωση του pH δίνοντας οπτική χρωματική αλλαγή. Το χρώμα μεταβάλλεται σταδιακά από πράσινο σε κίτρινο-πορτοκαλί και τελικά σε κόκκινο με ρυθμό ο οποίος εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το ένζυμο, το υπόστρωμα και τις συγκεντρώσεις τους. Μελετήθηκαν οι δείκτες τύπου M (δείκτης FreshTag®, VITSAB, Malmo, Sweden) που περιλαμβάνουν ως ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και ως υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε ένα ευρύ φάσμα ενεργότητας ενζύμου για το συγκεκριμένο είδος ενζυμικού δείκτη (M-15u, M-20u, M-25u, M-50u, M-75u, M-100u). Ως μονάδα ενεργότητας (unit) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει τριγλυκερίδια για την παραγωγή 1 μmol λιπαρών οξέων ανά min σε pH=7.2 και σε θερμοκρασία 37°C.

Στο πειραματικό μέρος, τοποθετήθηκαν σε γυάλινη επιφάνεια πέντε επαναληπτικοί δείκτες TTI, δηλαδή ιδίου τύπου δείκτες, οι οποίοι ενεργοποιήθηκαν μέσω σπασίματος του φράγματος που διαχωρίζει το ένζυμο από το υπόστρωμα κι έγινε ανάμειξη τους ώστε να ξεκινήσει η ενζυμική υδρόλυση. Κατόπιν της ενεργοποίησης των δεικτών, λαμβανόταν η πρώτη μέτρηση του χρώματος (αντιστοιχεί σε t=0), μέσω του χρωματομετρου X-rite-Eye-one (Εικόνα 16), και στη συνέχεια αποθηκεύονταν ισοθερμοκρασιακά σε θαλάμους ελεγχόμενου ισοθερμοκρασιακού περιβάλλοντος (SANYO MIR 253) μαζί με ηλεκτρονικά καταγραφικά θερμοκρασίας (COX TRACER, Belmont, NC), για τον έλεγχο και την καταγραφή της θερμοκρασίας των θαλάμων σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Το σύνολο των δειγμάτων, τοποθετήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες, 0, 2.5, 5 και 10°C. Συγκεκριμένα, στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται αναλυτικά οι θερμοκρασίες στις οποίες αποθηκεύτηκε κάθε διαφορετικός τύπος ενζυμικού δείκτη.

Πίνακας 11: Εύρος ενζυμικών δεικτών και θερμοκρασίες αποθήκευσης.

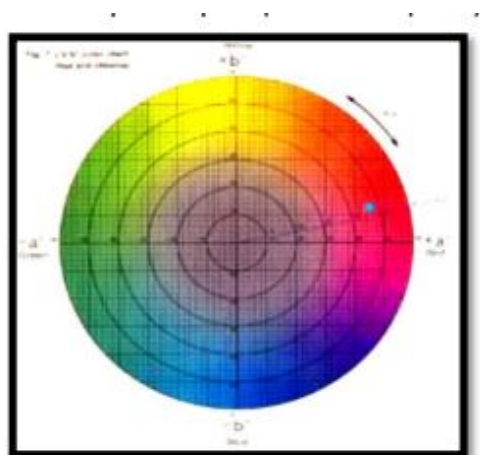
Δείκτης	Θερμοκρασία (°C)			
M15		2,5	5	10
M20		2,5	5	10
M25	0	2,5	5	10
M50	0	2,5	5	10
M75	0	2,5	5	10
M100	0	2,5	5	10

Η συχνότητα της δειγματοληψίας καθορίζεται από τη διάρκεια ζωής του δείκτη, η οποία κυμαίνεται, αναλόγως τη θερμοκρασία αποθήκευσης και την ενεργότητα του ενζύμου, από μερικές ώρες έως και μέρες. Οι μετρήσεις γίνονται τοποθετώντας τη γυάλινη πλάκα σε μια λευκή επιφάνεια, προκειμένου να μην επηρεαστούν οι μετρήσεις από τον περιβάλλοντα χώρο.



Εικόνα 16: Χρωματόμετρο X-rite Eye-one pro.

Το χρωματόμετρο *X-rite Eye-one pro* (X-rite Eye-one pro Colorimeter Illumination D50, Michigan USA) (Εικόνα 16) που χρησιμοποιήθηκε, προσδιορίζει τις παραμέτρους L, a και b στο σύστημα CIE Lab. Η παράμετρος a λαμβάνει τιμές από -60 έως 60, με τις αρνητικές τιμές να προσδιορίζουν το πράσινο χρώμα ενώ οι θετικές το κόκκινο χρώμα. Η παράμετρος b, με την ίδια διακύμανση στις τιμές, όταν λαμβάνει αρνητικές τιμές προσδιορίζει το μπλε χρώμα ενώ με τις θετικές το κίτρινο χρώμα. Τέλος, το L κυμαίνεται από 0 έως 100 και προσδιορίζει τη φωτεινότητα του δείγματος. Από τις μετρήσεις των παραμέτρων του χρώματος, υπολογίζεται η απόκριση των ΤΠΙ μέσω του $\rho_{TM}(a+b)$ συναρτήσεως του χρόνου και στη συνέχεια προσδιορίζονται οι κινητικές παράμετροι όπως θα αναλυθεί στην παράγραφο 4.5.1.



Εικόνα 17: Χρωματικό διάγραμμα L,a,b.

Τα καταγραφικά θερμοκρασίας *COX TRACER* (Εικόνα 18) που χρησιμοποιήθηκαν, είναι συσκευές ασύρματες κι αποσπώμενες, οι οποίες τοποθετούνται οπουδήποτε και καταγράφουν κι αποθηκεύουν τη θερμοκρασία του χώρου. Μέσω κατάλληλου

προγράμματος σε υπολογιστή, μπορούν ευκόλως να εξαχθούν τα αποθηκευμένα δεδομένα, καθώς και να γίνει ρύθμιση των καταγραφικών.



Εικόνα 18: Καταγραφικό θερμοκρασίας (COX TRACER, Belmont, NC).

4.3.2 Παραλαβή και αποθήκευση δειγμάτων ιχθυηρού

Δείγματα λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) ιχθυοκαλλιέργειας αλιεύθηκαν προερχόμενα από την εταιρεία Angramar A.E (Αθήνα, Ελλάδα). Στη συνέχεια, για την περίπτωση του ολόκληρου λαβρακιού, ακολουθήθηκε η διαδικασία της απολέπισης, απεντέρωσης και αποβραγχίωσης, ενώ για τα φιλέτα ακολουθήθηκε επιπλέον η διαδικασία της φιλετοποίησης στις εγκαταστάσεις της εταιρείας. Έτσι, προέκυψαν τα δύο διαφορετικά είδη προϊόντων ιχθύων που μελετήθηκαν, δηλαδή ολόκληρο λαβράκι της κατηγορίας 400-600 g και φιλέτο λαβρακιού (νωπό ιχθ/γειας φιλέτο, F-cut χωρίς κόκκαλα) της κατηγορίας 70-90 g. Στη συνέχεια, τα δείγματα συσκευάστηκαν και σφραγίστηκαν από την εταιρεία συσκευασίας ιχθυηρών SELECTFISH A.E (Αθήνα, Ελλάδα) και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., εντός 24-48 ωρών από την αλίευση τους. Στην περίπτωση του ολόκληρου λαβρακιού, τα δείγματα συσκευάστηκαν σε συνθήκες αέρα (AIR) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Package-MAP) με αρχική αέρια σύσταση 20% O₂-20% CO₂-60% N₂, όπου είναι η σύσταση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε εμπορικά διαθέσιμα συσκευασμένα προϊόντα ιχθυηρών. Στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, μερικά από τα δείγματα συσκευάστηκαν με τη χρήση δύο διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων εκπομπών CO₂ (PADs) (McAirlaid's, VLIESTOFFE GMBH & CO, Germany), με κωδικοποίηση ως PAD1 (XC0100-300-9025510-33, Διαστάσεις 90x255 mm, Όγκος εκλυόμενου CO₂: 300 mL) είτε ως PAD2 (XC0180-550-12030010-33, Διαστάσεις 120x300 mm, Όγκος εκλυόμενου CO₂: 550 mL). Στην περίπτωση των φιλέτων, αυτά συσκευάστηκαν μόνο σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με αρχική αέρια σύσταση 60% CO₂-40% αέρα ενώ στα φιλέτα χρησιμοποιήθηκαν εκπομπές CO₂ με κωδικοποίηση PAD3 (XC035-120-8013010-33, Διαστάσεις 80x130 mm, Όγκος εκλυόμενου CO₂: 120 mL). Η αρχή λειτουργίας των PADs, βασίζεται στην απορρόφηση από αυτά της υγρασίας του τρόφιμου εντός της συσκευασίας, η οποία αντιδρά με τα συστατικά του PAD (όπως

για παράδειγμα κιτρικό οξύ και διττανθρακικό νάτριο) προς έκλυση διοξειδίου του άνθρακα.

Κατόπιν της παραλαβής των δειγμάτων (ολόκληρο και φιλέτο λαβράκι) στο εργαστήριο, διαμοιράστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε θαλάμους ψύξης είτε σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες στους 0, 2.5, 5 και 10°C είτε μεταβαλλόμενες χρονοθερμοκρασιακά συνθήκες, και συγκεκριμένα,

- 10 ώρες στους 2,5°C
- 5 ώρες στους 6°C
- και 1 ώρα στους 10°C

Η θερμοκρασία των θαλάμων ελεγχόταν μέσω των καταγραφικών θερμοκρασίας, τα οποία αναφέρθηκαν παραπάνω στην Ενότητα 4.3.1, που είχαν τοποθετηθεί εντός του κάθε θαλάμου ψύξης.

Η κάθε συσκευασία περιέχει 2 δείγματα λαβρακιού, προκειμένου να υπάρχει επαναληψιμότητα των φυσικοχημικών μετρήσεων. Στην Εικόνα 19 και Εικόνα 20, απεικονίζονται συσκευασμένα ολόκληρα λαβράκια, προτού γίνει δειγματοληψία, σε συνθήκες αέρα και MAP, και σε συνθήκες MAP με χρήση του PAD1 και PAD2, αντίστοιχα.



Εικόνα 19: Συσκευασμένο ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες αέρα και τροποποιημένης ατμόσφαιρας.



Εικόνα 20: Συσσκευασμένο ολόκληρο λαβράκι σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση PADs.

Αντίστοιχα, στην Εικόνα 21, απεικονίζονται φιλέτα λαβρακιού, συσκευασμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με τη χρήση PAD3.



Εικόνα 21: Συσσκευασμένο φιλέτο λαβρακιού σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

4.4 Αναλυτικές μέθοδοι

4.4.1 Μικροβιακή ανάλυση

Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα λαβρακιού (φιλέτο και ολόκληρο) ακολουθεί τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και της ανάπτυξης σε τρυβλία. Αυτή απαρτίζεται από μια σειρά σταδίων τα οποία περιλαμβάνουν την αποστείρωση των υλικών και του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται, τη δειγματοληψία, την προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων, τον εμβολιασμό των τρυβλίων και τέλος την καταμέτρηση των αποικιών ύστερα από επώαση τους, τα οποία θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω. Στην παρούσα εργασία οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν είναι,

- ❖ Η **ολική μικροβιακή χλωρίδα** (Total Viable Counts, TVC), σε υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA, Biolife, Italy)
- ❖ Οι **ψευδομονάδες** (*Pseudomonas* spp.), σε επιλεκτικό υπόστρωμα Cetrimide Agar (CFC, Merck, Germany)
- ❖ Τα **εντεροβακτήρια** (*Enterobacteriaceae* spp.), σε επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Biolife, Italy)
- ❖ Τα **βακτήρια που παράγουν υδρόθειο H₂S** (π.χ. *Shewanella putrefaciens*), σε επιλεκτικό υπόστρωμα Lyngby Iron Agar (IA, Condalab, Ισπανία)
- ❖ Τα **γαλακτικά βακτήρια** (*Lactobacillus* spp.), σε επιλεκτικό υπόστρωμα MRS De Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRS, Merck, Germany)

4.4.1.1 Αποστείρωση εξοπλισμού και υλικών

Πριν από κάθε μικροβιολογική ανάλυση, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελούσε η αποστείρωση των εργαλείων, του χώρου εργασίας και των υλικών που χρησιμοποιούνταν. Επομένως, τοποθετούνταν σε κλίβανο αποστείρωσης, τα υποστρώματα για τους αερόβιους και αναερόβιους μικροοργανισμούς, ο αραιωτικός ορός Ringer ισοτονικού διαλύματος ως προς το κυτταρόπλασμα και βάσεις με tips δύο μεγεθών (1 mL και 100 μL). Εξίαιρεση αποτελεί το υπόστρωμα VRBG, το οποίο αποστειρώνεται μέσω βρασμού.

Η ανάλυση γινόταν σε θάλαμο στρωτής ροής (MN 120, Nuve, Turkey), η οποία μέσω στρωτής ροής φιλτραρισμένου αέρα που διέρχεται από το μπροστινό μέρος, εξασφαλίζει την αποφυγή επιμολύνσεων από το περιβάλλον. Ο χώρος εργασίας απολυμαίνεται με σαπούνι και αιθανόλη, ώστε να διασφαλιστούν οι βέλτιστες δυνατές ασηπτικές συνθήκες.

Η αποστείρωση πραγματοποιούνταν σε αυτόκλειστο της εταιρείας Sanyo (LabAutoclave), ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 121°C για 15 λεπτά. Έπειτα, τα αποστειρωμένα υλικά μεταφέρονταν είτε σε υδατόλουτρο προκειμένου να

παραμένουν σε υψηλή θερμοκρασία (50°C), τοποθετημένο μέσα σε απαγωγό, είτε στο χώρο εργασίας εντός του θαλάμου στρωτής ροής όπου γίνεται η ανάλυση.

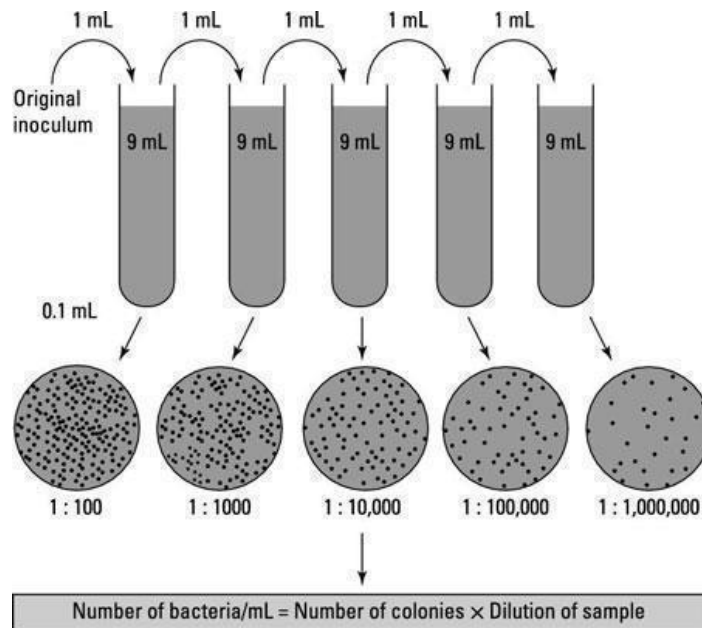
4.4.1.2 Δειγματοληψία

Μετά την αποστείρωση ακολουθεί η δειγματοληψία του λαβρακιού. Το συσκευασμένο λαβράκι άνοιγε εντός του θαλάμου και λαμβανόταν ποσότητα 10 g από την ράχη και την κοιλιά με τη χρήση λαβίδας και μαχαιριού. Το δείγμα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένη σακούλα, στην οποία προστίθενται και 90 g αποστειρωμένου ορού Ringer (1:10 αραιώση δείγματος-ορού) και το μείγμα μεταφερόταν για ομογενοποίηση στη συσκευή Stomacher (Interscience, Italy) για 1 λεπτό. Με αυτόν τον τρόπο το μικροβιακό φορτίου του δείγματος διαχέεται στο υγρό ώστε να καταστεί δυνατή η μέτρηση του εντός τρυβλίων.

4.4.1.3 Προετοιμασία διαδοχικών αραιώσεων

Είναι απαραίτητο να προετοιμαστούν διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού μικροβιακού φορτίου, διότι υπάρχει πιθανότητα η πρώτη αραιώση, που είναι το δείγμα του ψαριού με το ισοτονικό διάλυμα, να μη δίνει αποτέλεσμα αποικιών που να απαριθμούνται. Έτσι, ανάλογα με τις συνθήκες, το χρόνο αποθήκευσης καθώς και τις αναλύσεις των προηγούμενων ημερών, καθορίζεται το πλάνο για τις αραιώσεις της συγκεκριμένης δειγματοληψίας.

Κατά τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες, που περιείχαν 9mL αποστειρωμένου ορού Ringer ο καθένας, για κάθε επιπλέον αραιώση πέραν της πρώτης. Από το ομογενοποιημένο μείγμα της πρώτης αραιώσης λαμβάνεται 1 mL με αποστειρωμένο tip, μεταφέρεται στο δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύεται επαρκώς, ώστε να διαχυθεί στον ορό το μικροβιακό φορτίο. Με αυτό τον τρόπο, προετοιμάστηκε η 2^η αραιώση του δείγματος (10^{-2} , 1:100). Με την ίδια διαδικασία προετοιμάζονται, διαδοχικά, και οι υπόλοιπες αραιώσεις που απαιτεί η δειγματοληψία όπως φαίνεται στην Εικόνα 22.



Εικόνα 22: Μεθοδολογία διαδοχικών αραιώσεων.

4.4.1.4 Επίστρωση και ενσωμάτωση δειγμάτων στα υποστρώματα

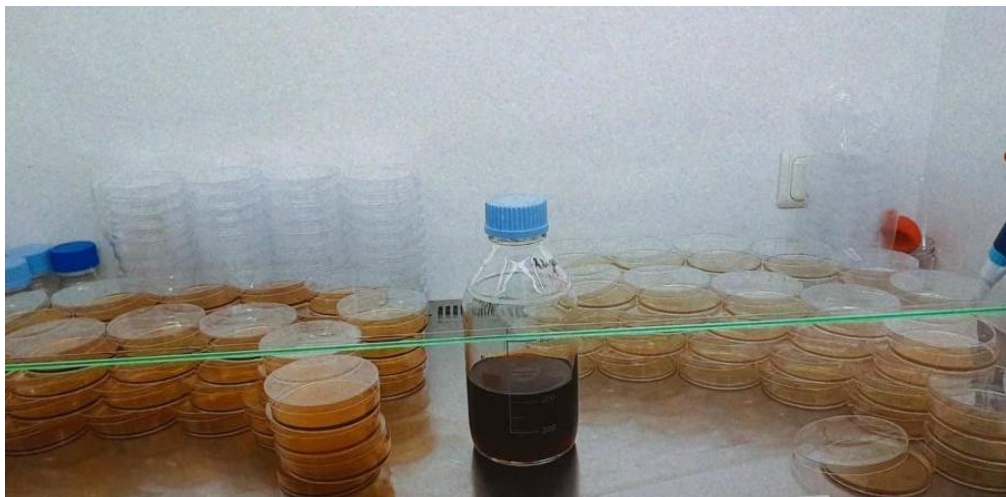
Υπάρχουν δύο διαφορετικές μέθοδοι για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών, ανάλογα με το είδος τους, συγκεκριμένα, υπάρχουν οι καλλιέργειες σε αερόβιες ή σε αναερόβιες συνθήκες.

Η πρώτη περίπτωση, των αερόβιων συνθηκών, καλλιεργείται με τη μέθοδο της επίστρωσης. Ποσότητα περίπου 10 mL του αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού μεταφέρεται σε κενά αποστειρωμένα τρυβλία, αφήνεται να στερεοποιηθεί κι αποθηκεύεται υπό ψύξη για συντήρηση. Έπειτα, κατά τη δειγματοληψία, λαμβάνονται από κάθε αραιώση 100 μL, μέσω των αποστειρωμένων tips, τα οποία μεταφέρονται στο τρυβλίο με το αντίστοιχο στερεοποιημένο υπόστρωμα και απλώνονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια του με τη βοήθεια ελαστικού πολυμερικού ραβδίου με κυκλική απόληξη (στυλεό). Έτσι το μικροβιακό φορτίο, της κάθε αραιώσης, επιστρώνεται στο θρεπτικό υλικό. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται με τη μέθοδο της επίστρωσης είναι η ολική μικροβιακή χλωρίδα και οι ψευδομονάδες.

Οι αναερόβιες συνθήκες, ακολουθούν τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, επομένως, λαμβάνεται από κάθε αραιώση 1 mL δείγματος, το οποίο μεταφέρεται σε κενό αποστειρωμένο τρυβλίο κι ακολουθεί μεταφορά επαρκής ποσότητας από το αντίστοιχο υπόστρωμα, για το οποίο γίνεται η ανάλυση, ώστε να καλύψει την επιφάνεια του τρυβλίου και να αναμιχθεί ομοιογενώς με το δείγμα. Στη συνέχεια, το μείγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί, και αφού γίνει αυτό ακολουθεί δεύτερη επίστρωση με το υπόστρωμα, ώστε να επιτευχθούν οι αναερόβιες συνθήκες. Το υπόστρωμα θα πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία 30-40°C, διότι μεγαλύτερη θερμοκρασία ενέχει τον κίνδυνο να θανατωθούν οι μελετώμενοι μικροοργανισμοί.

Υπό αναερόβιες συνθήκες καλλιεργούνται τα εντεροβακτήρια, η *Shewanella* και τα γαλακτικά βακτήρια (Εικόνα 23).

Συνηθέστερα, μελετώνται 2 ή 3 διαδοχικές αραιώσεις για κάθε δείγμα, ανάλογα με το υπόστρωμα, και η καθεμία εξ αυτών φέρει δύο επαναλήψεις.



Εικόνα 23: Εμβολιασμός τρυβλίων με υπόστρωμα MRS.

4.4.1.5 Επώαση και καταμέτρηση των αποικιών

Μετά τον εμβολιασμό ή την επίστρωση των υποστρωμάτων, οι μικροοργανισμοί αφήνονται να επώασουν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για διαφορετικούς χρόνους ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες επώασης. Το TVC, οι ψευδομονάδες, και η *Shewanella* επώάζονται σε θερμοκρασία 25°C, ενώ το VRBG και το MRS στους 37°C, με χρόνους επώασης για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τα γαλακτικά βακτήρια και τη *Shewanella* τις 72 ώρες, για τις ψευδομονάδες τις 48 ώρες και για τα εντεροβακτήρια 24 ώρες.

Μετά το πέρας, του κατάλληλου χρονικού διαστήματος, καταμετρούνται οι αποικίες σε κατάλληλη αραιώση, τέτοια ώστε να υπάρχουν στο κάθε τρυβλίο 20-200 αποικίες. Κατόπιν, ο αριθμός των αποικιών ανάγεται στην αραιώση 0 και προσδιορίζεται το μικροβιακό φορτίο ανά γραμμάριο δείγματος (logCFU/g).

4.4.2 Μέτρηση αέριας σύστασης

Η μέτρηση της αέριας σύστασης πραγματοποιούνταν σε κάθε συσκευασία, πριν από κάθε δειγματοληψία, με τη συσκευή μέτρησης CheckMate 9900 O₂/CO₂ (PBI Dansensor, Ringsted, Denmark) (Εικόνα 24). Η μέτρηση λαμβανόταν τρυπώντας την εκάστοτε κλειστή συσκευασία μέσω μιας ακίδας, η οποία λαμβάνει το δείγμα για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της σύστασης, προκειμένου να μην επιμολυνθεί το περιβάλλον της συσκευασίας.



Εικόνα 24: Συσκευή μέτρησης αέριας σύστασης, CheckMate 9900 O₂/CO₂, PBI Dansensor.

4.4.3 Μέτρηση pH

Η μέτρηση pH γινόταν κάθε φορά στην πρώτη αραιώση του δείγματος, δηλαδή στο ομογενοποιημένο μείγμα, μετά τη μικροβιολογική ανάλυση ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του δείγματος. Η μέτρηση πραγματοποιούνταν στη συσκευή μέτρησης της Εικόνας 25 (pH meter 338, AMEL Instruments, Milan, Italy), βυθίζοντας στο υγρό δείγμα το γυάλινο ηλεκτρόδιο 12 mm και καταγράφοντας την ένδειξη της τιμής αφού σταθεροποιούνταν. Μετά από κάθε δείγμα, ακολουθούσε έκπλυση του ηλεκτροδίου, προκειμένου να μετρηθεί το επόμενο.



Εικόνα 25: Συσκευή μέτρησης pH, pH meter 338, Amel Instruments.

4.4.4 Μέτρηση υφής

Η ανάλυση υφής για το ολόκληρο και το φιλέτο λαβρακιού, πραγματοποιήθηκε με τον αναλυτή υφής TA.XT2i (Εικόνα 26) (Stable Micro Systems, United Kingdom), ο οποίος συνδεόταν με ηλεκτρονικό υπολογιστή που είχε το κατάλληλο λογισμικό για την απεικόνιση των διαγραμμάτων υφής (Exponent, Stable Micro Systems). Οι μετρήσεις κάθε δείγματος γίνονταν σε δύο διπλανά σημεία κατά μήκος της ράχης,

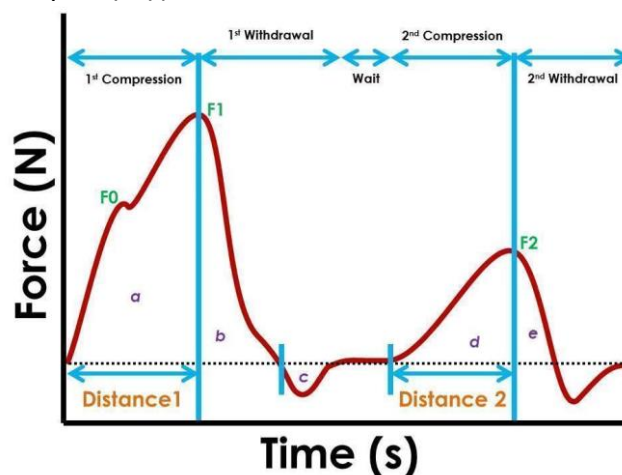
για το ολόκληρο λαβράκι από την πλευρά του δέρματος και για το φιλέτο από την εσωτερική πλευρά της σάρκας. Ο αναλυτής ήταν ρυθμισμένος να κάνει δύο κύκλους συμπίεσης με κυλινδρικό στέλεχος διαμέτρου 20 mm, προσομοιάζοντας τη διαδικασία της μάσησης.



Εικόνα 26: Ανάλυση υφής σε ολόκληρο λαβράκι.

Από το γράφημα του αναλυτή υφή προσδιορίζεται (Tzia *et al.*, 2007),

- ❖ Η **σκληρότητα** (Hardness), που υπολογίζεται από τη μέγιστη δύναμη που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου, και
- ❖ Η **προσκολλησιμότητα** (Adhesiveness), η οποία προσδιορίζεται από το λόγο του θετικού εμβαδόν του δεύτερου κύκλου μάσησης προς το αντίστοιχο του πρώτου κύκλου μάσησης.



Εικόνα 27: Διάγραμμα αναλυτή υφής.

4.4.5 Μέτρηση χρώματος

Η μεταβολή του χρώματος των δειγμάτων λαβρακιού μετριούνταν μετά από κάθε δειγματοληψία, και στα δύο ίδια δείγματα ανά συσκευασία, λαμβάνοντας μετρήσεις σε 3 διπλανά σημεία κατά μήκος της ράχης του. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν με το χρωματόμετρο *X-rite Eye-one pro*, όπου προσδιόριζε τις παραμέτρους χρώματος L, a, b και συνδεόταν με ηλεκτρονικό υπολογιστή με τον τρόπο που αναφέρθηκε στην Ενότητα 4.3.1. Μέσω των μετρήσεων αυτών των παραμέτρων δύναται εφικτός ο

υπολογισμός της συνολικής μεταβολής του χρώματος (ΔE) αλλά και της μεταβολής της κάθε παραμέτρου ξεχωριστά (ΔL , Δa και Δb) από το δείγμα του χρόνου t_0 (L_0 , a_0, b_0) μέσω των παρακάτω εξισώσεων:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (4.1)$$

$$\Delta L = L - L_0 \quad (4.2)$$

$$\Delta a = a - a_0 \quad (4.3)$$

$$\Delta b = b - b_0 \quad (4.4)$$

4.4.6 Προσδιορισμός οξειδωσης λιπαρών οξέων (TBARS)

Η ανάλυση της οξειδωσης των λιπαρών βασίστηκε στην αντίδραση ουσιών με το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA). Η μέθοδος αυτή, μετράει την μηλονική αλδεΐδη (MDA) και βασίζεται στον προσδιορισμό του συμπλόκου που σχηματίζεται από την αντίδραση της αλδεΐδης με το διάλυμα TBA. Όταν η τιμή του TBA είναι μικρότερη των 3 mg MDA/kg προϊόντος, το προϊόν θεωρείται άριστης ποιότητας, για τιμές 3-5 mg MDA/kg προϊόντος θεωρείται καλής ποιότητας, ενώ έχει όριο κατανάλωσης που ανέρχεται στα 7-8 mg MDA/kg προϊόντος (Cadun *et al.*, 2005).

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζεται από τα εξής στάδια:

- ❖ Παρασκευάζεται το διάλυμα TBA, για το οποίο διαλύονται 0,375 g TBA, 15 g τριχλωρικό (TCA), 1,76 mL HCL 12 N σε 82,9 mL νερό, και ακολουθεί ανάδευση του μείγματος μέχρι πλήρους διαλύσεως των στερεών συστατικών,
- ❖ Λαμβάνονται 10 g δείγματος λαβρακιού και πολτοποιούνται με 30 mL απιονισμένο νερό,
- ❖ Μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα 1 mL από το πολτοποιημένο μείγμα και 2 mL από το διάλυμα TBA, και αφήνονται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 98°C για 15 min. Για το τυφλό δείγμα, προστίθεται 1 mL απιονισμένου νερού αντί για 1 mL δείγματος και ακολουθείται η ίδια διαδικασία.
- ❖ Μόλις ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, φυγοκεντρώνται για 15 min, στα 10000 g και στους 5°C.
- ❖ Λαμβάνεται το υπερδιήθημα και μετράται η απορρόφηση του στα 532 nm σε φασματοφωτόμετρο Unicam Helios (Εικόνα 28)- (Spectronic Unicam EMEA, Cambridge, United Kingdom) ύστερα από μηδενισμό με το τυφλό δείγμα.



Εικόνα 28: Μέτρηση απορρόφησης του υπερδιηθήματος σε φασματοφωτόμετρο για τον προσδιορισμό της οξείδωσης λιπαρών οξέων.

Η συγκέντρωση των TBARS προσδιορίζεται με καμπύλη αναφοράς κατασκευασμένη από 1,1,3,3-τετρα-αιθοξυ-προπάνιο και εκφράζεται σε mg μηλονικής αλδεΐδης/kg σάρκας ιχθύος.

4.5 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

4.5.1 Κινητική απόκρισης χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΤΙ

Η απόκριση της μεταβολής του χρώματος στους ενζυμικούς χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες, εκφράζεται μέσω της εξίσωσης (4.5),

$$X = norm(a + b) = \frac{(a+b)-(a+b)_{min}}{(a+b)-(a+b)_{max}} \quad (4.5)$$

Όπου a , b είναι οι παράμετροι χρώματος που μετριοούνται μέσω του χρωματομέτρου. Οι μετρήσεις του χρώματος των δεικτών με το χρόνο ολοκληρώνεται μόλις αυτό αποκτήσει το τελικό του χρώμα και στη συνέχεια γίνεται ο υπολογισμός της απόκρισης της μεταβολής του. Η απόκριση της μεταβολής του χρώματος λαμβάνει σταδιακά αυξανόμενες τιμές από 0 έως 1. Το παρατηρούμενο τελικό σημείο αντιστοιχεί σε τιμή απόκρισης $norm(a+b)$ ίση με 0.8 κι αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης.

Η απόκριση συναρτήσει του χρόνου έχει σιγμοειδή μορφή η οποία μπορεί, σε ικανοποιητικό βαθμό, να προσομοιωθεί από το κινητικό μοντέλο δύο παραμέτρων (k_1 και k_2) το οποίο φαίνεται στην εξίσωση (4.6),

$$norm(a + b) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_1 - t}{k_2}\right)} \quad (4.6)$$

Όπου k_1 , k_2 οι σταθερές των ρυθμών μεταβολής του χρώματος των ΤΤΙ.

Επομένως, γίνεται η προσαρμογή στο σιγμοειδές μοντέλο της εξίσωσης (4.6), προσδιορίζοντας τους ρυθμούς μεταβολής k_1 , k_2 για κάθε δείκτη σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης, μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10.0. Τέλος, από τους ρυθμούς μπορεί να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης του κάθε δείκτη, καθώς και οι τιμές $k_{1,ref}$, $k_{2,ref}$, με θερμοκρασία αναφοράς τους 4°C, μέσω της εξίσωσης Arrhenius,

$$\ln \frac{k}{k_{ref}} = -\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (4.7)$$

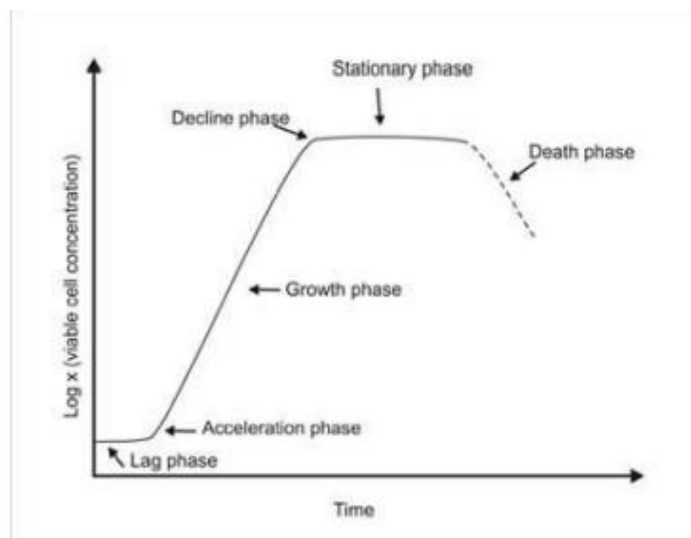
Επιπρόσθετα, μπορεί να προσδιοριστεί ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο της απόκρισης των ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΤΙ τύπου M, συναρτήσει του χρόνου (days), της θερμοκρασίας (K), και της ενεργότητας του ενζύμου των δεικτών (units), όπως περιγράφεται από την εξίσωση 4.8,

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,ref} c^{-a} \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2,ref} c^{-b} \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (4.8)$$

4.5.2 Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης λαβρακιού

Η κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών, όταν εκείνοι βρεθούν σε ευνοϊκό περιβάλλον για να πολλαπλασιαστούν, έχει συγκεκριμένη τυπική μορφή καμπύλης, η οποία αποτελείται από τέσσερις συγκεκριμένες φάσεις, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 29* (Ταουκίς *et al.*, 2019),

- ❖ Τη λανθάνουσα φάση (lag phase), όπου είναι η περίοδος προσαρμογής των κυττάρων στο περιβάλλον τους, κατά την οποία ο ρυθμός ανάπτυξης είναι σχεδόν μηδενικός.
- ❖ Την εκθετική φάση (growth phase), στην οποία τα κύτταρα του μικροοργανισμού αναπτύσσονται ραγδαία με εκθετικό ρυθμό, καταναλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά του υλικού ανάπτυξης τους, με στόχο τη δημιουργία αποικιών.
- ❖ Τη φάση στασιμότητας (stationary phase), όπου επέρχεται από το σημείο που η συσσώρευση των μεταβολιτών είναι τόσο αυξημένη που ο ρυθμός ανάπτυξης αρχίζει και μειώνεται μέχρι να σταθεροποιηθεί, και η διάρκεια της εξαρτάται από το μικροοργανισμό.
- ❖ Τη φάση θανάτου (death phase), όπου ακολουθεί τη φάση της στασιμότητας κατά την οποία εκκρίνονται τοξίνες από τους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα τη θανάτωση τους, και τη σταδιακή αύξηση του ρυθμού θανάτωσης μέχρι που ξεπερνάει και το ρυθμό ανάπτυξης.



Εικόνα 29: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών

Ο υπολογισμός του μικροβιακού φορτίου προκύπτει μέσω των αποικιών που έχουν μετρηθεί για κάθε δειγματοληψία, συγκεκριμένα, για τις αποικίες των αερόβιων συνθηκών τα δεδομένα αναφέρονται στο 0,1 mL του δείγματος που επιστρώθηκε, ενώ των αναερόβιων συνθηκών στο 1 mL δείγματος. Οι μετρήσεις αυτές, θα πρέπει να αναχθούν στη μηδενική αραιώση και σε 1 g δείγματος, κάνοντας την παραδοχή πως 1 mL αντιστοιχεί σε 1 g. Οι εξισώσεις (4.9), (4.10) προσδιορίζουν τον υπολογισμό

του μικροβιακού φορτίου (logCFU/g), για αερόβιους και αναερόβιους οργανισμούς, αντίστοιχα,

$$\log(N) = \log((\text{αριθμός αποικιών}) \times (10^{\text{Αραιώση}+1})) \quad (4.9)$$

$$\log(N) = \log((\text{αριθμός αποικιών}) \times (10^{\text{Αραιώση}})) \quad (4.10)$$

Για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης κάθε μικροοργανισμού έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα τα οποία περιγράφουν τη σιγμοειδή καμπύλη που αναφέρθηκε παραπάνω. Ένα από αυτά τα μοντέλα το οποίο είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο και περιγράφει επαρκώς τη λανθάνουσα φάση και το ρυθμό ανάπτυξης στην εκθετική φάση, είναι το μοντέλο Baranyi Growth Model (Baranyi & Roberts, 1995). Οι πειραματικές μετρήσεις των μικροβιακών αναλύσεων προσαρμόστηκαν στο συγκεκριμένο μοντέλο με τη βοήθεια του υπολογιστικού λογισμικού, DMFit software (IFR, Institute of Food Research, Reading, UK) για τη δημιουργία των καμπυλών ανάπτυξης και τον προσδιορισμό των σταθερών του ρυθμού ανάπτυξης (k) και του χρόνου της λανθάνουσας φάσης.

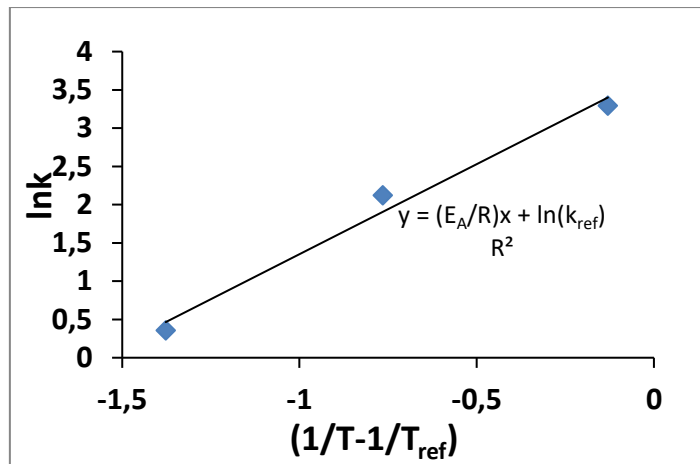
Μέσω των αποτελεσμάτων του μοντέλου Baranyi, μπορεί να προσδιοριστεί και ο χρόνος ζωής του ιχθυηρού, ο οποίος δίνεται από την εξίσωση (4.11),

$$t_{SL} = t_r + t_{lagphase} \quad (4.11)$$

Όπου t_{SL} ο χρόνος διατήρησης του τρόφιμου, $t_{lagphase}$ ο χρόνος λανθάνουσας φάσης και t_r ο χρόνος που υπολογίζεται για όριο αλλοίωσης $\log(N)=7 \log(\text{CFU})/\text{g}$ όπως φαίνεται στην εξίσωση (4.12),

$$t_r = \frac{7 - \log N_0}{k} \quad (4.12)$$

Τέλος, για τους ρυθμούς ανάπτυξης μπορεί να εξαχθεί η εξάρτηση τους από τη θερμοκρασία με χρήση της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 4.7) που αναφέρθηκε παραπάνω και να προσδιοριστεί η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a). Από την κλίση του διαγράμματος Arrhenius, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 30*, όπου συσχετίζεται η τιμή $\ln k$ με το μέγεθος $\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}$, προσδιορίζεται η E_a για κάθε προϊόν και μικροοργανισμό.



Εικόνα 30: Ενδεικτικό διάγραμμα εξίσωσης Arrhenius.

Κεφάλαιο 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

5.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης, που διεξήχθη στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, όπως αυτή αναλύθηκε εκτενώς στο κεφάλαιο 4. Η αυξανόμενη ζήτηση στην κατανάλωση ιχθυρών και προϊόντων τους, καθώς και το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη διασφάλιση της ποιότητας και την αύξηση διατηρησιμότητας των ιχθυρών, έχει στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών να μελετήσουν εις βάθος τους μηχανισμούς που οφείλονται για την υποβάθμιση της ποιότητάς τους. Η μελέτη της υποβάθμισης τους μπορεί να επιτευχθεί με μικροβιακές αναλύσεις, συγκεκριμένα, μικροβιολογία πρόρρησης, όπου με την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων προβλέπεται και ποσοτικοποιείται η συμπεριφορά των μικροοργανισμών, καθώς και με αναλύσεις υφής, χρώματος, pH και οξείδωσης λιπαρών οξέων, σε ιχθυρά διαφορετικών συνθηκών συσκευασίας και θερμοκρασίας αποθήκευσης. Πέραν όμως, της αύξησης διατηρησιμότητας, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην ανάπτυξη μεθόδων για ενεργή παρακολούθηση της ποιότητας του ιχθυρού σε όλη τη διάρκεια της ψυκτικής αλυσίδας, όπως γίνεται με τους ενζυμικούς χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες (ΤΤΙ), και επιτυγχάνεται με μελέτη και ανάπτυξη κινητικών μοντέλων, με στόχο την επιλογή των κατάλληλων δεικτών στα αντίστοιχα προϊόντα μελέτης.

5.2 Μελέτη διατηρησιμότητας και ποιότητας ολόκληρου λαβρακιού

Η αρχική σύσταση των δειγμάτων λαβρακιού (ολόκληρου και φιλέτου) μετρήθηκε πειραματικά, μέσω διαφόρων μεθόδων, και προέκυψαν τα σχετικά αποτελέσματα. Η περιεκτικότητα του λαβρακιού σε υγρασία βρέθηκε ίση με 68,04% (\pm 4,53%) και σε τέφρα βρέθηκε ίση με 1.45% (\pm 0,16%), τιμές οι οποίες συνάδουν με αποτελέσματα άλλων ερευνών (Ozden & Erkan, 2006, Grigorakis *et al.*, 2004, Kyraia & Lougonois, 2002). Η περιεκτικότητα σε λιπαρά υπολογίστηκε ίση με 8,03% και σε πρωτεΐνες ίση με 22,05% (\pm 0,36%), οι οποίες, επίσης, είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες μετρήσεις στις βιβλιογραφικές έρευνες που αναφέρθηκαν.

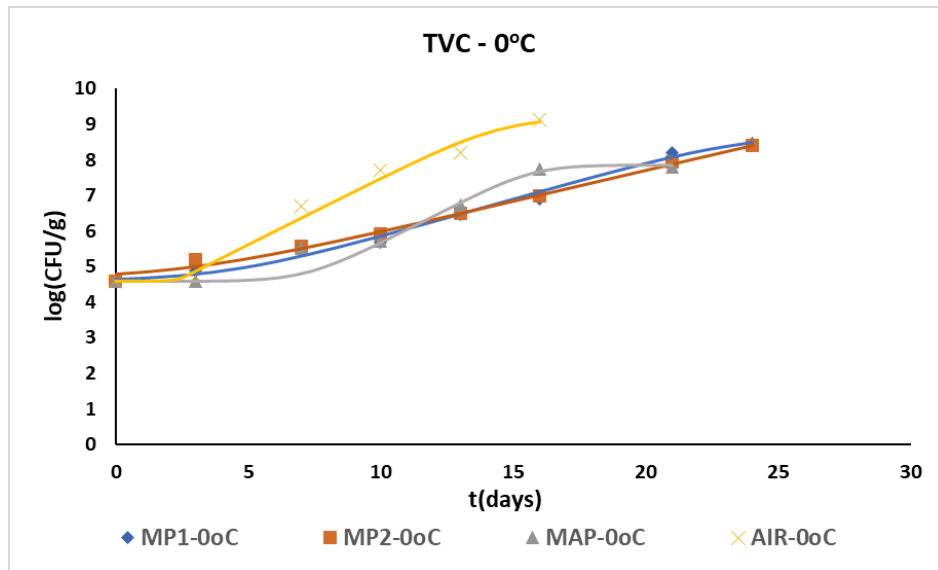
5.2.1 Μελέτη μικροβιακής αλλοίωσης ολόκληρου απεντερωμένου λαβρακιού

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα διαγράμματα ανάπτυξης κάθε αλλοιογόνου μικροοργανισμού σε συνάρτηση με το χρόνο και τη θερμοκρασία αποθήκευσης, και στις διάφορες συνθήκες συσκευασίας. Το εύρος θερμοκρασιών αποθήκευσης που μελετήθηκαν ήταν 0, 2.5, 5 και 10°C και οι συνθήκες συσκευασίας ήταν ο αέρας, η τροποποιημένη ατμόσφαιρα με σύσταση 20% O₂-20% CO₂-60% N₂, αντίστοιχη των εμπορικά διαθέσιμων συσκευασμένων προϊόντων, και η τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση δύο εμπορικά διαθέσιμων εκπομπών CO₂, με κωδικοποίηση PAD1 και PAD2, με όγκο εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα 300 και 550mL, αντίστοιχα.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν πέντε επιλεγμένα είδη αλλοιογόνων μικροοργανισμών, η ολική μικροβιακή χλωρίδα (Total Viable Count-TVC), οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.), τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.), τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (*Shewanella Putrefaciens*) και τα γαλακτικά βακτήρια, των οποίων ο πληθυσμός βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης (<1.0 log(CFU)/g) σχεδόν καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης και για όλες τις συνθήκες αποθήκευσης κι επομένως, δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων που ακολουθεί.

Για κάθε είδος και συνθήκη, από τα πειραματικά σημεία, προέκυψε η προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi, τα αποτελέσματα του οποίου αναλύονται παρακάτω στο Κεφάλαιο 5.2.2. Στα διαγράμματα που παρουσιάζονται, τα σημεία αποτελούν τις πειραματικές μετρήσεις, και οι συνεχείς γραμμές προκύπτουν από την εφαρμογή του μοντέλου Baranyi.

5.2.1.1 Ανάπτυξη Ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC)

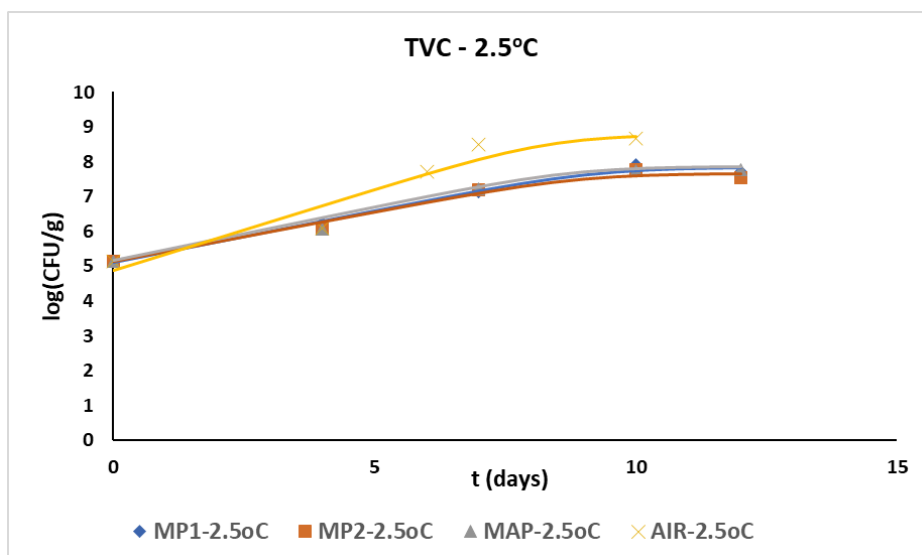


Διάγραμμα 1: Μεταβολή ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 0°C

Από το Διάγραμμα 1, είναι εμφανές πως το ψάρι συσκευασμένο σε αέρα παρουσιάζει το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης του ολικού μικροβιακού φορτίου, ίσο με $0,374 \text{ d}^{-1}$, ενώ οι συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έχουν χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης. Επιπλέον, το συσκευασμένο ψάρι με τη χρήση του PAD2 (πορτοκαλί γραμμή), φαίνεται να φέρει την πιο αργή ανάπτυξη, με ρυθμό $0,175 \text{ d}^{-1}$, την οποία ακολουθεί με μικρή διαφορά η συσκευασία με τη χρήση του PAD1 (μπλε γραμμή), με ρυθμό $0,192 \text{ d}^{-1}$, και με ελαφρώς μεγαλύτερο ρυθμό, συγκεκριμένα, $0,262 \text{ d}^{-1}$, η συσκευασία χωρίς την προσθήκη εκπομπών CO_2 . Οι ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, παρατίθενται αναλυτικότερα στον Πίνακα 12, του κεφαλαίου 5.2.2.

Τα δείγματα αποθηκευμένα σε MAP χωρίς την χρήση PAD εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση αλλά ο ρυθμός της εκθετικής φάσης είναι σημαντικά μεγαλύτερος. Συγκεκριμένα, στα συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η λανθάνουσα φάση φτάνει τις 5 ημέρες, με τη χρήση του PAD1 τις 4 ημέρες, με τη χρήση του PAD2 τις 3 μέρες και τέλος στη συσκευασία με τον αέρα ανέρχεται στις 2 ημέρες.

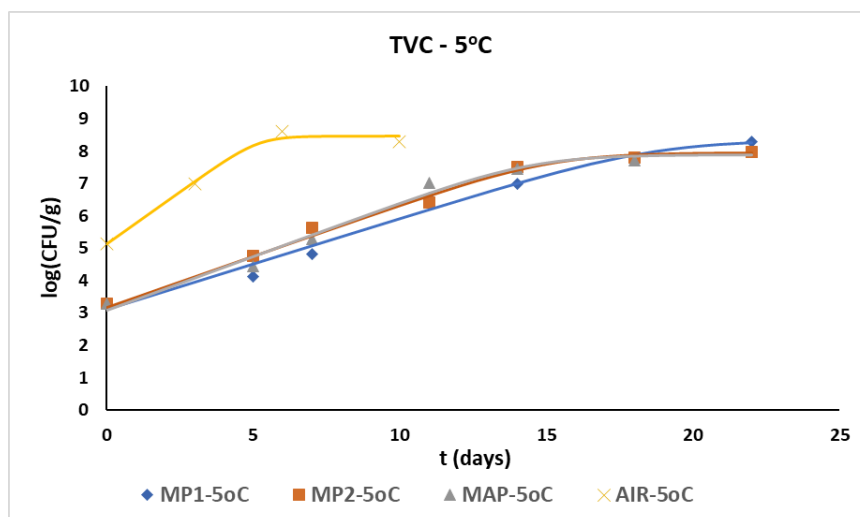
Η φάση στασιμότητας, στα συσκευασμένα με αέρα δείγματα εμφανίζεται για φορτίο 9 log(CFU)/g , και σε αυτά που είναι συσκευασμένα υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι $7-8 \text{ log(CFU)/g}$.



Διάγραμμα 2: Μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 2.5°C

Τα αποτελέσματα για τη θερμοκρασία των 2,5°C (Διάγραμμα 2), είναι παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν για τους 0°C. Είναι, δηλαδή, εμφανές πως το ψάρι συσκευασμένο σε αέρα παρουσιάζει το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης του ολικού μικροβιακού φορτίου, ίσο με $0,465 d^{-1}$, ενώ το συσκευασμένο ψάρι με τη χρήση του PAD2, το οποίο εκλύει μεγαλύτερη ποσότητα CO₂ συγκριτικά με το PAD1, φαίνεται να φέρει τον πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης, που έχει τιμή $0,284 d^{-1}$, με μικρή διαφορά από τη συσκευασία με το PAD1.

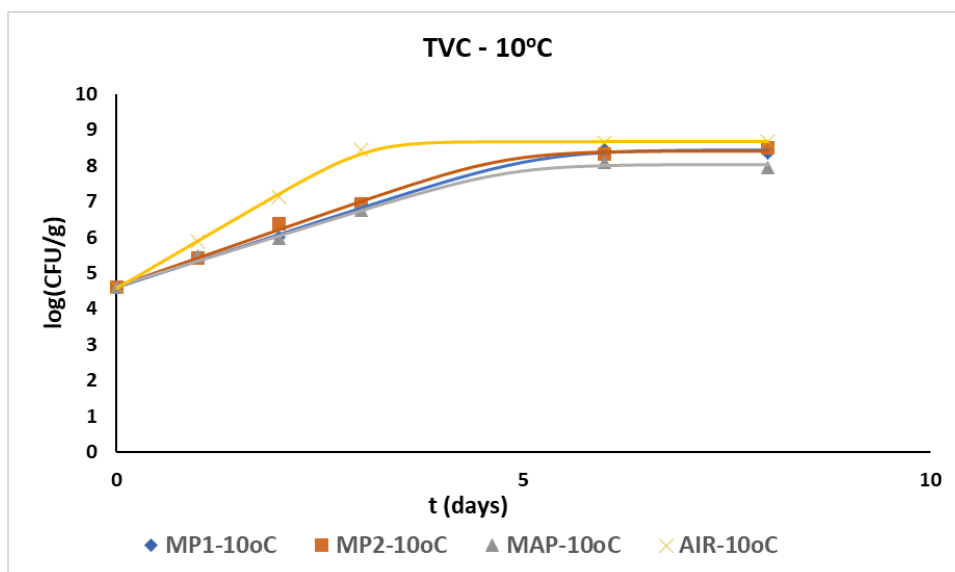
Το αρχικό μικροβιακό φορτίο του λαβρακιού είναι $5.15 \log(\text{CFU})/\text{g}$ και η φάση στασιμότητας στα συσκευασμένα δείγματα υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα εμφανίστηκε για φορτίο μεταξύ $7-7.5 \log(\text{CFU})/\text{g}$, ενώ υπό αέρα σε φορτίο $8,5 \log(\text{CFU})/\text{g}$.



Διάγραμμα 3: Μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 5°C

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 3, ο ρυθμός ανάπτυξης της μικροβιακής χλωρίδας είναι πολύ μεγαλύτερος στη συσκευασία με αέρα, συγκεκριμένα $0,643 d^{-1}$, ενώ στις άλλες κυμαίνεται στα ίδια περίπου επίπεδα, κοντά στο $0,3 d^{-1}$, με την πιο αργή ανάπτυξη να εμφανίζεται στη συσκευασία με τη χρήση του PAD2, όπως παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι ρυθμοί στο κεφάλαιο 5.2.2.

Το αρχικό μικροβιακό φορτίο είναι $3,29 \log(\text{CFU})/\text{g}$ για τις συσκευασίες υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα και $5,15 \log(\text{CFU})/\text{g}$ υπό αέρα. Η φάση στασιμότητας, των δειγμάτων συσκευασμένων σε αέρα είναι $8,5 \log(\text{CFU})/\text{g}$ και σε αυτά της τροποποιημένης ατμόσφαιρας μεταξύ $7,5-8 \log(\text{CFU})/\text{g}$.

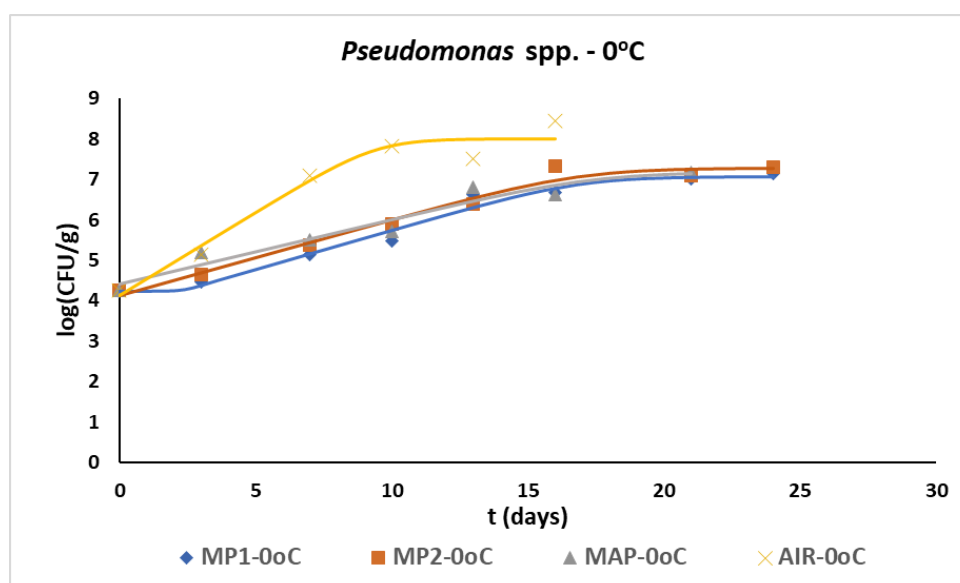


Διάγραμμα 4: Μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 10°C

Παρομοίως με τις προηγούμενες θερμοκρασίες που παρατέθηκαν, και στο Διάγραμμα 4, για τους 10°C φαίνεται ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης να εμφανίζεται στη συνθήκη του αέρα, με τιμή $1,33 d^{-1}$. Στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, οι διαφορές είναι μικρές, με μικρότερο ρυθμό να εμφανίζεται στη συσκευασία χωρίς χρήση εκπομπών CO_2 , ίσο με $0,702 d^{-1}$. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο είναι $4,60 \log(\text{CFU})/\text{g}$. Η φάση στασιμότητας σε όλα τα δείγματα είναι μεταξύ $8-8,5 \log(\text{CFU})/\text{g}$.

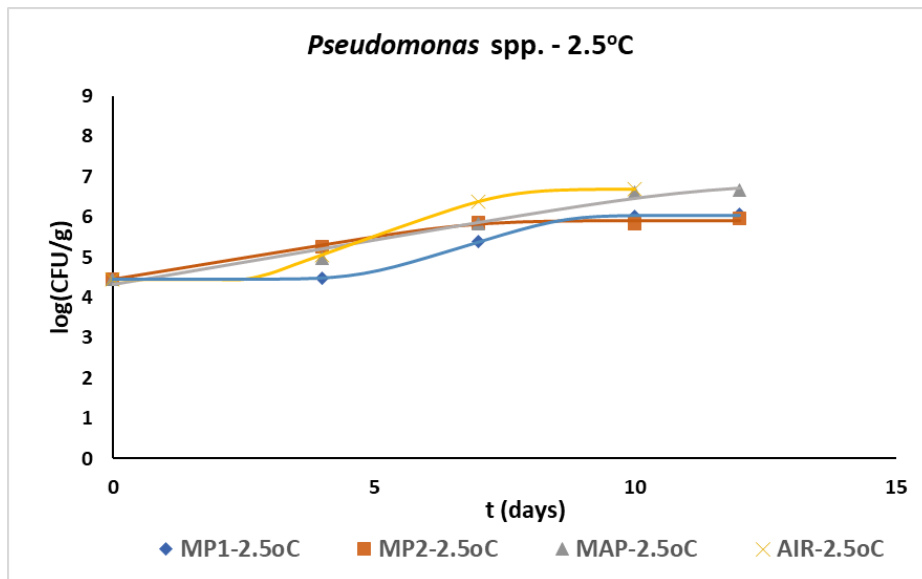
Συνοψίζοντας, είναι εμφανές, πως όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο αυξάνονται και οι ρυθμοί ανάπτυξης της μικροβιακής χλωρίδας, ανεξαρτήτως συνθήκης συσκευασίας, καθώς και η φάση στασιμότητας εμφανίζεται σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Πιο συγκεκριμένα, λανθάνουσα φάση εμφανίστηκε μόνο στη θερμοκρασία των 0°C , θερμοκρασία στην οποία είναι και πιο έντονη η συνεισφορά των εκπομπών CO_2 στην επέκταση της διατηρησιμότητας των ιχθύων.

5.2.1.2 Ανάπτυξη των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.)



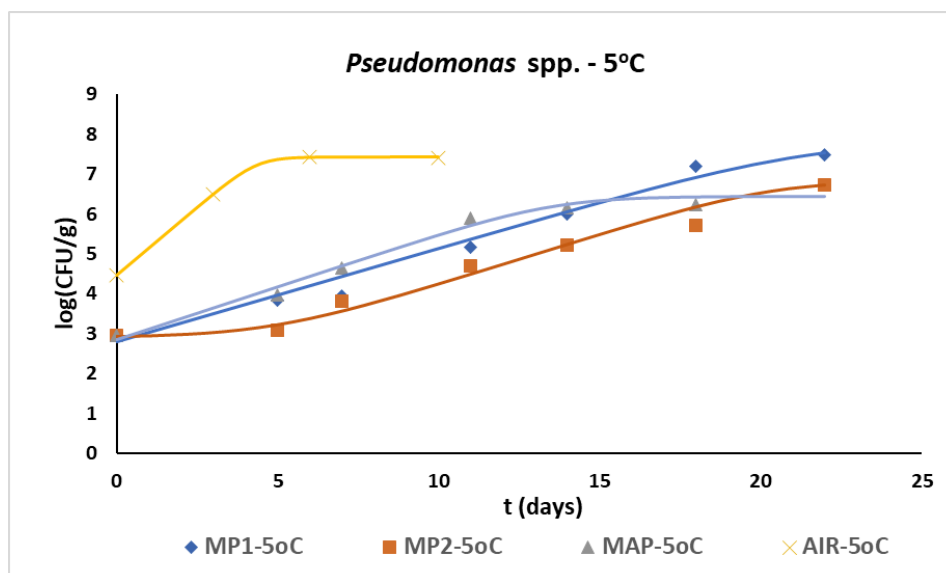
Διάγραμμα 5: Μεταβολή της ανάπτυξης των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 0°C

Για τις ψευδομονάδες, φαίνεται στο Διάγραμμα 5, όπως συνέβη και με την ολική μικροβιακή χλωρίδα, πως η ταχύτερη ανάπτυξη για τη θερμοκρασία 0°C εμφανίζεται στα συσκευασμένα υπό αέρα δείγματα, με ρυθμό που ισούται με $0,410 d^{-1}$. Στα συσκευασμένα με χρήση PAD1 δείγματα, παρουσιάζεται λανθάνουσα φάση 2 ημερών, ενώ οι ρυθμοί ανάπτυξης, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 13, είναι παραπλήσιοι. Η φάση στασιμότητας για τη συνθήκη αέρα, είναι στο $7,5 \log(\text{CFU})/\text{g}$, ενώ για την τροποποιημένη ατμόσφαιρα βρίσκεται μεταξύ $6,5-7 \log(\text{CFU})/\text{g}$. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των ψευδομονάδων σε αυτή τη θερμοκρασία είναι $4,24 \log(\text{CFU})/\text{g}$.



Διάγραμμα 6: Μεταβολή της ανάπτυξης των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 2,5°C

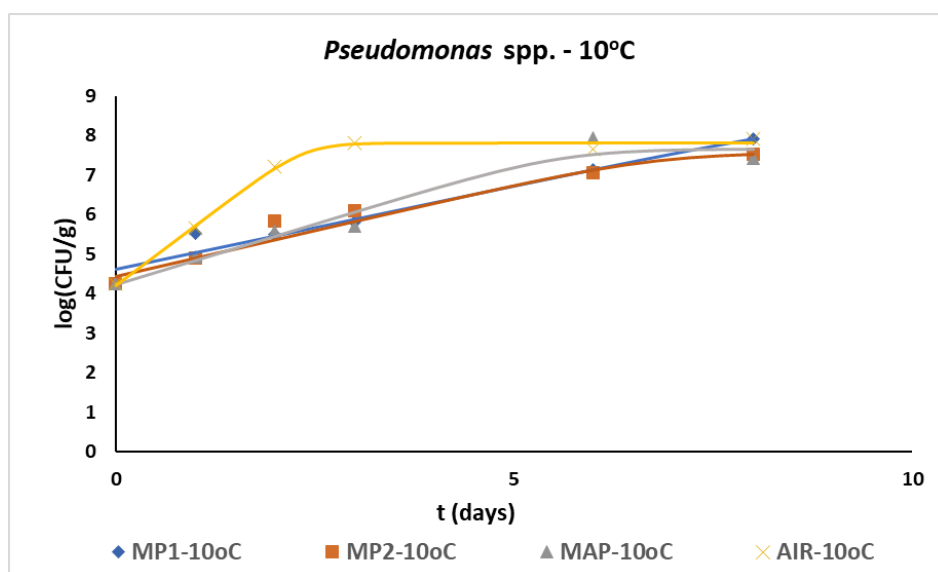
Από το Διάγραμμα 6, όσον αφορά τους ρυθμούς ανάπτυξης, ο χαμηλότερος ρυθμός εμφανίζεται στα δείγματα με τη χρήση του PAD2, που έχει τιμή $0,2123 d^{-1}$. Λανθάνουσα φάση, παρατηρείται, στα συσκευασμένα υπό αέρα ίση με 3 μέρες και σε αυτά με τη χρήση PAD1, επίσης, ίση με 3 μέρες. Στα MAP δείγματα που παρατηρείται λανθάνουσα φάση, ο ρυθμός στην εκθετική φάση είναι σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με τους ρυθμούς των MAP-PAD δειγμάτων. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των ψευδομονάδων στους 2,5°C ήταν $4,46 \log(\text{CFU})/\text{g}$ και η φάση στασιμότητας για τις συσκευασίες με τη χρήση εκπομπών CO_2 κυμαίνεται από 5,5 έως $6 \log(\text{CFU})/\text{g}$, ενώ των υπολοίπων μεταξύ $6-7 \log(\text{CFU})/\text{g}$.



Διάγραμμα 7: Μεταβολή της ανάπτυξης των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 5°C

Τα συμπεράσματα που διεξάγονται από το Διάγραμμα 7, είναι τα ίδια με τα διαγράμματα των προηγούμενων θερμοκρασιών, με το μικρότερο ρυθμό να εμφανίζεται στις συσκευασίες με τη χρήση PADs, με τιμές 0,24 και 0,25 d^{-1} για το PAD1 και PAD2, αντίστοιχα.

Στη συσκευασία με το PAD2 εμφανίζει και λανθάνουσα φάση, όπως είναι εμφανές, διάρκειας 5 ημερών. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο για τη συσκευασία αέρα είναι 4,46 log(CFU)/g και για τις υπόλοιπες 2,95 log(CFU)/g και η φάση στασιμότητας, για τις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με τη χρήση PAD2 και χωρίς κυμαίνεται μεταξύ 6-6,5 log(CFU)/g, με τη χρήση του PAD1 και για τις συνθήκες αέρα μεταξύ 7-7,5 log(CFU)/g.



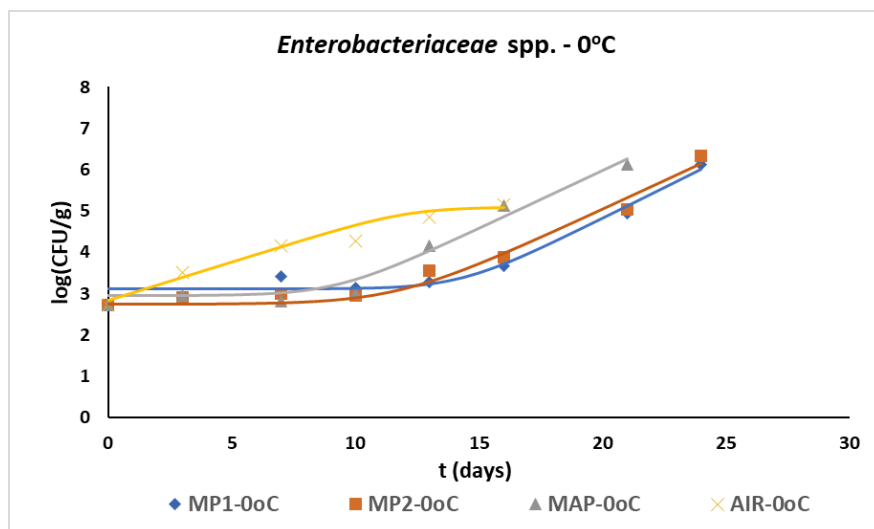
Διάγραμμα 8: Μεταβολή της ανάπτυξης των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 10°C

Τα συμπεράσματα από το Διάγραμμα 8 και τη θερμοκρασία των 10°C είναι παρόμοια με όλες τις προηγούμενες θερμοκρασιακές συνθήκες, δηλαδή η χρήση της ενεργής συσκευασίας μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη των ψευδομονάδων συγκριτικά με τις άλλες 2 συνθήκες αποθήκευσης.

Γενικότερα, για τις ψευδομονάδες, όπως και για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης τόσο αυξάνονται οι ρυθμοί ανάπτυξης σε κάθε συνθήκη συσκευασίας και μειώνονται οι χρόνοι της λανθάνουσας φάσης, μειώνοντας τη συνολική διάρκεια ζωής. Επιπλέον, σε όλες τις θερμοκρασίες παρατηρείται ότι τα δείγματα που είναι αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες, παρουσιάζουν τους υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης, ενώ η χρήση των PADs ανέστειλε τους ρυθμούς. Τέλος παρατηρείται ότι η χρήση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας οδήγησε σε χαμηλότερο φορτίο των ψευδομονάδων στη φάση στασιμότητας. Το συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμών αποτελεί έναν από τους κυρίαρχους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς του λαβρακιού κατά την αερόβια

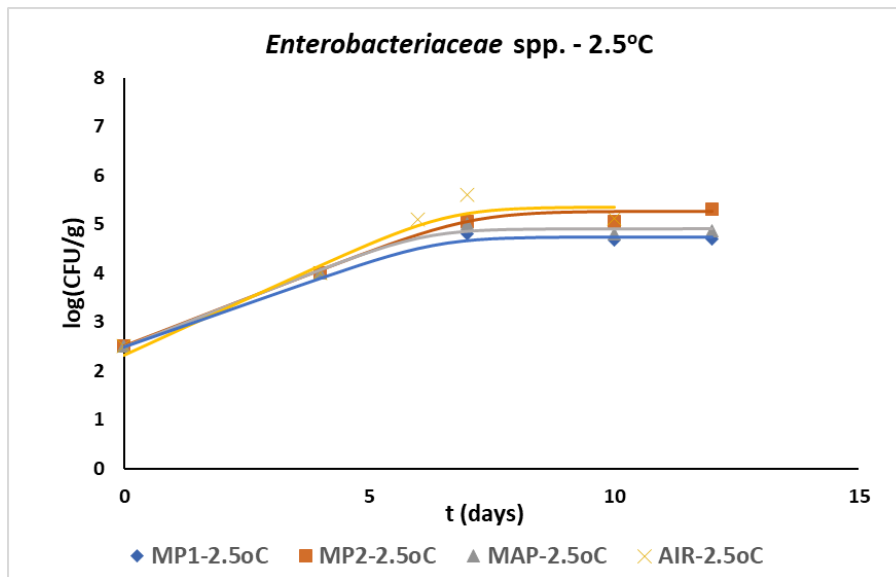
συντήρηση υπό ψύξη (Parlapani et al., 2015; Τσιρώνη, 2010), ενώ φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι η τροποποιημένη ατμόσφαιρα, δυσχεραίνει την ανάπτυξή τους.

5.2.1.3 Ανάπτυξη εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae spp.*)



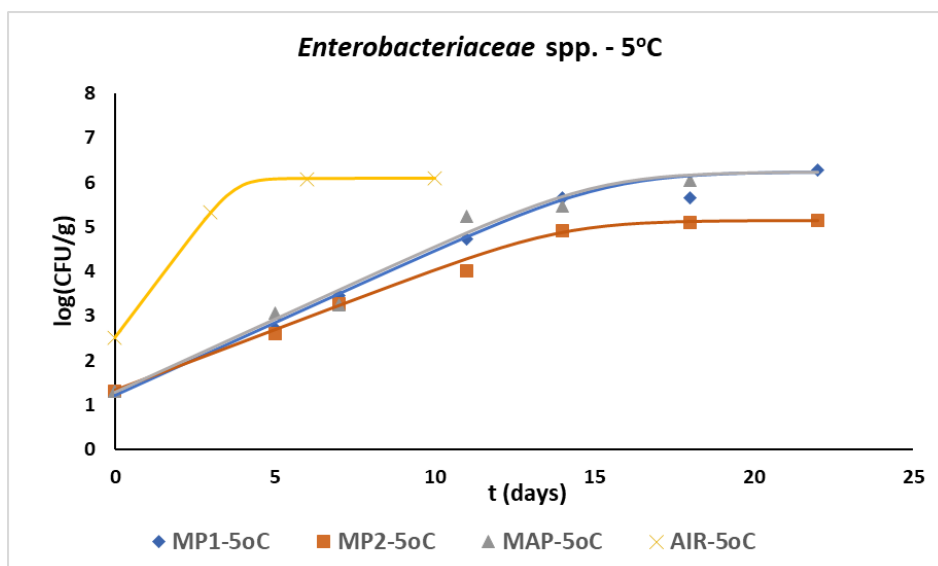
Διάγραμμα 9: Μεταβολή της ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae spp.*) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 0°C

Η ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων σε θερμοκρασία 0°C, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9, παρουσιάζει, για τα συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα λαβράκια, εκτενείς λανθάνουσες φάσεις σε σύγκριση με τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε αέρα, που κυμαίνονται από 9 έως και 15 μέρες. Επιπλέον, στα δείγματα της τροποποιημένης ατμόσφαιρας (με και χωρίς τη χρήση PADs), τα εντεροβακτήρια δεν φτάνουν στη φάση στασιμότητας για το διάστημα που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες. Συγκεκριμένα, η συσκευασία χωρίς τη χρήση PAD έχει λανθάνουσα φάση ίση με 9 ημέρες, με τη χρήση του PAD1 είναι ίση με 14 ημέρες και με τη χρήση του PAD2 είναι ίση με 12 ημέρες. Αναλυτικότερα, οι τιμές για τους ρυθμούς ανάπτυξης και τη λανθάνουσα φάση εμφανίζονται στον Πίνακα 14, του κεφαλαίου 5.2.2. Σε αντίθεση, τα συσκευασμένα σε αέρα δείγματα εμφανίζουν φάση στασιμότητας περίπου σε τιμή 5 log(CFU)/g.



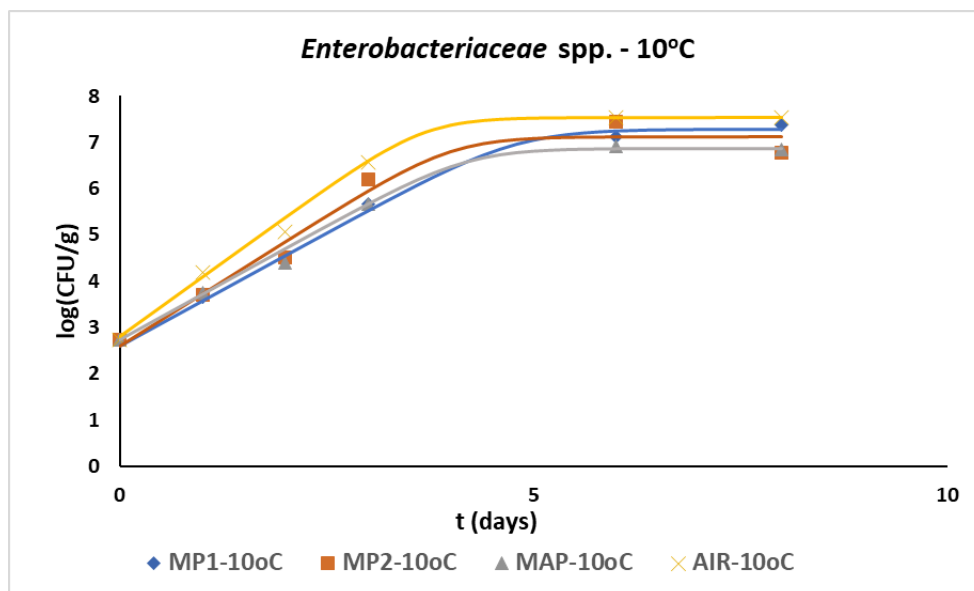
Διάγραμμα 10: Μεταβολή της ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae spp.*) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 2.5°C

Στο Διάγραμμα 10, γίνεται εμφανές, πως η συσκευασία με τη χρήση PAD1 έχει την πιο αργή ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων, με ρυθμό $0,350 d^{-1}$, ακολουθούμενη με μικρή διαφορά από την τροποποιημένη ατμόσφαιρα χωρίς εκπομπές CO₂, με ρυθμό $0,334 d^{-1}$, και στη συνέχεια από τα δείγματα με τη χρήση PAD2, με ρυθμό $0,387 d^{-1}$. Το δείγμα συσκευασμένο με αέρα εμφάνισε το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης εντεροβακτηρίων και ίσο με $0,46 d^{-1}$. Η φάση της στασιμότητας παρατηρείται σε όλες τις συνθήκες μεταξύ 4-5 log(CFU)/g, δηλαδή η ανάπτυξή του συγκεκριμένου μικροοργανισμού παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των εντεροβακτηρίων για τους 2,5°C είναι 2,51 log(CFU)/g.



Διάγραμμα 11: Μεταβολή της ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae spp.*) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 5°C

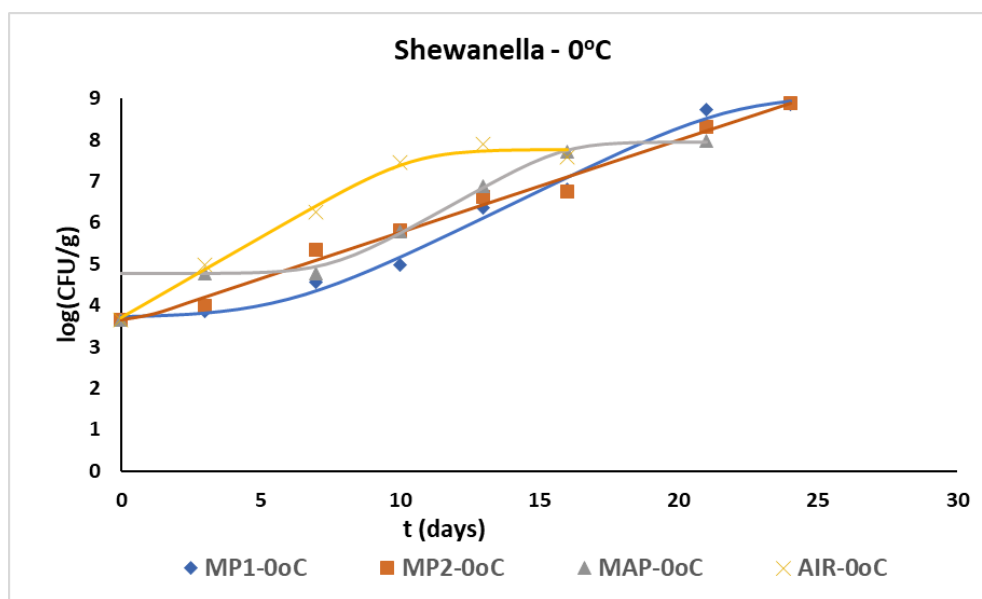
Παρόμοια με τα παραπάνω διαγράμματα, και στους 5°C μεγαλύτερο ρυθμό φαίνεται να εμφανίζει η συσκευασία με τη χρήση αέρα, με τιμή $0,950 d^{-1}$ και μικρότερο οι συνθήκες με τη χρήση PADs, με τα δείγματα να εμφανίζουν παραπλήσιους ρυθμούς, ίσους με $0,324$ και $0,327 d^{-1}$, το PAD2 και PAD1 αντιστοίχως. Η φάση στασιμότητας για τα συσκευασμένα δείγματα με τη χρήση PAD2 παρατηρείται μεταξύ $4,5 \log(\text{CFU})/\text{g}$, ενώ στα υπόλοιπα μεταξύ $5-6 \log(\text{CFU})/\text{g}$. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο για τον αέρα είναι $2,51 \log(\text{CFU})/\text{g}$ και για τα υπόλοιπα $1,30 \log(\text{CFU})/\text{g}$.



Διάγραμμα 12: Μεταβολή της ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.) για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 10°C

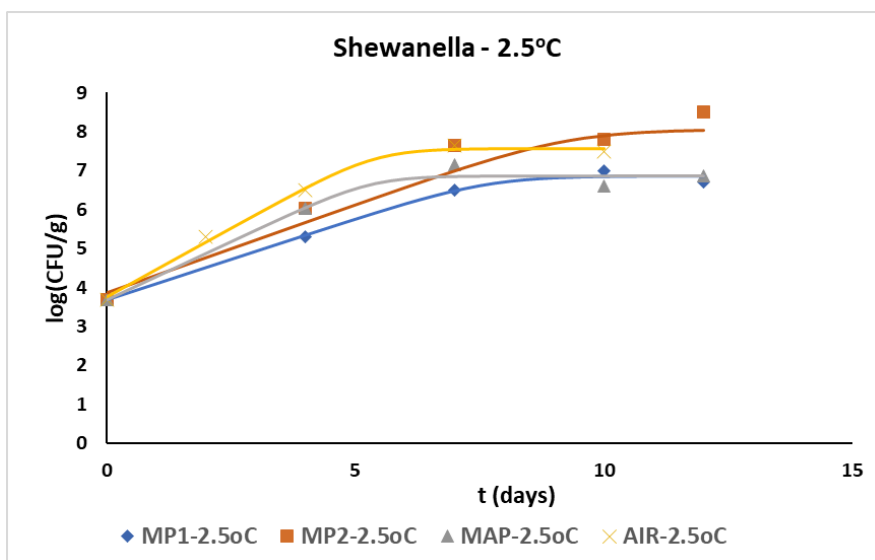
Η φάση στασιμότητας για την ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων στους 10°C κυμαίνεται μεταξύ $6-7 \log(\text{CFU})/\text{g}$, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 12, με μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης να παρατηρείται στα δείγματα συσκευασίας με χρήση PAD1, ίσο με $0,847 d^{-1}$.

5.2.1.4 Ανάπτυξη βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο H_2S (*Shewanella*)



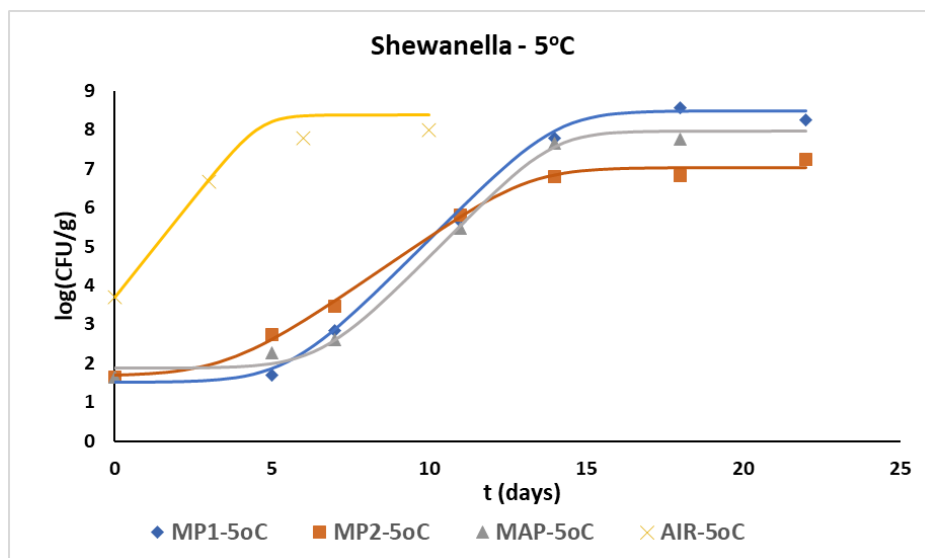
Διάγραμμα 13: Μεταβολή της ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν H_2S για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους $0^\circ C$

Η ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο, εμφανίζει μεγαλύτερο ρυθμό στη συσκευασία του αέρα, όπως συνέβη και με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, με τιμή $0,388 d^{-1}$, όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 15, στο κεφάλαιο 5.2.2. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν $3,65 \log(CFU)/g$, ενώ το τελικό φορτίο φτάνει για τα αερόβια συσκευασμένα δείγματα σε τιμή $7,5 \log(CFU)/g$, στα συσκευασμένα σε τροποποιημένες συνθήκες σε τιμή $8 \log(CFU)/g$, ενώ στα συσκευασμένα με τη χρήση PADs σε τιμή $9 \log(CFU)/g$. Στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας χωρίς PAD και με τη χρήση του PAD1 υπάρχει λανθάνουσα φάση που διαρκεί 6 και 7 μέρες αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση του PAD2 η φάση αυτή διαρκεί 2 μέρες αλλά παρουσιάζει σημαντικά μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης εκθετικής φάσης, ίσο με $0,223 d^{-1}$.



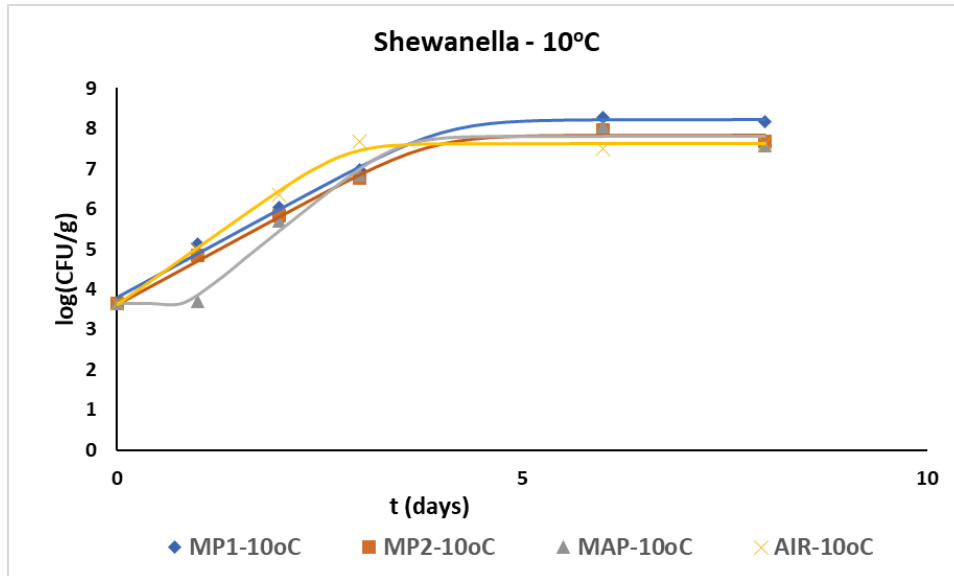
Διάγραμμα 14: Μεταβολή της ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν H_2S για κάθε συνθήκη συσκευασίας σε θερμοκρασία $2,5^\circ C$

Παρόμοια με τα προηγούμενα αποτελέσματα, οι ρυθμοί στους $2,5^\circ C$, είναι χαμηλότεροι με τη χρήση των 2 PADs και μεγαλύτεροι στην περίπτωση της αποθήκευσης σε αερόβιες συνθήκες. Οι φάσεις στασιμότητας κυμαίνονται σε φορτίο μεταξύ $6-7 \log(CFU)/g$ και αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν ίσο με $3,70 \log(CFU)/g$.



Διάγραμμα 15: Μεταβολή της ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν H_2S για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους $5^\circ C$

Όπως είναι εμφανές, στο Διάγραμμα 15, ο ρυθμός ανάπτυξης στη συσκευασία με αέρα, με τιμή $0,999 d^{-1}$, είναι πολύ μεγαλύτερος από τις υπόλοιπες συνθήκες, στις οποίες εμφανίζεται λανθάνουσα φάση με διάρκεια 4-5 ημέρες. Η φάση στασιμότητας σε όλες τις συνθήκες εμφανίζεται για φορτίο $7-8 \log(CFU)/g$.



Διάγραμμα 16: Μεταβολή της ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν H_2S για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους $10^\circ C$

Και για τη θερμοκρασία $10^\circ C$, τα αποτελέσματα που φαίνονται στο Διάγραμμα 16 ερμηνεύονται με τον ίδιο τρόπο με τα προηγούμενα διαγράμματα.

Συνολικά από όλες τις θερμοκρασιακές συνθήκες που μελετήθηκαν παρατηρείται ότι ο αέρας εμφανίζει τους μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης για τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο. Επιπλέον, ιδιαίτερα για αυτούς τους μικροοργανισμούς φαίνεται η θετική επίδραση που είχε η χρήση των PADs (ενεργή συσκευασία) στην επιβράδυνση της ανάπτυξης τους αφού οι ρυθμοί είναι μικρότεροι σε σχέση με τα δείγματα της απλής τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Αυτό είναι σημαντικό αφού τα συγκεκριμένα είδη παράγουν υδρόθειο το οποίο επηρεάζει και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτών των προϊόντων.

5.2.2 Εφαρμογή μοντέλου Baranyi στα πειραματικά δεδομένα

Στο κεφάλαιο αυτό, παρατίθενται τα δεδομένα προσδιορισμού του ρυθμού αλλοίωσης του κάθε μικροοργανισμού, όπως αυτά προέκυψαν από την εφαρμογή των πειραματικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi, μέσω του υπολογιστικού λογισμικού DMFit Software. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται τα δεδομένα του ρυθμού ανάπτυξης (k) κάθε μικροοργανισμού και ο χρόνος της λανθάνουσας φάσης ($t_{lagphase}$).

Πίνακας 12: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας.

TVC			
T ($^\circ C$)	Συσκευασία	k (d^{-1})	t_{lag} (d)
0 $^\circ C$	AIR	0,3740 ± 0,0015	2,28 ± 0,02
	MAP	0,2619 ± 0,0515	4,49 ± 1,55
	MAP-PAD1	0,1918 ± 0,0407	4,37 ± 0,47
	MAP-PAD2	0,1747 ± 0,0311	3,22 ± 0,45
2,5 $^\circ C$	AIR	0,4652 ± 0.0383	

	MAP	0,3044 ± 0,0216	
	MAP-PAD1	0,2960 ± 0,0317	1,65 ± 0,75
	MAP-PAD2	0,2837 ± 0,0240	
5°C	AIR	0,6431 ± 0,1263	
	MAP	0,3331 ± 0,0274	
	MAP-PAD1	0,3731 ± 0,0185	
	MAP-PAD2	0,3223 ± 0,0274	
10°C	AIR	1,3300 ± 0,0489	
	MAP	0,7024 ± 0,0483	
	MAP-PAD1	0,7373 ± 0,0203	
	MAP-PAD2	0,7945 ± 0,0516	

Στον Πίνακα 12, φαίνεται πως σε κάθε θερμοκρασία, οι μεγαλύτεροι ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας παρουσιάζονται στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε συνθήκες αέρα, όπως παρατηρήθηκε, βέβαια, και μέσω των διαγραμμάτων. Επιπλέον, στις χαμηλότερες θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (0 και 2,5°C) φαίνεται η σημαντική επίδραση που έχει η χρήση της ενεργής συσκευασίας (με τη χρήση των PADs) έναντι της απλής χρήσης τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

Πίνακας 13: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης των ψευδομονάδων.

<i>Pseudomonas spp.</i>			
T (°C)	Συσκευασία	k (d ⁻¹)	t _{lag} (d)
0°C	AIR	0,4103 ± 0,0792	
	MAP	0,1580 ± 0,0273	
	MAP-PAD1	0,1948 ± 0,0265	2,25 ± 1,55
	MAP-PAD2	0,1878 ± 0,0118	
2,5°C	AIR	0,4609 ± 0,0518	2,69 ± 0,82
	MAP	0,2202 ± 0,0564	
	MAP-PAD1	0,2442 ± 0,0157	3,31 ± 1,60
	MAP-PAD2	0,2123 ± 0,0226	
5°C	AIR	0,6825 ± 0,0107	
	MAP	0,2647 ± 0,0216	
	MAP-PAD1	0,2386 ± 0,0209	
	MAP-PAD2	0,2535 ± 0,0202	4,99 ± 1,52
10°C	AIR	1,5110 ± 0,0970	
	MAP	0,6141 ± 0,1443	
	MAP-PAD1	0,4239 ± 0,0910	
	MAP-PAD2	0,4626 ± 0,0881	

Στον Πίνακα 13, φαίνεται πως και οι ψευδομονάδες αναπτύσσονται όπως η ολική μικροβιακή χλωρίδα, με τους μεγαλύτερους ρυθμούς να εμφανίζονται στη συνθήκη

συσκευασίας αέρα. Μεταξύ των συνθηκών τροποποιημένης ατμόσφαιρας, φαίνεται πως οι μικρότεροι ρυθμοί παρατηρούνται στα συσκευασμένα δείγματα με χρήση PADs, με μικρές διαφορές μεταξύ τους.

Πίνακας 14: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης των εντεροβακτηρίων.

Enterobacteriaceae spp.			
T (°C)	Συσκευασία	k (d ⁻¹)	t _{lag} (d)
0°C	AIR	0,1859 ± 0,0305	
	MAP	0,2805 ± 0,0691	9,21 ± 2,34
	MAP-PAD1	0,2985 ± 0,0700	14,27 ± 1,92
	MAP-PAD2	0,2757 ± 0,0865	11,73 ± 3,28
2,5°C	AIR	0,4601 ± 0,0877	
	MAP	0,3925 ± 0,0452	
	MAP-PAD1	0,3503 ± 0,0401	
	MAP-PAD2	0,3867 ± 0,0224	
5°C	AIR	0,9499 ± 0,0135	
	MAP	0,3344 ± 0,0325	
	MAP-PAD1	0,3270 ± 0,0330	
	MAP-PAD2	0,3247 ± 0,0247	
10°C	AIR	1,2898 ± 0,0526	
	MAP	0,9866 ± 0,0691	
	MAP-PAD1	0,8470 ± 0,0700	
	MAP-PAD2	1,1260 ± 0,0865	

Παρομοίως και η ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων, φαίνεται να ακολουθεί τα προηγούμενα, με μικρότερους ρυθμούς στα συσκευασμένα δείγματα με τροποποιημένη ατμόσφαιρα με και χωρίς τη χρήση εκπομπών CO₂, σε σύγκριση με τα συσκευασμένα σε αερόβιες συνθήκες δείγματα.

Πίνακας 15: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης των βακτηρίων που παράγουν H₂S.

Shewanella			
T (°C)	Συσκευασία	k (d ⁻¹)	t _{lag} (d)
0°C	AIR	0,3880 ± 0,0362	
	MAP	0,3829 ± 0,0674	7,52 ± 0,97
	MAP-PAD1	0,3303 ± 0,0501	6,33 ± 0,13
	MAP-PAD2	0,2237 ± 0,0250	1,63 ± 0,55
2,5°C	AIR	0,7087 ± 0,0543	
	MAP	0,5982 ± 0,0682	
	MAP-PAD1	0,4157 ± 0,0359	
	MAP-PAD2	0,4526 ± 0,0684	

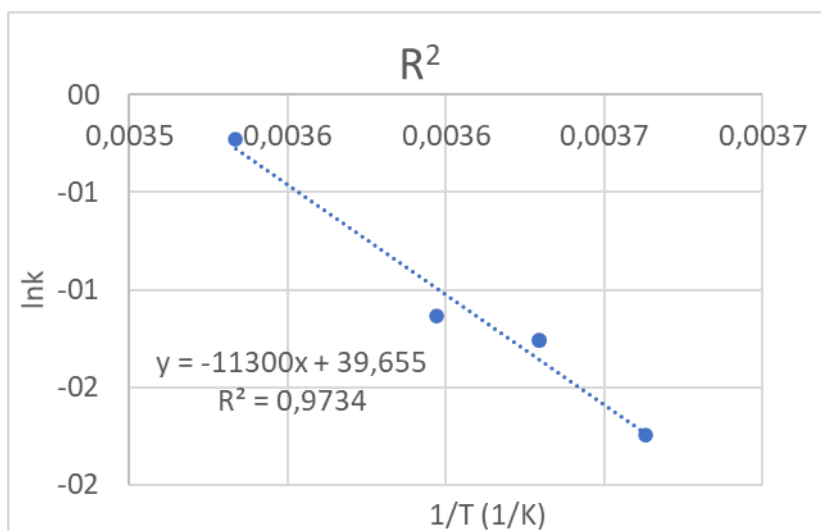
5°C	AIR	0,9991 ± 0,0767	
	MAP	0,8214 ± 0,1047	6,57 ± 0,86
	MAP-PAD1	0,7902 ± 0,0665	5,73 ± 0,06
	MAP-PAD2	0,5589 ± 0,0678	3,62 ± 0,80
10°C	AIR	1,4265 ± 0,0973	
	MAP	1,6167 ± 0,2890	
	MAP-PAD1	1,1460 ± 0,0181	
	MAP-PAD2	1,0930 ± 0,0791	

Οι ρυθμοί ανάπτυξης της *Shewanella*, όπως και των υπόλοιπων μικροοργανισμών είναι μεγαλύτεροι στα δείγματα που είναι αποθηκευμένα σε συσκευασία με αέρα. Επιπλέον και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται η σημαντική επίδραση που έχει η χρήση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα στην επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης των συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

Συνοψίζοντας, οι ρυθμοί ανάπτυξης όλων των μικροοργανισμών και για κάθε συνθήκη συσκευασίας, αυξάνονται με αύξηση της θερμοκρασίας. Η ταχύτερη ανάπτυξη για κάθε μικροοργανισμό, παρατηρείται στα δείγματα που είναι συσκευασμένα σε αέρα. Η θετική επίδραση της χρήσης της ενεργής συσκευασίας έναντι των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, φαίνεται ιδιαίτερα στην περίπτωση του ολικού μικροβιακού φορτίου, το οποίο είναι και αυτό που καθορίζει το χρόνο ζωής των ιχθυηρών, των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο, τα οποία επηρεάζουν σημαντικά και την οργανοληπτική υποβάθμιση ιδιαίτερα την οσμή του προϊόντος, και των ψευδομονάδων στις χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην περίπτωση των εντεροβακτηρίων.

5.2.3 Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης

Μέσω των ρυθμών ανάπτυξης των μικροοργανισμών από την εξίσωση Arrhenius, όπως αναλύθηκε και στο Κεφάλαιο 4, υπολογίζονται οι ενέργειες ενεργοποίησης για κάθε μικροοργανισμό και κάθε συνθήκη, με θερμοκρασία αναφοράς τους 4°C. Η ενέργεια ενεργοποίησης δείχνει την εξάρτηση από τη θερμοκρασία των ρυθμών ανάπτυξης για κάθε μικροοργανισμό που μελετήθηκε και για κάθε συνθήκη αποθήκευσης.



Διάγραμμα 17: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στα συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και με τη χρήση PAD2

Στο Διάγραμμα 17, παρουσιάζεται η εξίσωση που προκύπτει από την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας για τα δείγματα MAP-PAD1. Τα υπόλοιπα διαγράμματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα. Από τα διαγράμματα Arrhenius, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) για κάθε μικροοργανισμό και κάθε συνθήκη, και παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Ενέργεια ενεργοποίησης για κάθε μικροοργανισμό και συνθήκη αποθήκευσης

	$E_a \left(\frac{kJ}{mol} \right)$			
Συσκευασία	TVC	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	Shewanella
AIR	83,10	87,26	120,67	80,06
MAP	63,45	86,17	76,66	91,10
MAP-PAD 1	84,41	47,83	65,84	83,75
MAP-PAD 2	93,95	59,00	86,49	96,29

5.2.4 Προσδιορισμός χρόνου ζωής

Ο προσδιορισμός του χρόνου ζωής γίνεται μέσω των αποτελεσμάτων του TVC, καθώς η βιβλιογραφία αναφέρει πως στα περισσότερα είδη θαλάσσιων ψαριών, συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και υπό ψύξη, ο αλλοιογόνος μικροοργανισμός που κυριαρχεί της αλλοίωσης είναι το *Photobacterium phosphoreum*, στο σύνολο της μικροχλωρίδας, λόγω της υψηλής αντοχής του στο διοξείδιο του άνθρακα. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του παρατηρήθηκε για επίπεδα μεγαλύτερα του φορτίου 10^7 CFU/g στα αλλοιωμένα προϊόντα (Daalgard *et al.*, 1996).

Επομένως, ο χρόνος ζωής (shelf life) του ολόκληρου λαβρακιού υπολογίστηκε βασιζόμενος στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, με αποδεκτό όριο αλλοίωσης την τιμή $7 \log(\text{CFU})/\text{g}$, από την εξίσωση (4.11),

$$t_{SL} = t_r + t_{lagphase} \quad (4.11)$$

Η διατηρησιμότητα των διαφορετικών δειγμάτων στις διάφορες θερμοκρασίες, όπως αυτή υπολογίστηκε με βάση το παραπάνω όριο, παρατίθεται στον Πίνακα 17,

Πίνακας 17: Χρόνος ζωής για τα δείγματα ολόκληρου λαβρακιού σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης και συνθήκη συσκευασίας

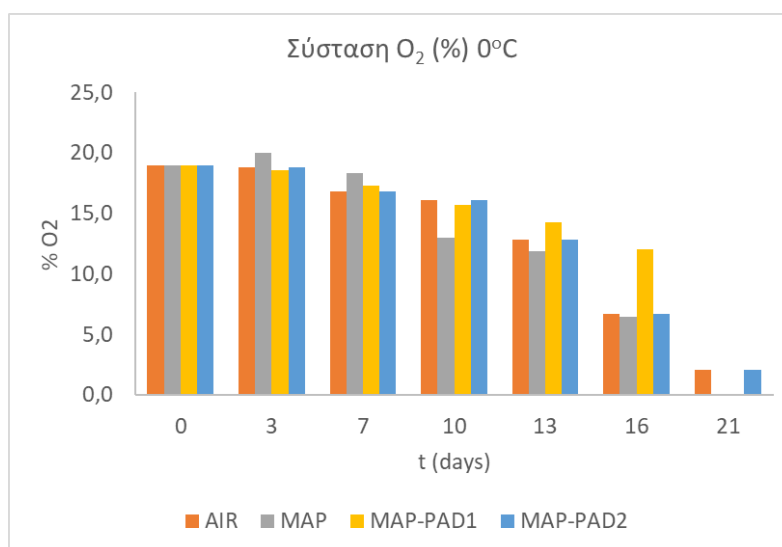
T (°C)	Συσκευασία	Shelf life (d)
0°C	AIR	9
	MAP	14
	MAP-PAD1	18
	MAP-PAD2	18
2,5°C	AIR	6
	MAP	8
	MAP-PAD1	10
	MAP-PAD2	9
5°C	AIR	4
	MAP	7
	MAP-PAD1	7
	MAP-PAD2	8
10°C	AIR	2
	MAP	3
	MAP-PAD1	3
	MAP-PAD2	3

Όπως φαίνεται, αλλά είναι και αναμενόμενο, εμφανίζονται μεγαλύτεροι χρόνοι ζωής στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, καθώς και μεγαλύτεροι χρόνοι ζωής τόσο στα δείγματα που είναι συσκευασμένα σε τροποποιημένες συνθήκες, έναντι εκείνων που

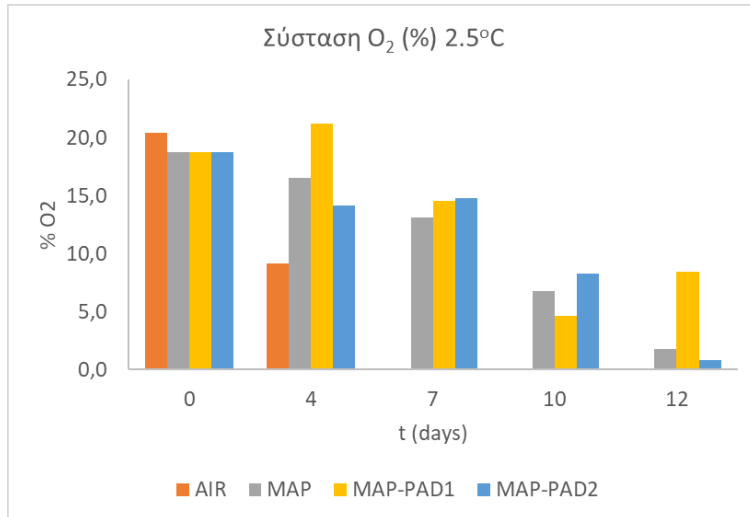
είναι σε αέρα, όσο και σε εκείνα που εκτός από τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι συσκευασμένα και με τη χρήση εκπομπών CO₂ (PADs). Συγκεκριμένα, η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας, έναντι αέρα, μπορεί να αυξήσει το χρόνο ζωής κατά τουλάχιστον 2 με 3 ημέρες, ενώ η χρήση PAD σε συνδυασμό με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα, μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε διπλασιασμό του χρόνου ζωής, σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως φαίνεται, για παράδειγμα, στους 0°C αλλά και στους 5°C. Συγκρίνοντας τη χρήση των PADs έναντι της συσκευασίας με τη τροποποιημένη ατμόσφαιρα, στους 10°C δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στους χρόνους ζωής λόγω της ταχύτερης ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Αντιθέτως, η μεγάλη συνεισφορά της ενεργής συσκευασίας έναντι του MAP φαίνεται στις υπόλοιπες θερμοκρασίες αφού το PAD1 οδήγησε σε επέκταση του χρόνου κατά 25-30% (έως 4 μέρες), ενώ το PAD2 οδήγησε σε επέκταση του χρόνου κατά 12.5-30% (1-4 μέρες).

5.2.5 Μέτρηση της μεταβολής αέριας σύστασης

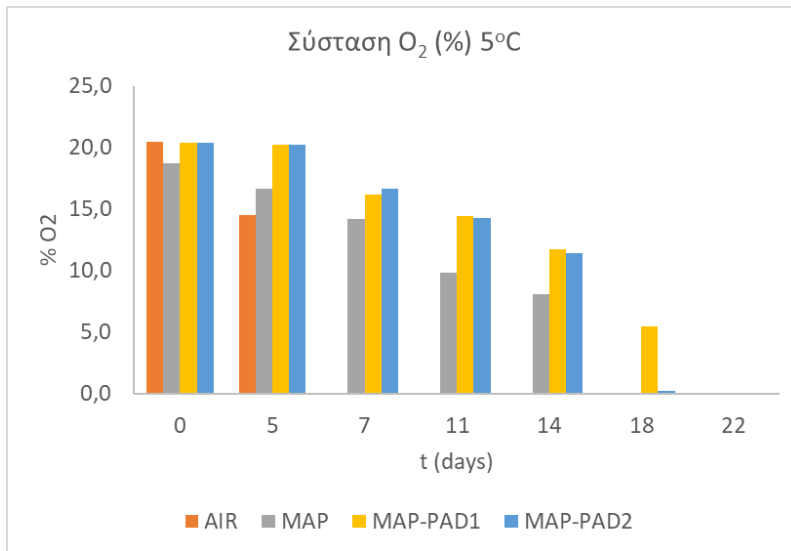
Ο δείκτης που θα μελετηθεί σε αυτό το κεφάλαιο, είναι η αέρια σύσταση, η οποία μετρούνταν πριν από κάθε δειγματοληψία. Στα διαγράμματα που παρουσιάζονται, φαίνεται η μεταβολή στη σύσταση (%) του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης.



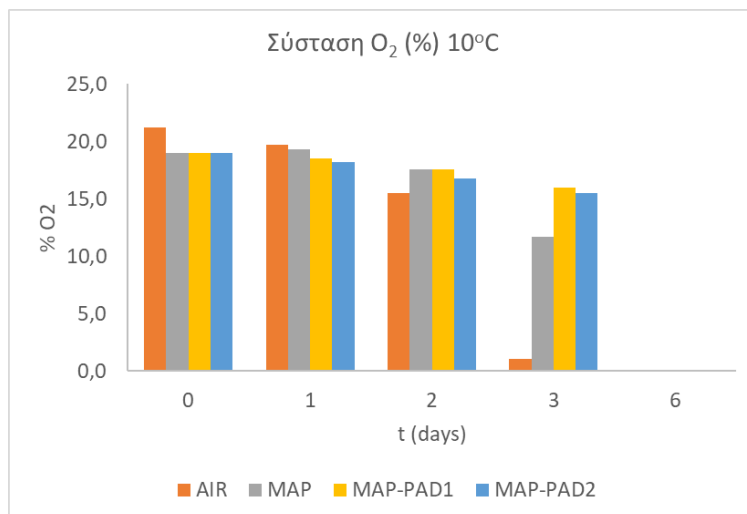
Διάγραμμα 18: Μεταβολή σύστασης O₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 0°C



Διάγραμμα 19: Μεταβολή σύστασης O₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 2,5°C

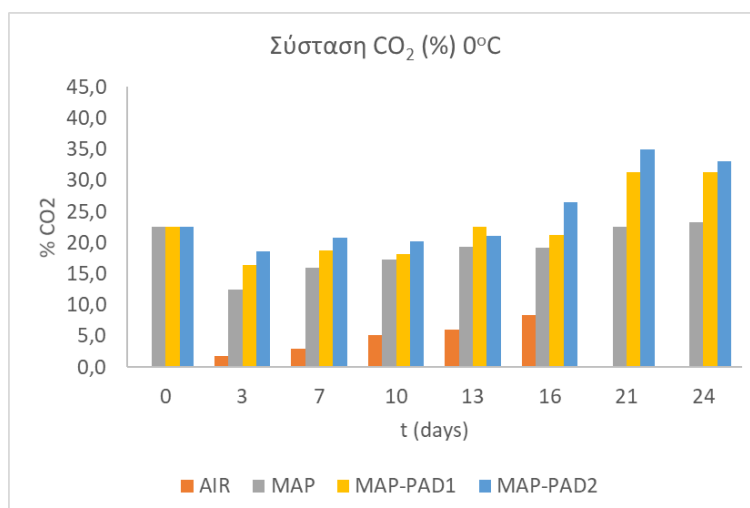


Διάγραμμα 20: Μεταβολή σύστασης O₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 5°C

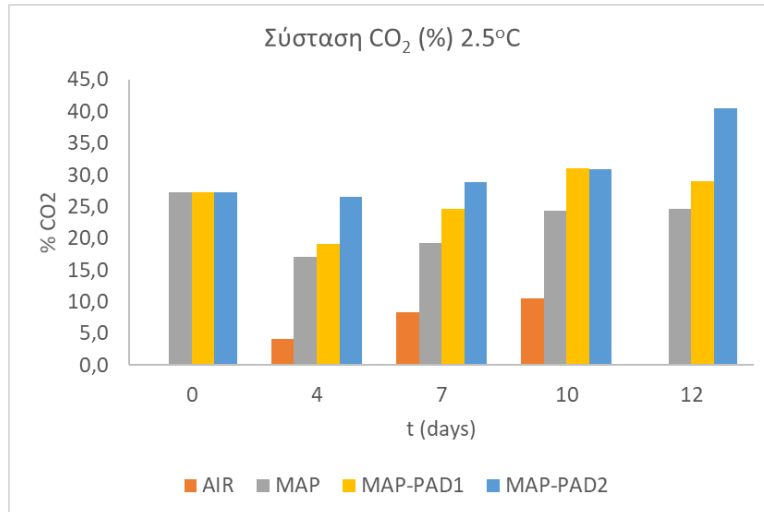


Διάγραμμα 21: Μεταβολή σύστασης O₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 10°C

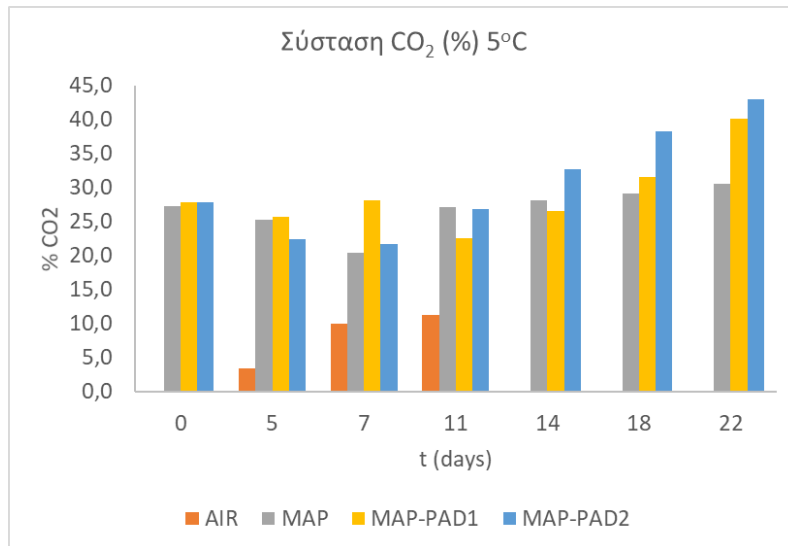
Η αρχική σύσταση του οξυγόνου ήταν ίση με 21% για τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε αέρα και 19-20% για τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, η σύσταση του οξυγόνου μειώνεται σε όλη τη διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων λαβρακιού και μηδενίζεται σε όλες τις συνθήκες προς το τέλος του χρόνου αποθήκευσης. Το οξυγόνο είναι το κύριο συστατικό το οποίο λαμβάνει χώρα στις περισσότερες αντιδράσεις αλλοίωσης, ενώ είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών (TVC, ψευδομονάδες). Επομένως παρατηρείται καλή συσχέτιση αυτών των δεδομένων με τα συμπεράσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης, δηλαδή η μείωση του οξυγόνου είναι εντονότερη στα δείγματα του αέρα και λιγότερο έντονη στα συσκευασμένα με PADs δείγματα. Τέλος ταχύτερη μείωση οξυγόνου παρατηρείται με την αύξηση της θερμοκρασίας για όλα τα διαφορετικά συσκευασμένα προϊόντα, γεγονός το οποίο οφείλεται στην ταχύτερη ανάπτυξη των μικροοργανισμών.



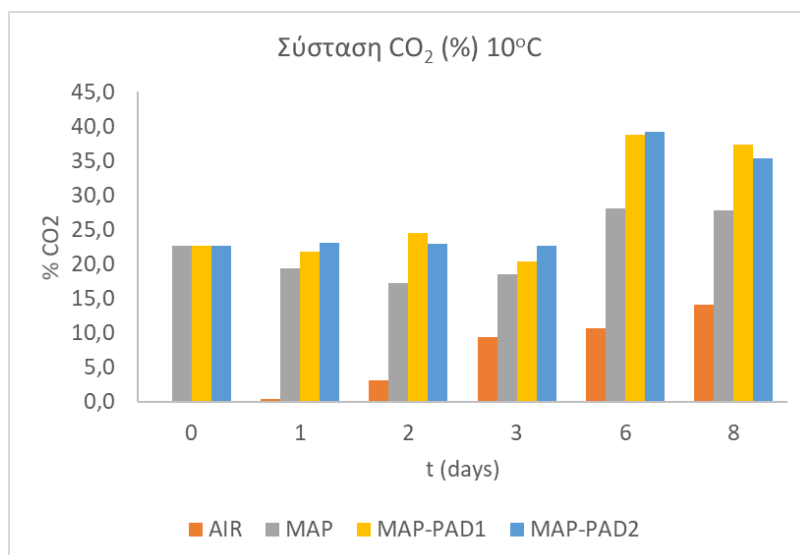
Διάγραμμα 22: : Μεταβολή σύστασης CO₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 0°C



Διάγραμμα 23: Μεταβολή σύστασης CO₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 2,5°C



Διάγραμμα 24: Μεταβολή σύστασης CO₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 5°C

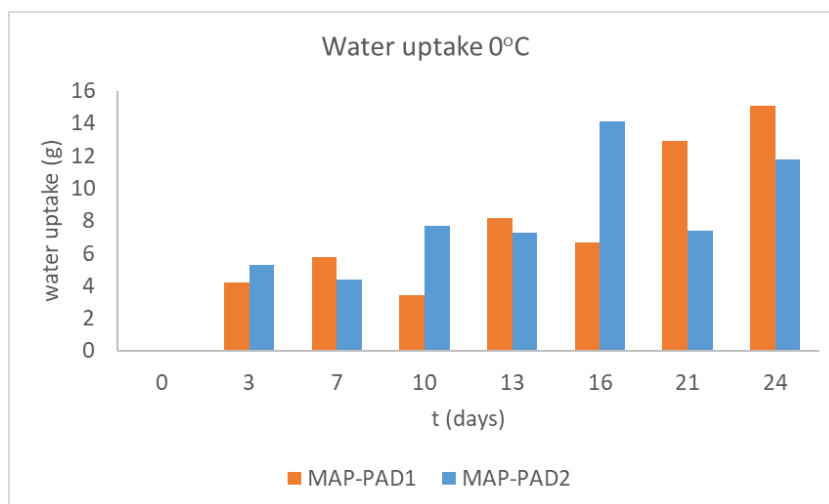


Διάγραμμα 25: Μεταβολή σύστασης CO₂ για κάθε συνθήκη συσκευασίας στους 10°C

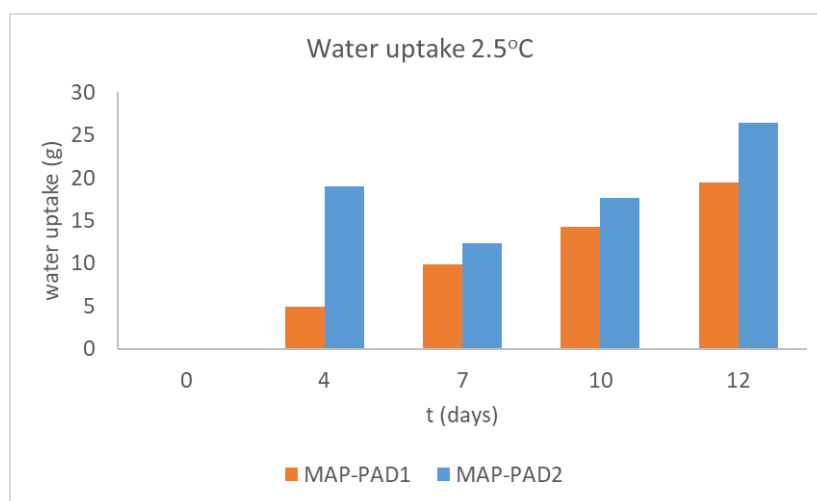
Το διοξείδιο του άνθρακα, στα δείγματα που είναι συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ξεκινά από το 22-27% ανάλογα με τις συνθήκες, αρχικά με την πάροδο του χρόνου ζωής μειώνεται, ενώ στη συνέχεια, αυξάνεται. Για τα MAP δείγματα η εμφάνιση του ελάχιστου σημείου εμφανίζεται νωρίτερα στο χρόνο αποθήκευσης αλλά και φτάνει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα δείγματα με τη χρήση PAD, όπως και αναμενόταν. Επιπλέον, η χρήση εκπομπών CO₂ (PADs) στα δείγματα, οδήγησε σε συγκέντρωση CO₂ στη συσκευασία σε τιμή 35-40%, ενώ στα MAP δείγματα δεν ξεπέρασε το 25% σε όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε CO₂ οφείλεται στην παρουσία των PADs τα οποία απορροφούν τα υγρά που αποβάλλονται από τα δείγματα με την αποθήκευση, τα οποία αντιδρούν με τα συστατικά των PAD εκλύοντας CO₂ στη συσκευασία. Κατά τις πρώτες μέρες αποθήκευσης των δειγμάτων όπου η μικροβιακή ανάπτυξη ήταν περιορισμένη, η μείωση του διοξειδίου του άνθρακα οφείλεται σε διαλυτοποίηση του στη σάρκα του ιχθύος. Στη συνέχεια, λόγω των μεταβολικών αντιδράσεων των μικροοργανισμών οι οποίοι εισέρχονται στην εκθετική φάση, παράγεται CO₂ αυξάνοντας τη συγκέντρωση του σημαντικά. Η ίδια τάση του CO₂ έχει παρατηρηθεί σε δείγματα ολόκληρου λαβρακιού συσκευασμένου σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με διαφορετική αρχική αέρια σύσταση (50% CO₂, 10% O₂, 40% N₂) (Tsironi et al., 2019). Από την άλλη, στα δείγματα που είναι συσκευασμένα με αέρα, η περιεκτικότητα της συσκευασίας σε CO₂ ξεκινάει από μηδενική σύσταση και αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια αποθήκευσης. Να σημειωθεί ότι η δειγματοληψία των δειγμάτων σε αέρα ολοκληρώθηκε νωρίτερα από τα δείγματα της τροποποιημένης ατμόσφαιρας και για αυτό το λόγο στα διαγράμματα σταματάει νωρίτερα η απεικόνιση του CO₂.

5.2.6 Μέτρηση μεταβολής της πρόσληψης υγρασίας από τα PAD

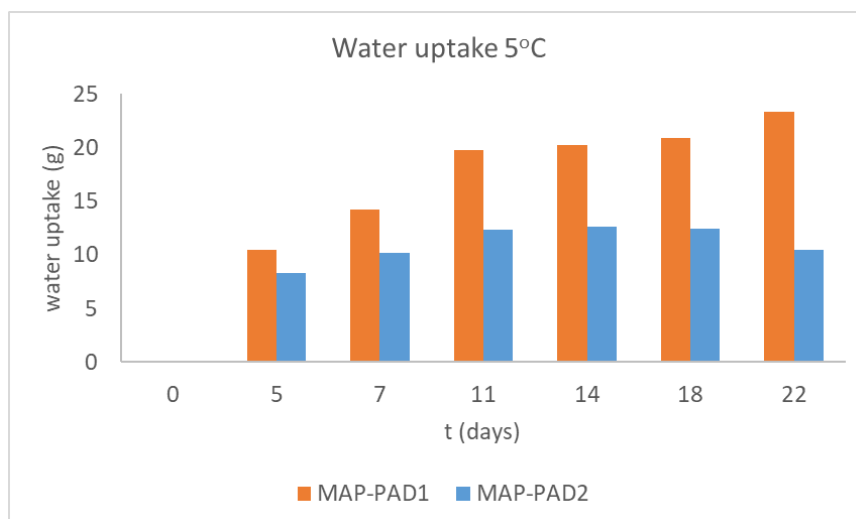
Ο δείκτης που μελετάται σε αυτήν την παράγραφο, είναι η μεταβολή υγρασίας (αύξηση του βάρους) των PADs που χρησιμοποιήθηκαν στις συσκευασίες. Τα είδη των εκπομπών CO₂ που χρησιμοποιήθηκαν, αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 4.3.2.



Διάγραμμα 26: Μεταβολή απορρόφησης υγρασίας των PAD στους 0°C

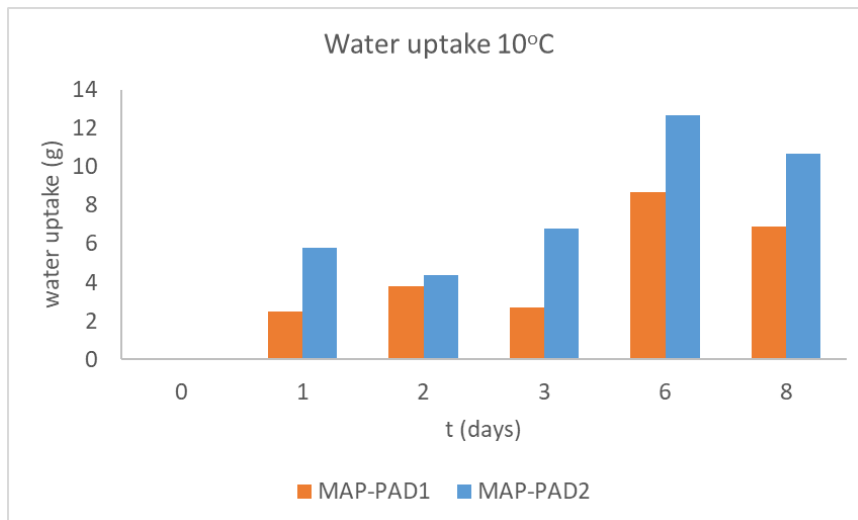


Διάγραμμα 27: Μεταβολή απορρόφησης υγρασίας των PAD στους 2,5°C



Διάγραμμα 28: Μεταβολή απορρόφησης υγρασίας των PAD στους 5°C

:

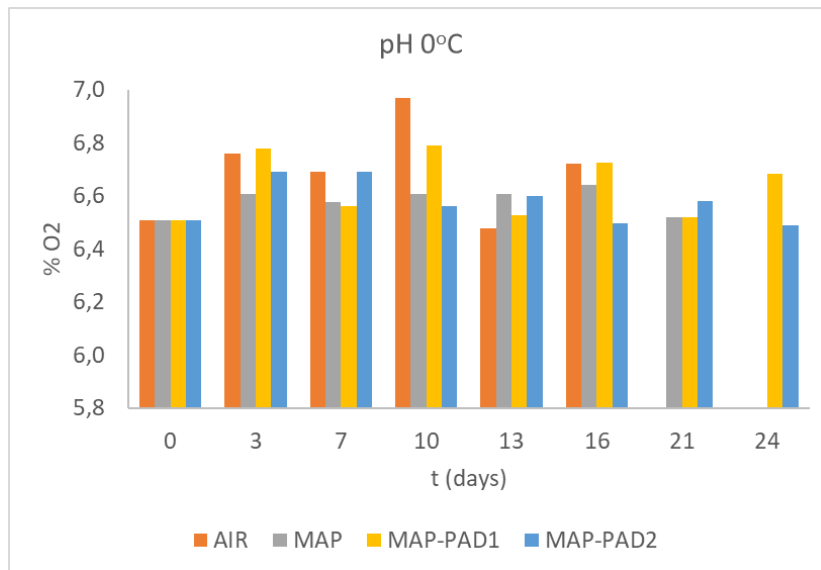


Διάγραμμα 29: Μεταβολή απορρόφησης υγρασίας των PAD στους 10°C

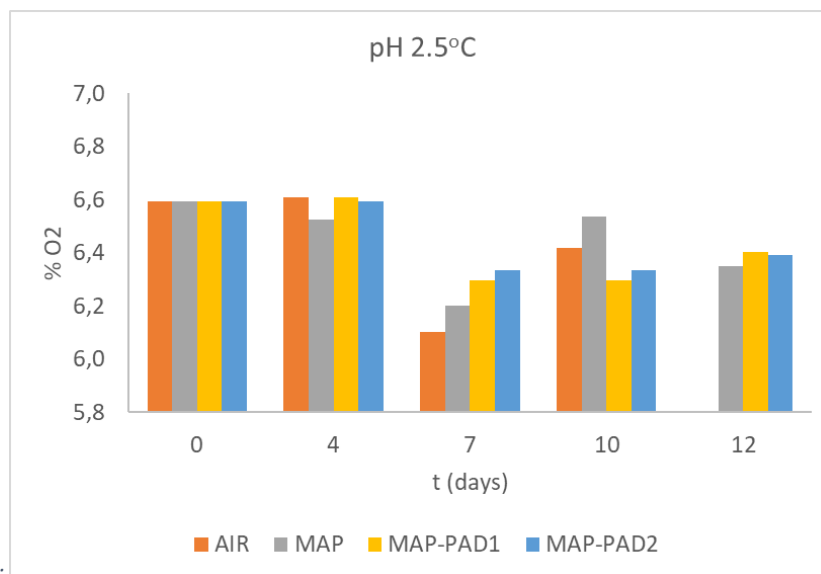
Η μεταβολή της απορρόφησης νερού του κάθε διαφορετικού είδους PAD, πιθανώς να διαφέρει λόγω της πιθανής διαφοράς βάρους των δειγμάτων λαβρακιού σε κάθε συσκευασία. Η απορρόφηση της υγρασίας, σταδιακά αυξάνεται σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης, όπως είναι αναμενόμενο. Στις θερμοκρασίες 0, 2,5 και 10°C, είναι μεγαλύτερη η απορρόφηση του PAD2, όπως είναι λογικό, δεδομένου ότι έχει μεγαλύτερες διαστάσεις. Σε αντίθεση με τους 5°C, που φαίνεται να έχει μεγαλύτερη απορρόφηση το PAD1. Οι εκπομπές CO₂ που έχουν τοποθετηθεί στον πυθμένα της συσκευασίας του τρόφιμου, διαδραματίζουν διπλό ρόλο, αρχικά απορροφούν τα υγρά που απορρέουν (driploss) και στη συνέχεια διατηρούν τα επίπεδα CO₂ σε υψηλές συγκεντρώσεις στο εσωτερικό της συσκευασίας. Σε αυτό το διπλό ρόλο τους βασίζεται η ικανότητα τους να αυξάνουν τη διατηρησιμότητα των συσκευασμένων τροφίμων.

5.2.7 Μέτρηση μεταβολής του pH

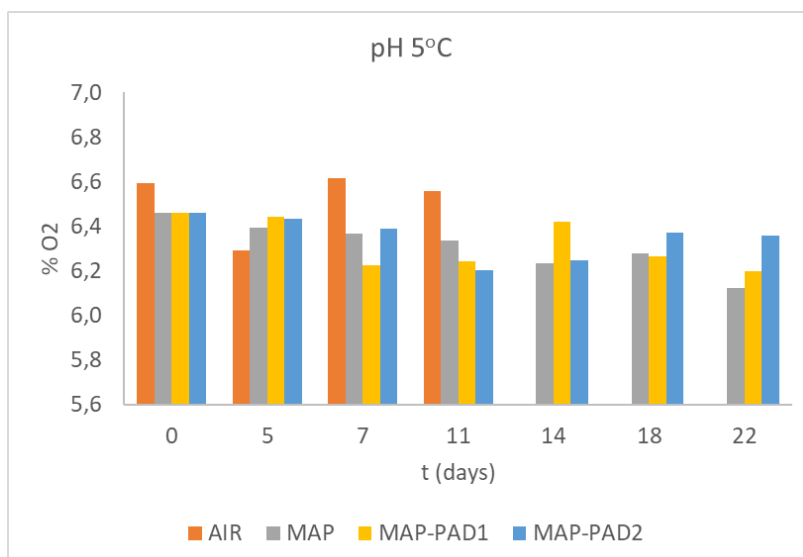
Σε αυτό το κεφάλαιο θα μελετηθεί η μεταβολή του pH. Αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη της ποιότητας των ιχθυηρών, καθώς αυξάνεται η τιμή του μέσω μεταβολικών αντιδράσεων, κατά την υποβάθμιση της ποιότητας.



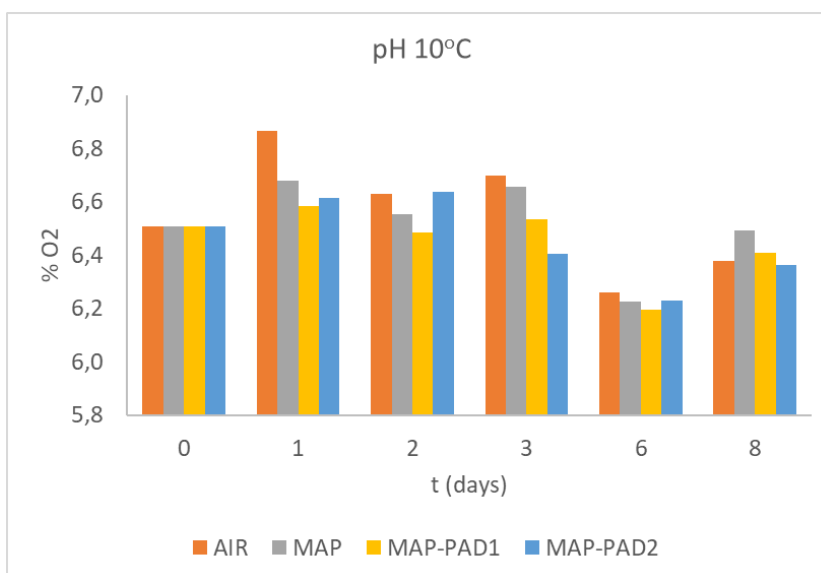
Διάγραμμα 30: Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 0°C



Διάγραμμα 31: Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης σε θερμοκρασία 2,5°C



Διάγραμμα 32: Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 5°C

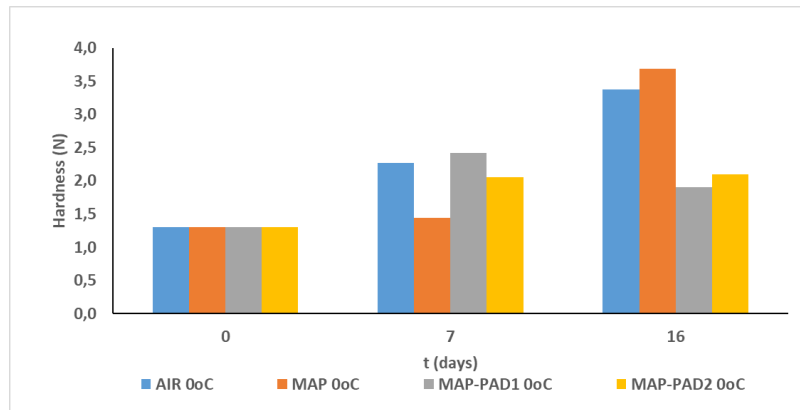


Διάγραμμα 33: Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 10°C

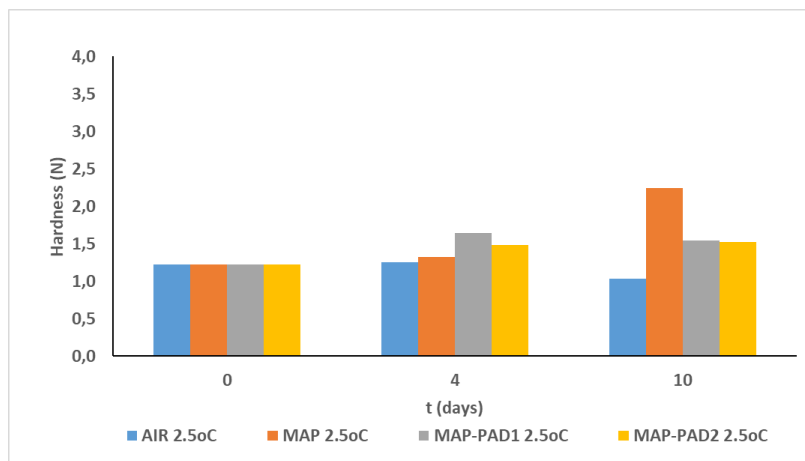
Από τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρούνται αυξομειώσεις στην τιμή του pH, σε κάθε θερμοκρασία. Η αρχική τιμή του pH κυμαίνεται μεταξύ 6,5-6,6. Στη συνέχεια, ειδικά για τις θερμοκρασίες των 2.5°C, 5°C και 10°C παρατηρείται τις πρώτες ημέρες αποθήκευσης μία μικρή πτώση του pH έως την τιμή 6.2 και στη συνέχεια αυξάνεται εκ νέου. Η αρχική μείωση του pH θα μπορούσε να αποδοθεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά τη νεκρική ακαμψία, ενώ η ακολουθούμενη αύξηση της τιμής πιθανόν οφείλεται σε μεταβολικές δραστηριότητες που συμβαίνουν στον μυϊκό ιστό του λαβρακιού και συγκεκριμένα στην παραγωγή βασικών μεταβολικών προϊόντων από τους αλλιογόνους μικροοργανισμούς όπως οι ψευδομονάδες (Alparslan et al., 2012; Gram and Huss, 1996).

5.2.8 Ανάλυση μεταβολής υφής

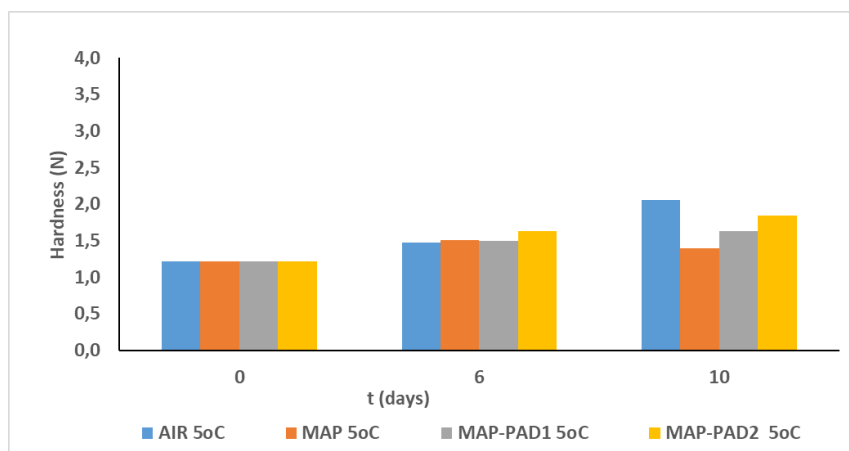
Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται η ανάλυση της υφής, όπου εξετάστηκε και θα παρουσιαστεί η σκληρότητα και η προσκολλησιμότητα στα δείγματα του ολόκληρου λαβρακιού. Στα επόμενα διαγράμματα, αυτής της παραγράφου, εμφανίζονται ενδεικτικά 3 τιμές σκληρότητας και προσκολλησιμότητας σε κάθε δείγμα οι οποίες αντιστοιχούν στην αρχική, την τελική και μία ενδιάμεση ημέρα δειγματοληψίας.



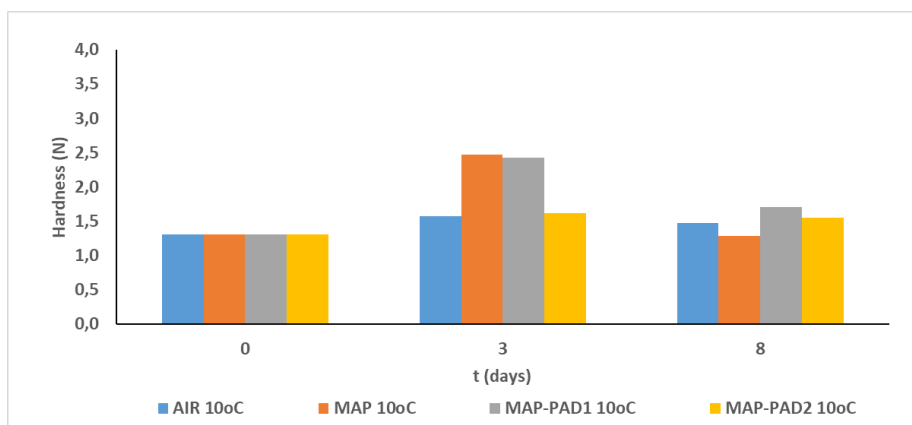
Διάγραμμα 34: Μεταβολή σκληρότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0°C



Διάγραμμα 35: Μεταβολή σκληρότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 2,5°C

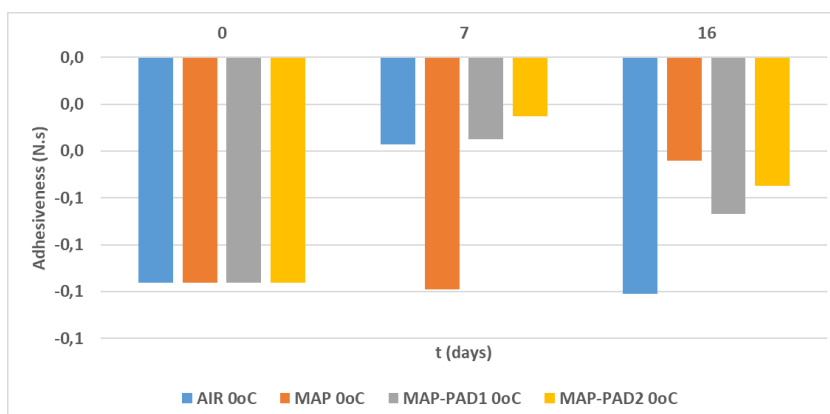


Διάγραμμα 36: Μεταβολή σκληρότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 5°C

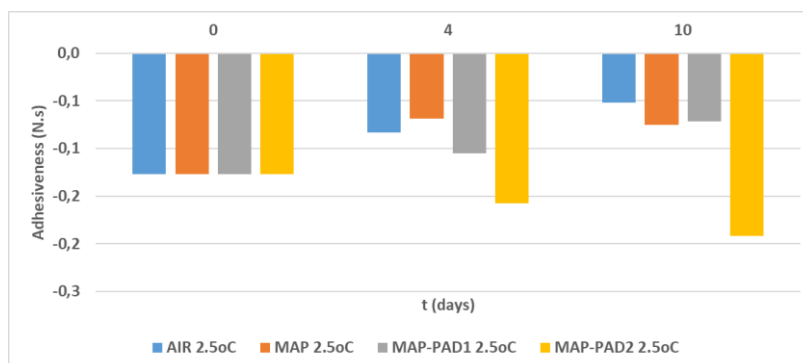


Διάγραμμα 37: Μεταβολή σκληρότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 10°C

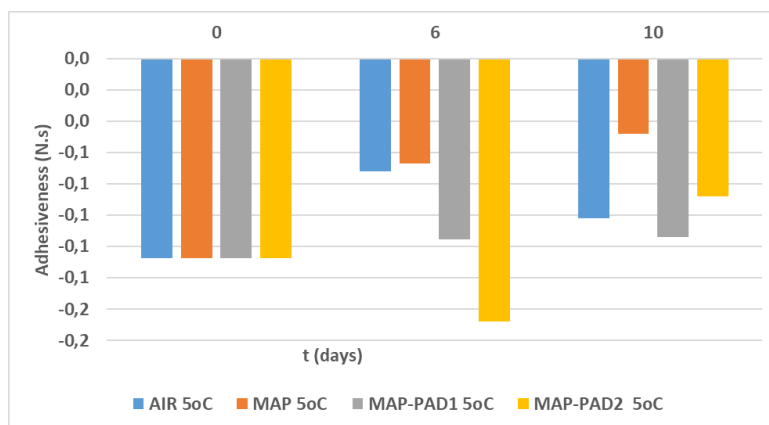
Όπως φαίνεται, για τις θερμοκρασίες, πέραν της θερμοκρασίας 10°C, η σκληρότητα των δειγμάτων, κατά κύριο λόγο, αυξάνεται. Αυτό είναι λογικό, καθώς όπως έχει αναλυθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, λόγω αντιδράσεων στους μυϊκούς ιστούς του ψαριού, συγκεκριμένα, λόγω της κατανάλωσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω μεταβολικών διεργασιών κατά την υποβάθμιση της ποιότητας, μειώνεται η συγκέντρωση του ATP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη μείωση της ελαστικότητας του μυϊκού ιστού του ψαριού και επομένως η σάρκα του γίνεται σκληρότερη (Belitz *et al.*, 2009).



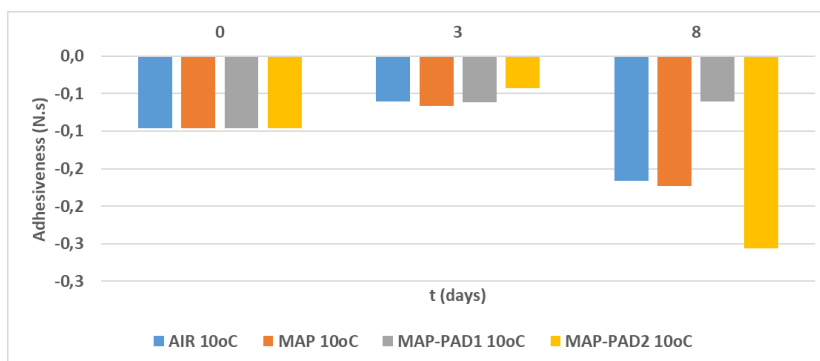
Διάγραμμα 38: Μεταβολή προσκολλησιμότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0°C



Διάγραμμα 39: Μεταβολή προσκολλησιμότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 2,5°C



Διάγραμμα 40: Μεταβολή προσκολλησιμότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 5°C

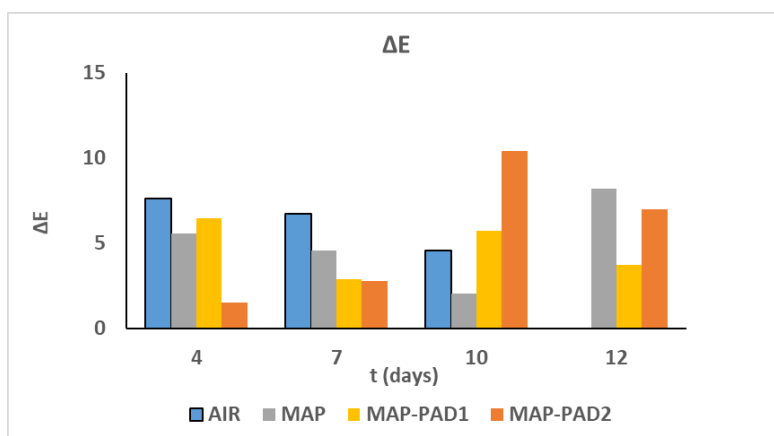


Διάγραμμα 41: Μεταβολή προσκολλησιμότητας σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 10°C

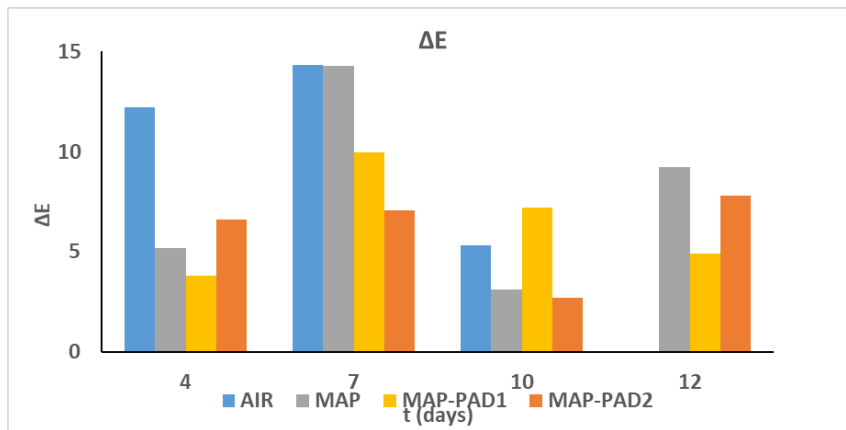
Για την προσκολλησιμότητα δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συγκεκριμένο αποτέλεσμα, καθώς σε όλες τις συνθήκες και θερμοκρασίες υπάρχουν αυξομειώσεις και δεν υπάρχει κάποια τάση.

5.2.9 Ανάλυση μεταβολής χρώματος

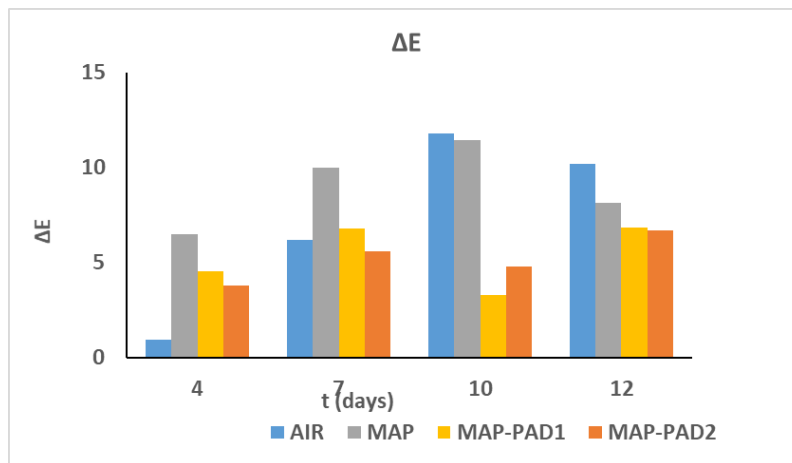
Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται η μεταβολή του χρώματος, όπως μετρήθηκε μετά από κάθε δειγματοληψία. Στα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 42-44), εμφανίζεται η μεταβολή του συνολικού δείκτη χρώματος ΔΕ για κάθε συνθήκη συσκευασίας και για κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης.



Διάγραμμα 42: Μεταβολή του δείκτη χρώματος ΔΕ σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 2.5°C



Διάγραμμα 43: Μεταβολή του δείκτη χρώματος ΔΕ σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 5°C

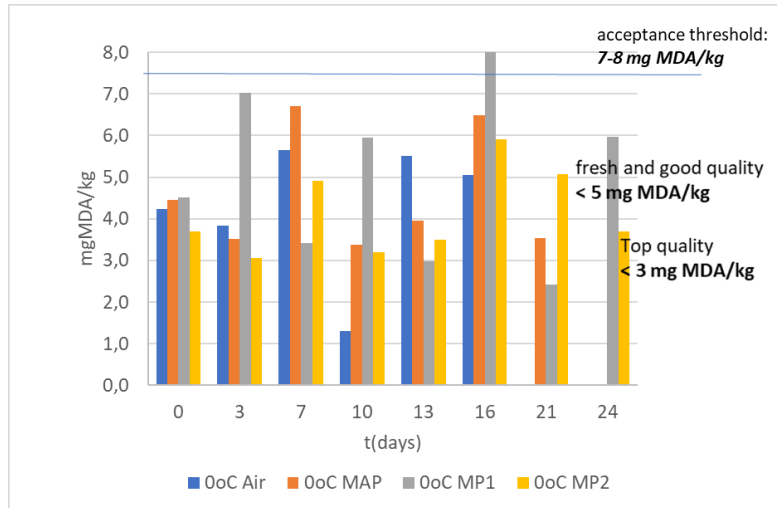


Διάγραμμα 44: Μεταβολή του δείκτη χρώματος ΔΕ σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 10°C

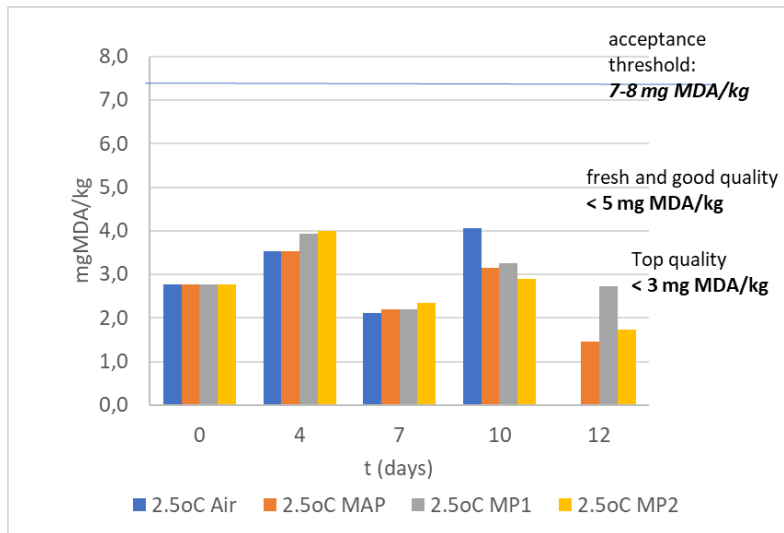
Από τα διαγράμματα της μεταβολής του δείκτη ΔΕ, παρατηρούνται αυξομειώσεις σε όλες τις συνθήκες συσκευασίας, και δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο γενικότερο συμπέρασμα αναφορικά με τις διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης και συνθήκες συσκευασίας.

5.2.10 Μελέτη μεταβολής των λιπαρών οξέων

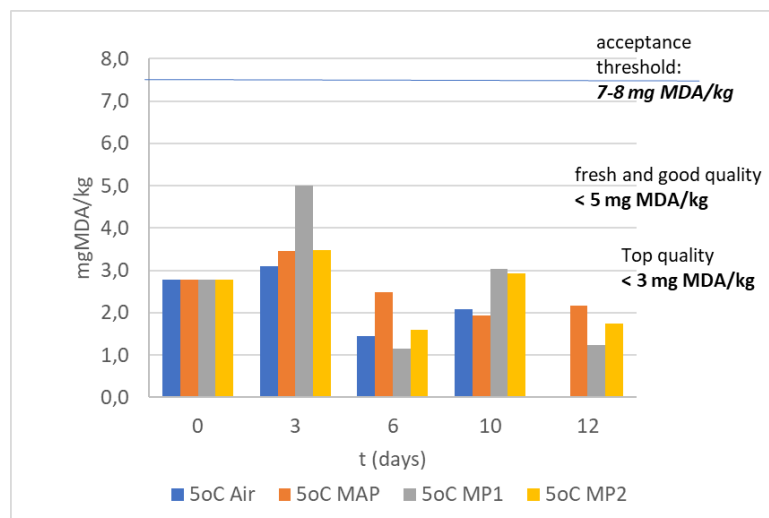
Ο δείκτης που θα μελετηθεί παρακάτω είναι η οξείδωση των λιπαρών οξέων, που αποτελεί σημαντικό φαινόμενο, καθώς όπως έχει αναφερθεί στην Ενότητα 5.1 το λαβράκι περιέχει περίπου 8% λιπαρά στη σάρκα του και οι οξειδώσεις που μπορούν να προκληθούν, συμβαίνουν έντονα στα ιχθυηρά και αποτελούν δείκτη ποιότητας αυτών των προϊόντων. Σε προϊόντα ιχθυηρών άριστης ποιότητας έχουν παρατηρηθεί τιμές μικρότερες των 3 mg μηλονικής αλδεΐδης (MDA) ανά kg ιχθυηρού, σε καλής ποιότητας προϊόντα τιμές μικρότερες των 5 mg MDA/kg, ενώ το όριο αποδοχής προς κατανάλωση προϊόντων κυμαίνεται μεταξύ 7-8 mg MDA/kg (Tsironi, 2010). Με αυτή τη λογική, έχουν τοποθετηθεί τα αντίστοιχα όρια στα διαγράμματα.



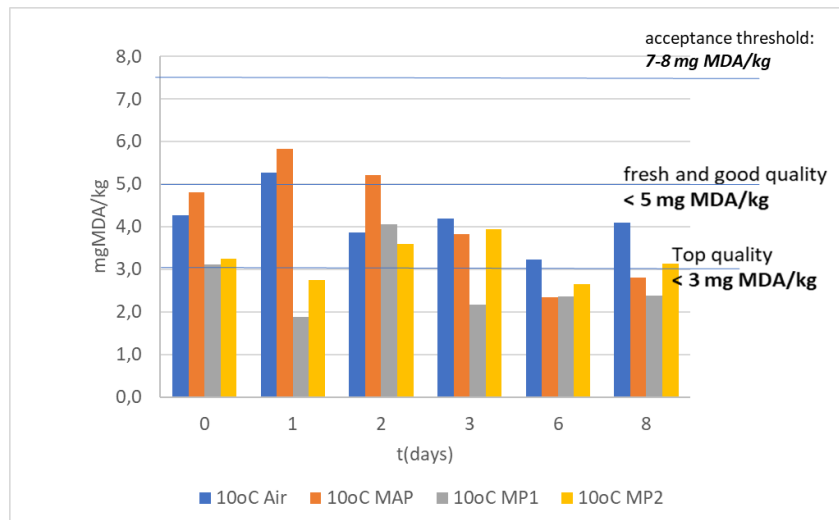
Διάγραμμα 45: Μεταβολή της οξείδωσης λιπαρών σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0°C



Διάγραμμα 46: Μεταβολή της οξείδωσης λιπαρών σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 2,5°C



Διάγραμμα 47: Μεταβολή της οξείδωσης λιπαρών σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 5°C



Διάγραμμα 48: Μεταβολή της οξείδωσης λιπαρών σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 10°C

Όπως είναι αντιληπτό από τα διαγράμματα, δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συγκεκριμένο αποτέλεσμα, καθώς υπάρχουν αυξομειώσεις της οξείδωσης των λιπαρών σε συνάρτηση με το χρόνο. Επομένως, δεν μπορεί να αποτελέσει δείκτη για τον προσδιορισμό της ποιότητας στα δείγματα λαβρακιού που μελετήθηκαν. Παρόλα αυτά, όπως παρατηρείται δεν ξεπερνά καμία συνθήκη και σε καμία θερμοκρασία αποθήκευσης το όριο κατανάλωσης που κυμαίνεται μεταξύ 7-8 mg MDA/kg, και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν ξεπερνά ούτε το όριο της καλής ποιότητας, δηλαδή εμφανίζονται τιμές μικρότερες των 5 mg MDA/kg.

5.3 Μελέτη διατηρησιμότητας και ποιότητας φιλέτου λαβρακιού

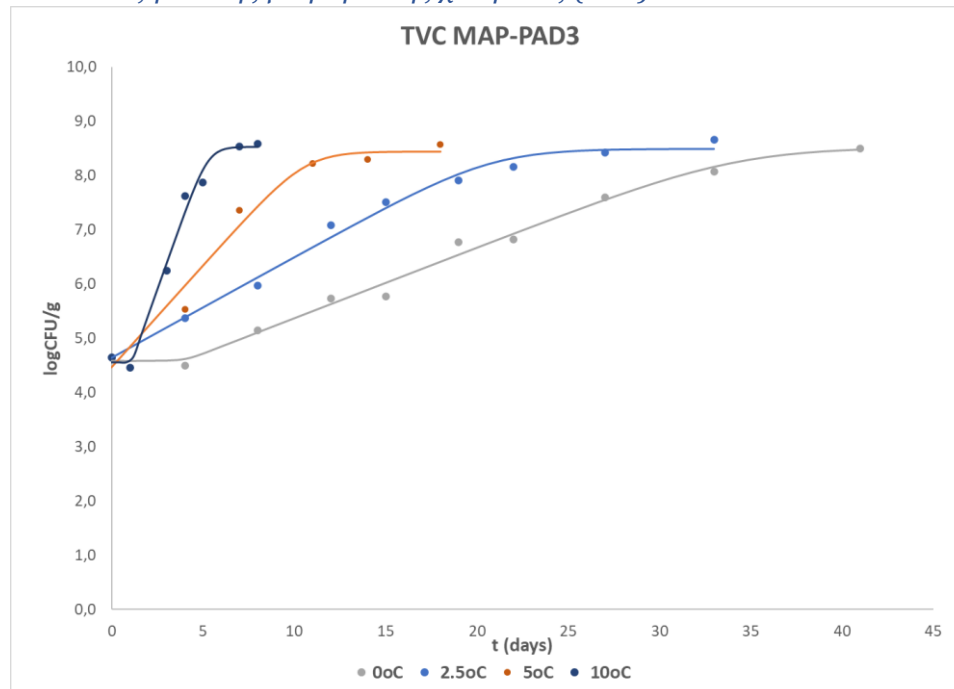
5.3.1 Μελέτη μικροβιακής ανάλυσης

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα διαγράμματα ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το χρόνο και τις θερμοκρασίες αποθήκευσης. Οι θερμοκρασίες αποθήκευσης ήταν 0, 2,5, 5 και 10°C και οι συνθήκες συσκευασίας ήταν τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση PAD, με κωδικοποίηση ως PAD3, με όγκο εκλυόμενου CO₂ 120mL.

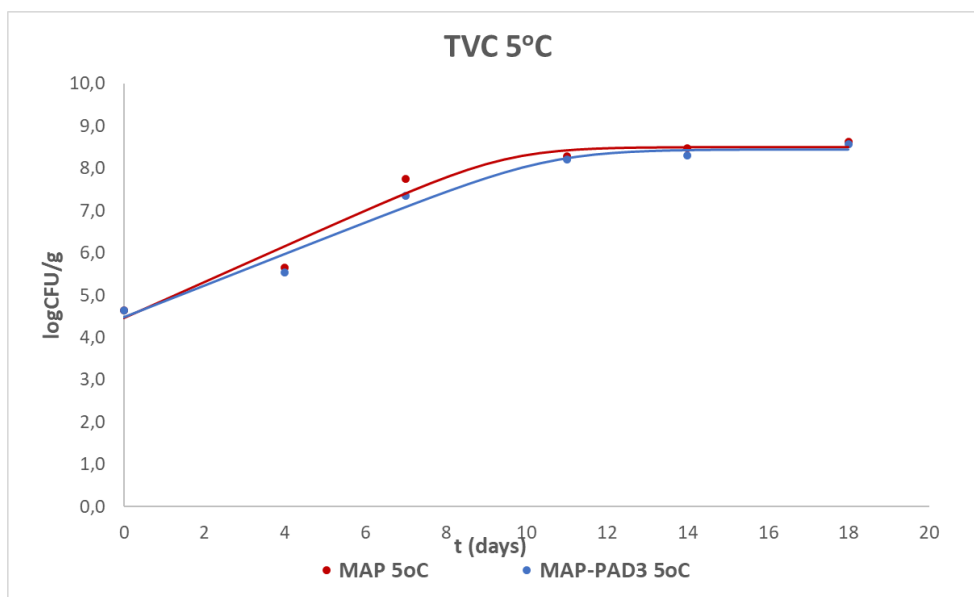
Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν, όπως και στο ολόκληρο λαβράκι, ήταν η ολική μικροβιακή χλωρίδα (TVC), οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.), τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.), τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (*Shewanella Putrefaciens*) και τα γαλακτικά βακτήρια. Ομοίως με την ανάλυση στα δείγματα του ολόκληρου λαβρακιού, η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης (<1.0 log(CFU)/g) για όλες τις θερμοκρασίες, επομένως δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στην παρούσα εργασία.

Για κάθε μικροοργανισμό παρουσιάζονται τα διαγράμματα, όπου τα σημεία αποτελούν τις πειραματικές τιμές, και οι συνεχείς γραμμές προκύπτουν από την εφαρμογή του μοντέλου Baranyi.

5.3.1.1 Ανάπτυξη Ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC)



Διάγραμμα 49: Μεταβολή ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2,5, 5 και 10°C για τα δείγματα με τη χρήση PAD3



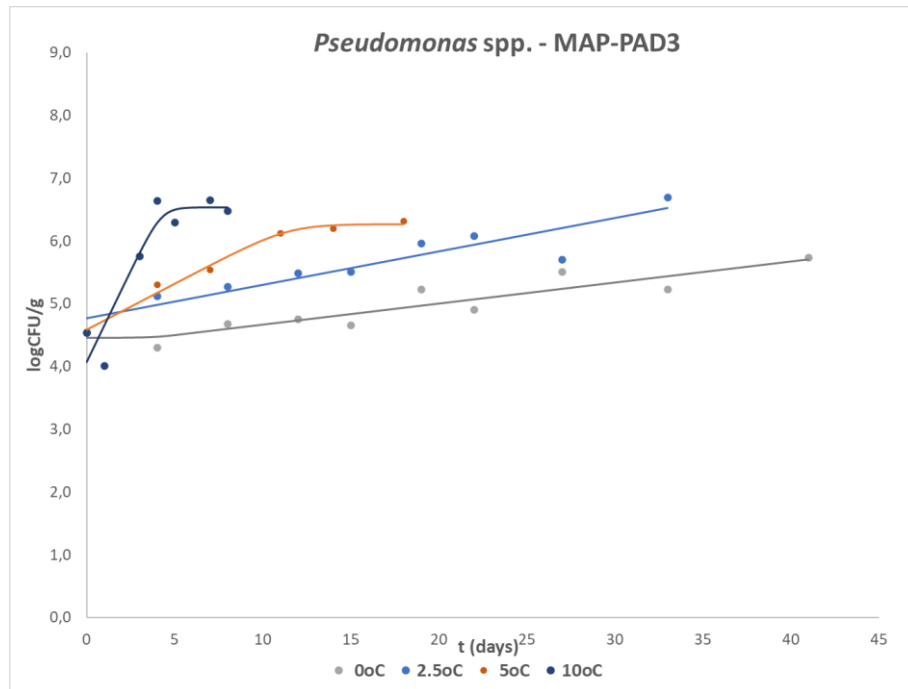
Διάγραμμα 50: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) σε θερμοκρασία 5°C για τα δείγματα συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση (MAP-PAD3) και χωρίς PAD (MAP)

Στο Διάγραμμα 49, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, στα συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και με τη χρήση εκπομπών CO₂ δείγματα φιλέτου λαβρακιού σε όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης. Όπως είναι αναμενόμενο ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης φαίνεται στους 10°C (μπλε γραμμή), με τιμή 0,955 d⁻¹, ενώ ακολουθούν με μικρότερους ρυθμούς διαδοχικά οι θερμοκρασίες 5 (πορτοκαλί γραμμή), 2,5 (γαλάζια γραμμή) και 0°C (γκρι γραμμή), με ρυθμούς 0,375, 0,185 και 0,130 d⁻¹. Αναλυτικότερα, οι ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας καθώς και η λανθάνουσα φάση φαίνονται στον Πίνακα 18 στο κεφάλαιο 5.3.2.

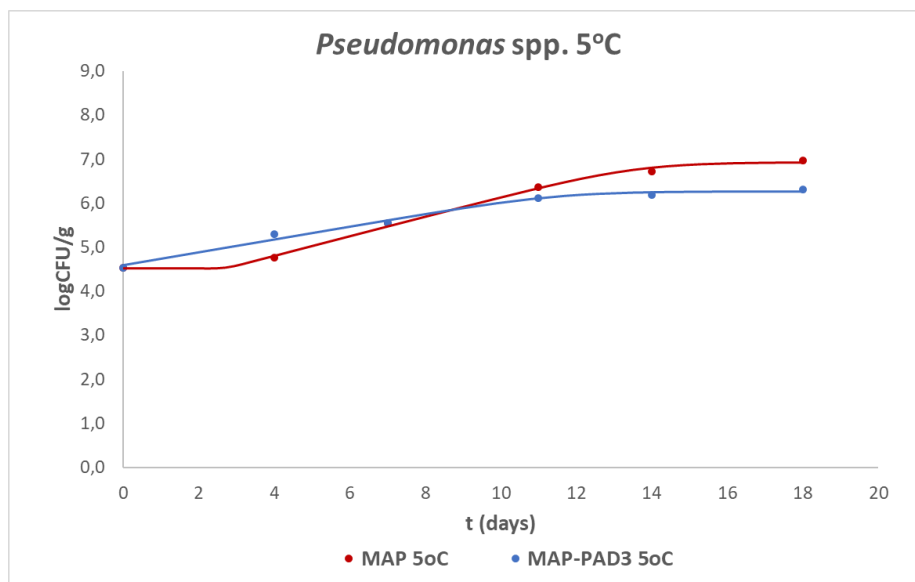
Το αρχικό μικροβιακό φορτίο είναι 4,5 log(CFU)/g και παρατηρείται λανθάνουσα φάση στους 0°C περίπου 5 μέρες, καθώς και στους 10°C 1 ημέρα. Η φάση στασιμότητας εμφανίζεται σε όλες τις θερμοκρασίες μεταξύ 8-8,5 log(CFU)/g.

Στο Διάγραμμα 50, εμφανίζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση PAD3 (γαλάζια γραμμή) συγκριτικά με τα αποτελέσματα των δειγμάτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα χωρίς τη χρήση PAD (κόκκινη γραμμή), που αποτελεί το δείγμα MAP. Όπως είναι εμφανές, το δείγμα MAP εμφανίζει μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης, ίσο με 0,426 d⁻¹, από το αντίστοιχο δείγμα με τη χρήση του PAD. Η φάση στασιμότητάς τους εμφανίζεται μεταξύ 8-8,5 log(CFU)/g. Επομένως, φαίνεται πως η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας με χρήση PAD, είναι αποτελεσματική στην επιβράδυνση της ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, η οποία αποτελεί τον κυρίαρχο αλλοιογόνο μικροοργανισμό.

5.3.1.2 Ανάπτυξη των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*)



Διάγραμμα 51: Μεταβολή ανάπτυξης των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2,5, 5 και 10°C για τα δείγματα με τη χρήση PAD3



Διάγραμμα 52: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) σε θερμοκρασία 5°C για συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση (MAP-PAD3) και χωρίς PAD (MAP)

Στο Διάγραμμα 51, φαίνεται η μεταβολή στην ανάπτυξη των ψευδομονάδων, η οποία παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με την ολική μικροβιακή χλωρίδα, δηλαδή

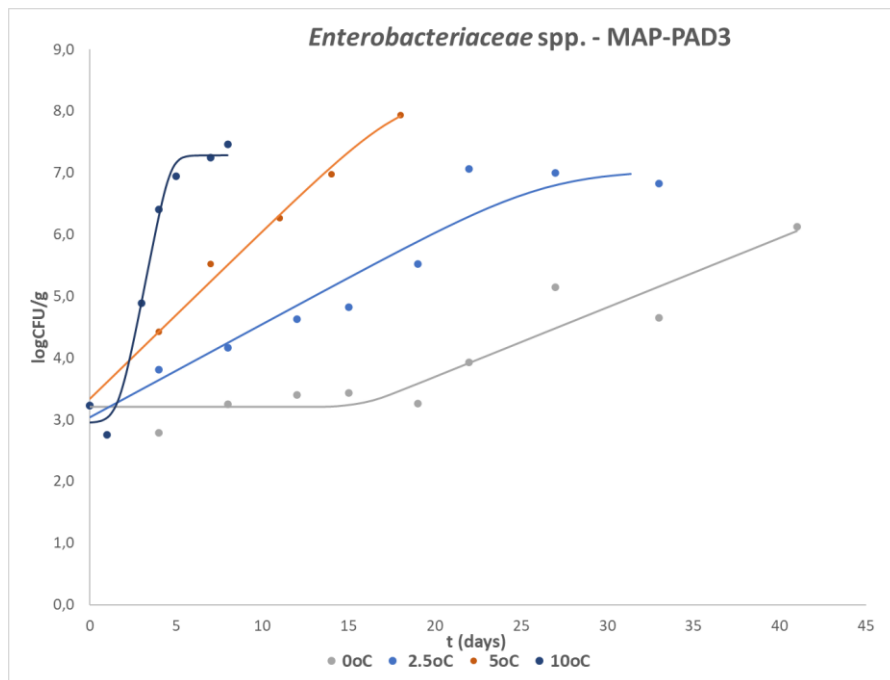
όπως αναμενόταν η πιο αργή ανάπτυξη παρατηρείται στη χαμηλότερη θερμοκρασία αποθήκευσης, δηλαδή στους 0°C, με τιμή 0,034 d^{-1} , όπου εμφανίζεται και λανθάνουσα φάση 4 ημερών, ενώ η μεγαλύτερη ανάπτυξη παρατηρείται στους 10°C, με ρυθμό 0,582 d^{-1} . Στον Πίνακα 19, στο κεφάλαιο 5.3.2 φαίνονται και αναλυτικότερα οι ρυθμοί ανάπτυξης των ψευδομονάδων, σε όλες τις θερμοκρασίες.

Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κυμαίνεται μεταξύ 4-4,5 log(CFU)/g, ενώ η φάση στασιμότητας σε όλες τις θερμοκρασίες δεν ξεπερνά την τιμή 7 log(CFU)/g.

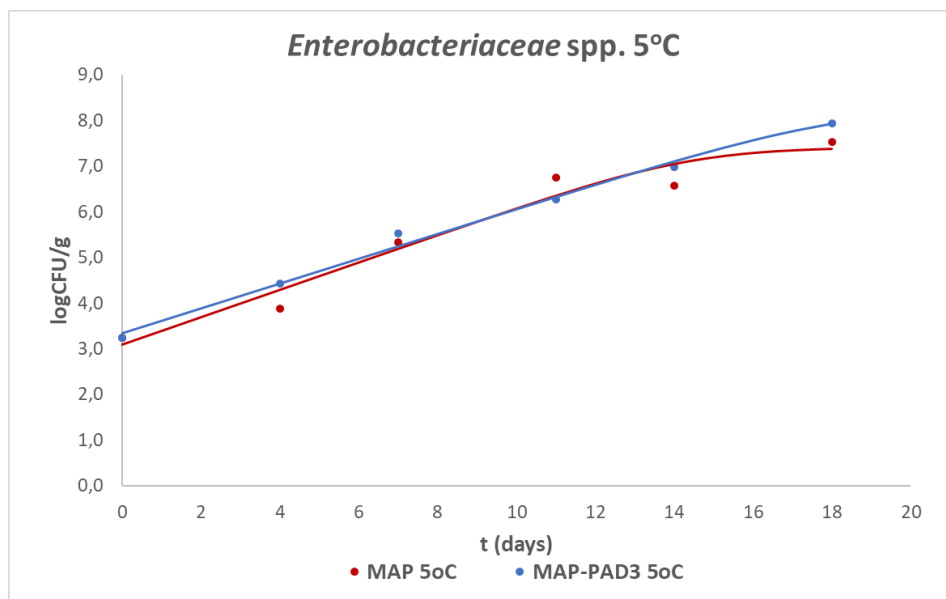
Στο συγκριτικό Διάγραμμα 52, ο ρυθμός ανάπτυξης του συσκευασμένου δείγματος με τη χρήση εκπομπέα CO₂ είναι πιο αργός από τον αντίστοιχο του συσκευασμένου σε ίδιες συνθήκες χωρίς τη χρήση του PAD, που έχει τιμή 0,222 d^{-1} . Η φάση στασιμότητας του δείγματος χωρίς τη χρήση PAD φτάνει περίπου σε τιμή 7 log(CFU)/g, ενώ με τη χρήση PAD3 σε τιμή 6 log(CFU)/g. Το MAP δείγμα εμφανίζει λανθάνουσα φάση 3 ημερών, ωστόσο ο ρυθμός ανάπτυξης στην εκθετική είναι σημαντικά μεγαλύτερος.

Συμπεραίνεται, επομένως, ότι όπως για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, έτσι και για τις ψευδομονάδες, ο συνδυασμός της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας και των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα, συμβάλλει στην μείωση του ρυθμού ανάπτυξης τους. Τα δύο αυτά είδη αλλοιογόνων μικροοργανισμών, συγκεκριμένα, κυριαρχούν, συνήθως, στην αλλοίωση των ιχθύων. Όπως έχει αναφερθεί και σε δημοσιευμένες μελέτες, η χρήση του διοξειδίου του άνθρακα στη συσκευασία των ιχθύων, συμβάλλει στην μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών και άλλων αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Dalgaard, 1995; Tsironi *et al.*, 2019).

5.3.1.3 Ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.)



Διάγραμμα 53: Μεταβολή ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.) σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2,5, 5 και 10°C για τα δείγματα με τη χρήση PAD3



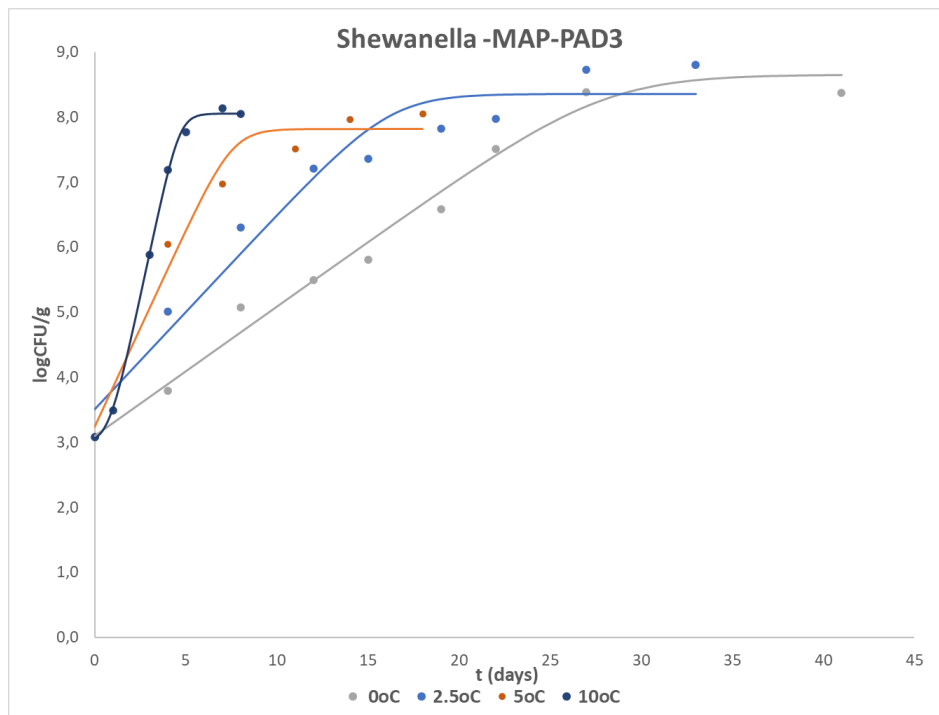
Διάγραμμα 54: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.) σε θερμοκρασία 5°C για συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση (MAP-PAD3) και χωρίς PAD (MAP).

Στο Διάγραμμα 53, όπως και στα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται πως ο ρυθμός ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Στους 0°C παρατηρείται λανθάνουσα φάση που φτάνει τις 15 ημέρες, ενώ στις υπόλοιπες συνθήκες αποθήκευσης δεν παρατηρήθηκε λανθάνουσα φάση.

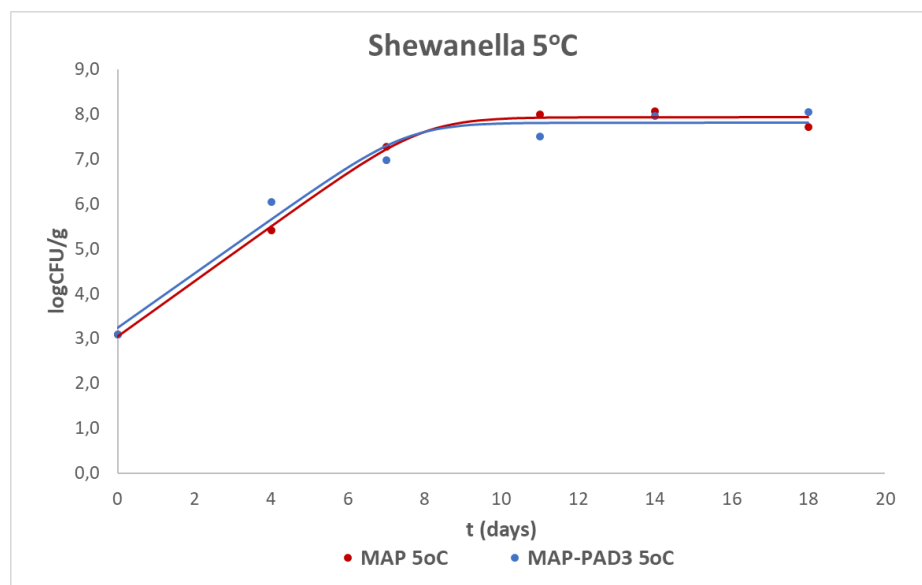
Η φάση στασιμότητας στις θερμοκρασίες 10 και 5°C είναι 7 και 8 log(CFU)/g ενώ στους 2,5 και 0°C 6 και 7 log(CFU)/g, αντίστοιχα.

Στο Διάγραμμα 54, παρατηρείται πως η διαφορά στους ρυθμούς ανάπτυξης μεταξύ των δύο συνθηκών συσκευασίας είναι πολύ μικρή, αλλά και πάλι μικρότερος ρυθμός εμφανίζεται στο δείγμα με τη χρήση του PAD, με τιμή $0,271 d^{-1}$. Οι ρυθμοί ανάπτυξης για τα εντεροβακτήρια, παρατίθενται στον Πίνακα 20.

5.3.1.4 Ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο H_2S (*Shewanella*)



Διάγραμμα 55: Μεταβολή ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2,5, 5 και 10°C για τα δείγματα με τη χρήση PAD3.



Διάγραμμα 56: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο σε θερμοκρασία 5°C για συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση (MAP-PAD3) και χωρίς PAD (MAP)

Παρομοίως με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, έτσι και η *Shewanella*, εμφανίζει πιο αργή ανάπτυξη στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, με αρχικό μικροβιακό φορτίο περίπου 3 log(CFU)/g και φάση στασιμότητας να κυμαίνεται μεταξύ 8-9 log(CFU)/g.

Τέλος, στο συγκριτικό Διάγραμμα 56, οι ρυθμοί ανάπτυξης είναι παραπλήσιοι, συγκεκριμένα για το δείγμα με τη χρήση PAD είναι $0,606 d^{-1}$ ενώ χωρίς είναι $0,613 d^{-1}$. Ακόμη, εμφανίζουν φάση στασιμότητας σε τιμή περίπου $8 \log(\text{CFU})/\text{g}$. Αναλυτικότερα οι ρυθμοί ανάπτυξης της *Shewanella* παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

5.3.2 Εφαρμογή μοντέλου Baranyi στα πειραματικά δεδομένα

Στο κεφάλαιο αυτό, παρατίθενται οι ρυθμοί ανάπτυξης των μικροοργανισμών και ο χρόνος λανθάνουσας φάσης του κάθε μικροοργανισμού για κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης, όπως υπολογίστηκαν από την εφαρμογή στο μοντέλο Baranyi.

Πίνακας 18: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας

TVC		
Συνθήκες αποθήκευσης	k (d^{-1})	t_{lag} (d)
MAP 5°C	$0,4255 \pm 0,0788$	
MAP-PAD3 0°C	$0,1304 \pm 0,0095$	$3,99 \pm 1,69$
MAP-PAD3 2,5°C	$0,1852 \pm 0,0116$	
MAP-PAD3 5°C	$0,3747 \pm 0,0612$	
MAP-PAD3 10°C	$0,9551 \pm 0,2243$	$1,10 \pm 0,70$

Στον Πίνακα 18, φαίνεται πως οι μικρότεροι ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας εμφανίζονται στα δείγματα που είναι αποθηκευμένα στις χαμηλότερες θερμοκρασίες. Μεταξύ της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 5°C και της ίδιας συσκευασίας με χρήση PAD, όπως φάνηκε και από τα διαγράμματα, ο ρυθμός με τη χρήση PAD είναι μικρότερος. Έτσι αναδεικνύεται ο σημαντικός ρόλος της χρήσης της ενεργής συσκευασίας στη μείωση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Πίνακας 19: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης των ψευδομονάδων.

<i>Pseudomonas</i> spp.		
Συνθήκες αποθήκευσης	k (d^{-1})	t_{lag} (d)
MAP 5°C	$0,2221 \pm 0,0179$	2.72 ± 0.61
MAP-PAD3 0°C	$0,0337 \pm 0,0075$	3.77 ± 2.31
MAP-PAD3 2,5°C	$0,0532 \pm 0,0169$	

MAP-PAD3 5°C	0,1463 ± 0,0160	
MAP-PAD3 10°C	0,5820 ± 0,1752	

Τα ίδια αποτελέσματα, παρατηρούνται και στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων. Οι ρυθμοί αυτοί, βέβαια, εμφανίζονται μικρότεροι από τους αντίστοιχους στην ολική μικροβιακή χλωρίδα.

Πίνακας 20: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης των εντεροβακτηρίων.

Enterobacteriaceae spp.		
Συνθήκες αποθήκευσης	k (d⁻¹)	t_{lag} (d)
MAP 5°C	0,3000 ± 0,0534	
MAP-PAD3 0°C	0,1124 ± 0,0219	15,69 ± 3,43
MAP-PAD3 2,5°C	0,1511 ± 0,0237	
MAP-PAD3 5°C	0,2711 ± 0,0189	
MAP-PAD3 10°C	1,4290 ± 0,4212	1,63 ± 0,61

Παρόμοια, στον Πίνακα 20 όπως φαίνεται, ο πιο αργός ρυθμός εμφανίζεται στους 0°C και ακολουθούν αυξανόμενοι διαδοχικά οι ρυθμοί στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες.

Πίνακας 21: Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι λανθάνουσας φάσης των μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο.

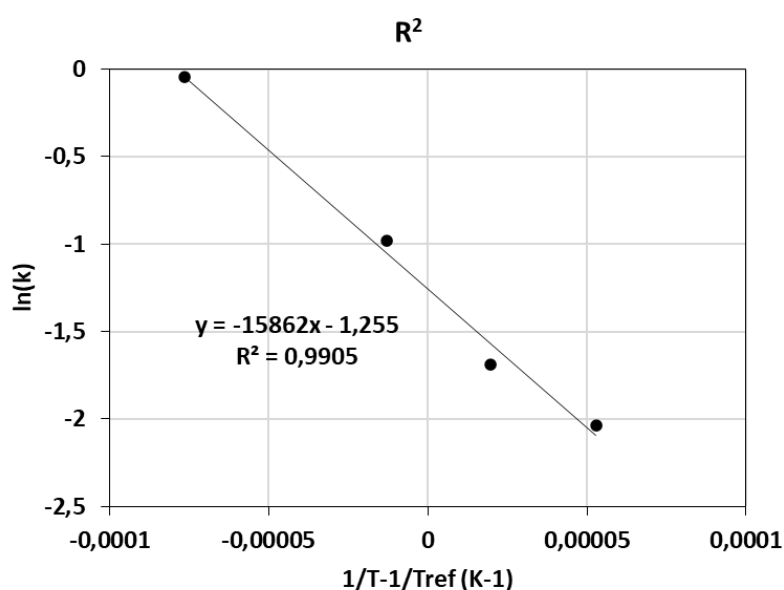
Shewanella		
Συνθήκες αποθήκευσης	k (d⁻¹)	t_{lag} (d)
MAP 5°C (Control)	0,6131 ± 0,0383	
MAP-PAD3 0°C	0,1987 ± 0,0135	
MAP-PAD3 2,5°C	0,2991 ± 0,0464	
MAP-PAD3 5°C	0,6055 ± 0,0956	
MAP-PAD3 10°C	1,3130 ± 0,1147	0,84 ± 0,26

Οι ρυθμοί ανάπτυξης της *Shewanella* παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, που παρουσιάστηκαν στους παραπάνω πίνακες, καθώς και στα αντίστοιχα διαγράμματα στο Κεφάλαιο 5.3.1.

Συνοπτικά, οι ρυθμοί ανάπτυξης των δειγμάτων αυξάνονται με αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης, επομένως, η ταχύτερη ανάπτυξη φαίνεται στους 10°C. Συγκρίνοντας στην θερμοκρασία 5°C, το δείγμα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με χρήση εκπομπέα διοξειδίου του άνθρακα (PAD3) και το αντίστοιχο MAP δείγμα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, παρατηρείται πως το PAD συμβάλλει στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης όλων των μελετώμενων μικροοργανισμών.

5.3.3 Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης

Από τους ρυθμούς που υπολογίστηκαν μέσω του μοντέλου Baranyi, από την εξίσωση Arrhenius υπολογίζεται η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) για τον ρυθμό ανάπτυξης όλων των μελετώμενων μικροοργανισμών για τα MAP-PAD3 δείγματα. Τα δείγματα MAP μελετήθηκαν σε μία συνθήκη αποθήκευσης και επομένως δεν είναι δυνατός ο υπολογισμός της E_a . Η εξίσωση Arrhenius για τους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, απεικονίζεται στο Διάγραμμα 57, από την οποία προσδιορίζεται η E_a . Τα υπόλοιπα διαγράμματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα.



Διάγραμμα 57: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας

Στη συνέχεια παρατίθενται στον Πίνακα 22, η ενέργεια ενεργοποίησης για όλους τους υπόλοιπους μελετώμενους μικροοργανισμούς. Παρατηρείται ότι οι τιμές της E_a είναι σημαντικά μεγαλύτερες συγκριτικά με τις τιμές του ολόκληρου λαβρακιού, δηλαδή υπάρχει μεγαλύτερη θερμοκρασιακή εξάρτηση των ρυθμών ανάπτυξης μικροοργανισμών στην περίπτωση του φιλέτου.

Πίνακας 22: Ενέργεια ενεργοποίησης ανάπτυξης των μικροοργανισμών για τα δείγματα φιλέτου.

	$E_A \left(\frac{kJ}{mol} \right)$			
	TVC	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	Shewanella
MAP-PAD3	131,88	189,33	167,99	124,30

5.3.4 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής

Όπως στο ολόκληρο λαβράκι, έτσι και στο φιλέτο λαβρακιού, ο χρόνος ζωής υπολογίστηκε μέσω των ρυθμών ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, καθώς η ανάπτυξη της ήταν σε επίπεδα τέτοια, ώστε να θεωρηθεί ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός. Οι υπολογισμένοι χρόνοι ζωής παρουσιάζονται στον Πίνακα 23. Και στην περίπτωση του φιλέτου, ο χρόνος ζωής (shelf life) υπολογίστηκε βασιζόμενος στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, με αποδεκτό όριο αλλοίωσης την τιμή $7 \log(\text{CFU})/\text{g}$, από την εξίσωση (4.11).

$$t_{SL} = t_r + t_{lagphase} \quad (4.11)$$

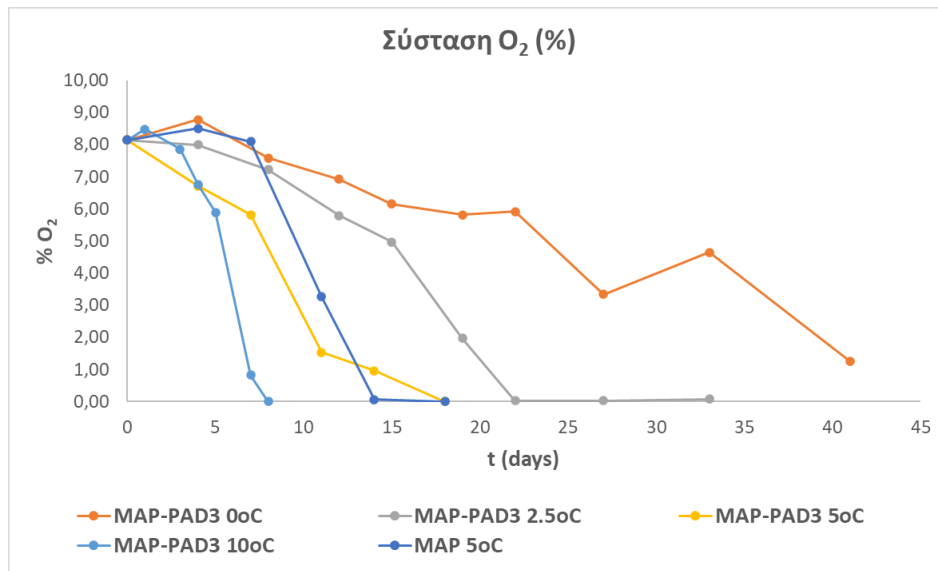
Πίνακας 23: Χρόνος ζωής για τα δείγματα φιλέτου λαβρακιού σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης.

	Shelf life (d)
MAP-PAD3 0°C	22
MAP-PAD3 2,5°C	13
MAP-PAD3 5°C	6
MAP 5°C	5
MAP-PAD3 10°C	4

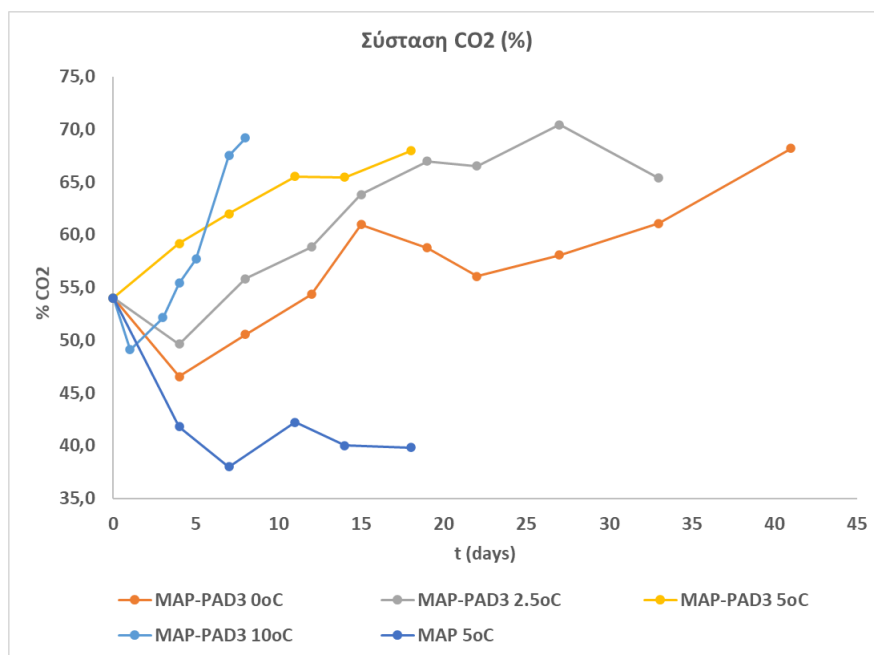
Όπως γίνεται αντιληπτό, στις χαμηλότερες θερμοκρασίες εμφανίζονται πολύ μεγαλύτεροι χρόνοι ζωής συγκριτικά με τις υψηλότερες, όπως οι 10°C. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό, καθώς όπως έχει αναλυθεί και στα προηγούμενα κεφάλαια, τα ιχθυηρά αποτελούν ευαλλοίωτα προϊόντα με μεγάλη εξάρτηση από τη θερμοκρασία καθώς και από τις συνθήκες στις οποίες συσκευάζονται. Στο φιλέτο λαβρακιού, η συνεισφορά της ενεργής συσκευασίας έναντι του MAP φαίνεται στους 5°C αφού το PAD3 οδήγησε σε επέκταση του χρόνου κατά 20%.

5.3.5 Μέτρηση μεταβολής αέριας σύστασης

Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται ο δείκτης της αέριας σύστασης, όπου μετρούνταν σε κάθε δείγμα πριν γίνει η δειγματοληψία. Στα διαγράμματα που θα παρουσιάζονται, φαίνεται η μεταβολή στη σύσταση (%) του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα.



Διάγραμμα 58: Μεταβολή της σύστασης O_2 σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης



Διάγραμμα 59: Μεταβολή της σύστασης CO_2 σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης

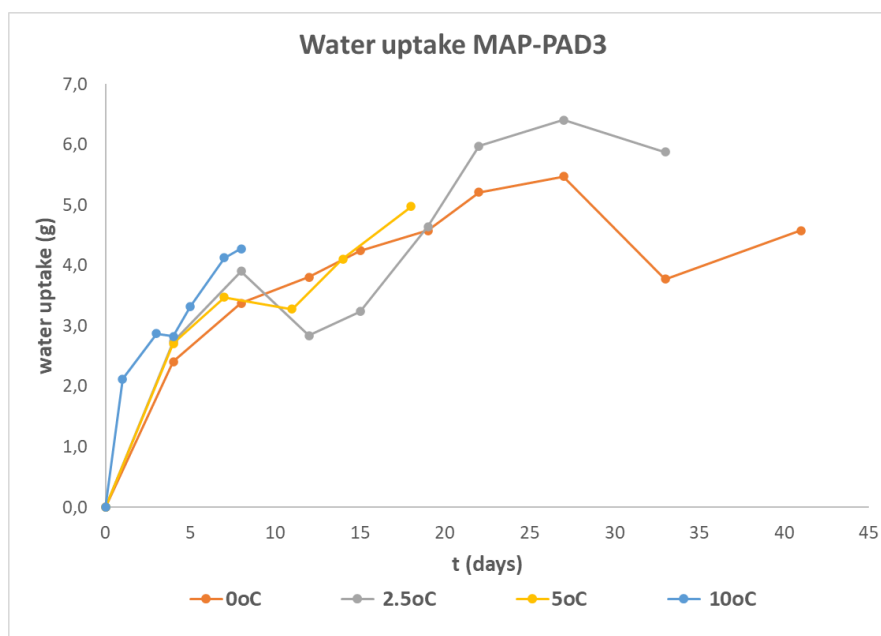
Στο Διάγραμμα 58 και Διάγραμμα 59 απεικονίζεται η μεταβολή της σύστασης του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, αντίστοιχα, όπως αυτή μετρήθηκε κατά το χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων MAP-PAD3 και το δείγμα χωρίς προσθήκη PAD

(MAP) στους 5°C. Η αρχική σύσταση του οξυγόνου για τα δείγματα που συσκευάστηκαν ήταν ίση με 8% και του CO₂ 54%.

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα κι όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση του ολόκληρου λαβρακιού, η σύσταση του οξυγόνου μειωνόταν στις συσκευασίες και μηδενίζεται σε όλες τις συνθήκες προς το τέλος του χρόνου αποθήκευσης, λόγω της συμμετοχής του στις αντιδράσεις αλλοίωσης και στην ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών (TVC, ψευδομονάδες). Επομένως παρατηρείται καλή συσχέτιση αυτών των δεδομένων με τα συμπεράσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης. Όσον αφορά τα MAP δείγματα, παρατηρείται ότι η πτώση του οξυγόνου είναι λίγο μικρότερη από τα δείγματα με τη χρήση PAD στην ίδια θερμοκρασία. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στο μικρό ποσοστό του οξυγόνου (<10%) και στο συνεχώς παραγόμενο CO₂ λόγω του PAD, το οποίο μειώνει την περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε %O₂ ενισχύοντας %CO₂.

Η σύσταση του διοξειδίου, παρουσιάζει μια αρχική μείωση έως το 46% για τα MAP-PAD3 δείγματα κι έως το 38% για τα MAP, αλλά με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται έως το 70% και 42%, αντίστοιχα. Οι σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων με και χωρίς τη χρήση PAD οφείλονται στο εκλυόμενο CO₂ στην περίπτωση των πρώτων δειγμάτων με τον τρόπο που αναπτύχθηκε στην παράγραφο 5.2.5.

5.3.6 Μέτρηση μεταβολής της πρόσληψης υγρασίας από τα PADs

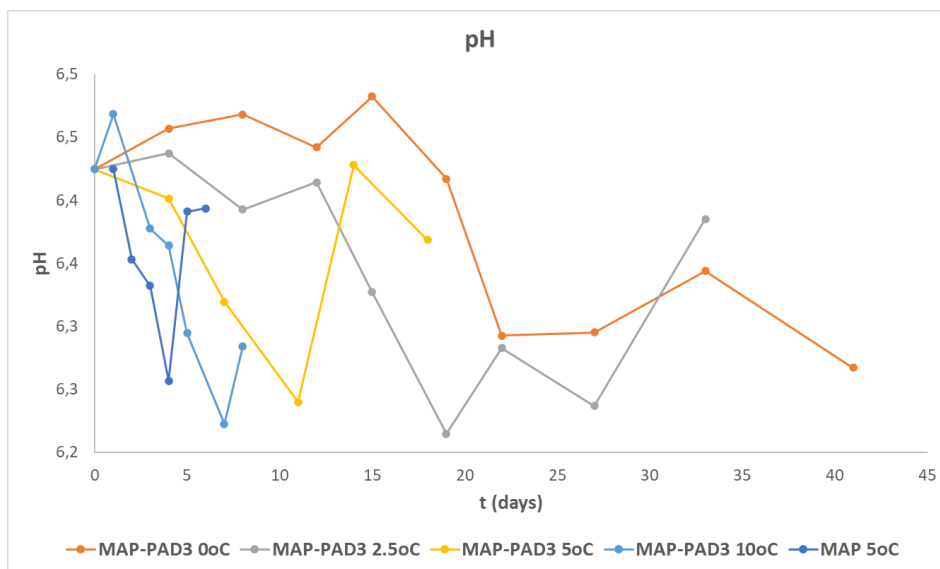


Διάγραμμα 60: Μεταβολή απορρόφησης υγρασίας του PAD σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης

Η μέτρηση μεταβολής της απορρόφησης υγρασίας από το PAD, γινόταν με ζύγιση του κάθε PAD κατά τη δειγματοληψία. Όπως είναι αναμενόμενο, με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης η απορρόφηση υγρασίας από το PAD αυξάνεται (Διάγραμμα 60). Αυτή η αναμενόμενη αύξηση του βάρους του PAD μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι σταδιακά οι ιχθύες αποβάλλουν υγρά λόγω των μεταθανάτιων αλλοιώσεων που αναφέρθηκαν στο θεωρητικό κομμάτι της παρούσας διπλωματικής, τα οποία υγρά απορροφούνται από το PAD. Τέτοιοι εκπομπείς CO₂ επιτρέπουν την απελευθέρωση CO₂ όταν έρχονται σε επαφή με το νερό που απορρέει από το τρόφιμο κατά τη συντήρησή του. Συνεπώς, το υλικό που έχει τοποθετηθεί στον πυθμένα της συσκευασίας του τροφίμου, επιτελεί διπλό ρόλο, την απορρόφηση των υγρών που απορρέουν (drip loss) και τη διατήρηση του CO₂ σε υψηλές συγκεντρώσεις στο εσωτερικό της συσκευασίας.

5.3.7 Μέτρηση μεταβολής του pH

Ο δείκτης που μελετάται σε αυτό το κεφάλαιο είναι το pH, το οποίο όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 61 παρουσιάζει αυξομειώσεις, που πιθανώς, όπως αναφέρθηκε και για το ολόκληρο λαβράκι, συμβαίνουν λόγω μεταβολικών αντιδράσεων κατά την υποβάθμιση της ποιότητας του ιχθύος. Ειδικότερα, λόγω της γλυκόλυσης παράγεται γαλακτικό οξύ, που μειώνει το pH, αλλά και η αύξηση προκύπτει λόγω του σχηματισμού αμμωνίας και αμινών (Belitz *et al.*, 2009).

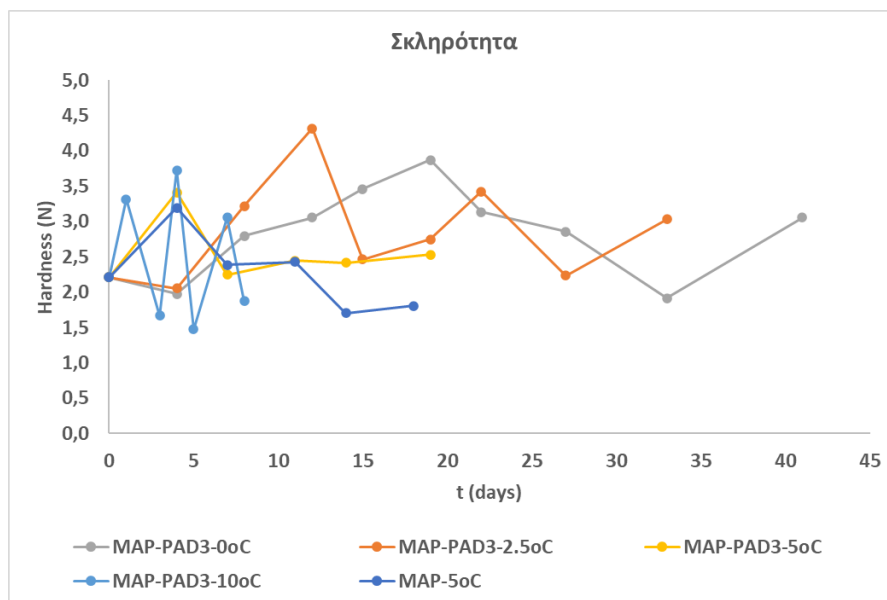


Διάγραμμα 61: Μεταβολή του pH σε κάθε συνθήκη αποθήκευσης

Όπως είναι εμφανές, επομένως, δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα, από τη μελέτη του συγκεκριμένου δείκτη, για το φιλέτο λαβρακιού.

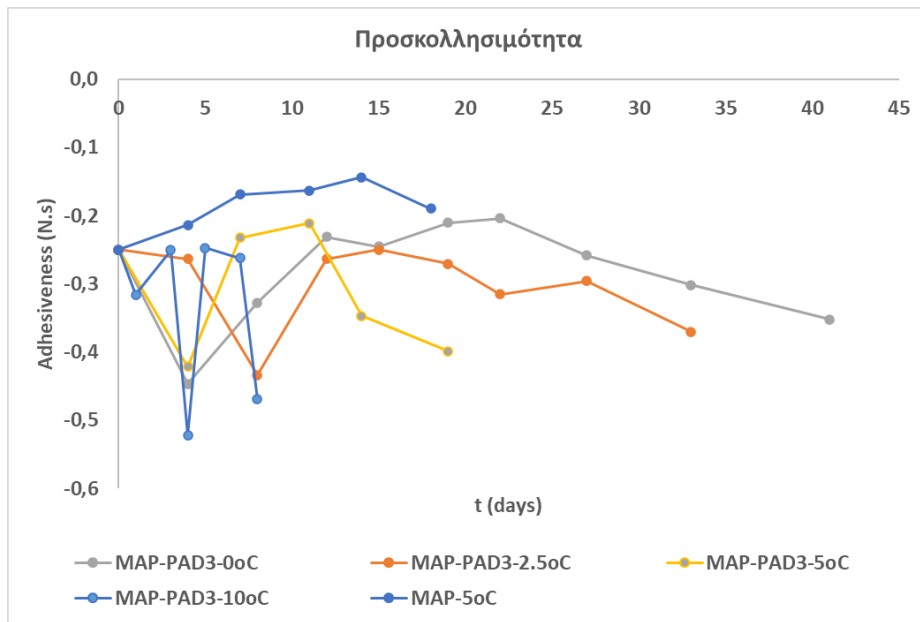
5.3.8 Ανάλυση μεταβολής υφής

Στο κεφάλαιο αυτό, παρουσιάζονται τα δεδομένα σκληρότητας και προσκολλησιμότητας του φιλέτου λαβρακιού.



Διάγραμμα 62: Μεταβολή σκληρότητας σε κάθε συνθήκη αποθήκευσης

Στο Διάγραμμα 62, παρουσιάζεται η μεταβολή της σκληρότητας στα δείγματα φιλέτου λαβρακιού σε κάθε θερμοκρασία, όπως παρατηρείται υπάρχουν αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τους. Η γενικότερη, όμως, εικόνα είναι κάποια αύξηση της σκληρότητας, η οποία είναι αναμενόμενη, λόγω των αντιδράσεων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων κατά την αλλοίωση αφού η σάρκα τους αποβάλλει υγρά και γίνεται σκληρότερη.

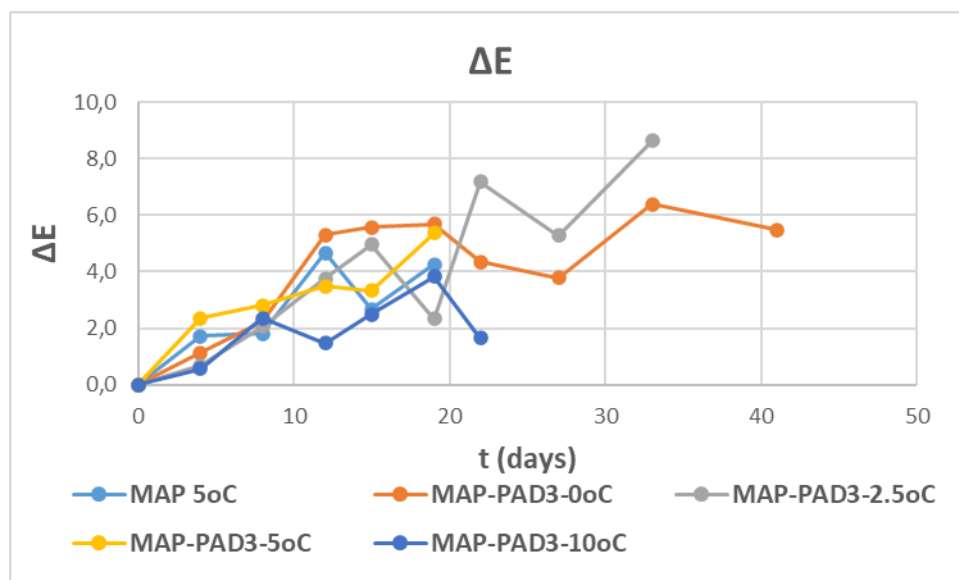


Διάγραμμα 63 Μεταβολή προσκολλησιμότητας σε κάθε συνθήκη αποθήκευσης

Η προσκολλησιμότητα, με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης παρουσιάζει αύξηση στις περισσότερες θερμοκρασίες, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 63, αλλά δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο συγκεκριμένο συμπέρασμα όσον αφορά τις διάφορες θερμοκρασίες και τη χρήση ή μη των PADs.

5.3.9 Ανάλυση μεταβολής χρώματος

Ο δείκτης που μελετά αυτό το κεφάλαιο είναι το χρώμα, που αποτελεί σημαντικό δείκτη αποδοχής του ιχθυηρού από τον καταναλωτή. Στο Διάγραμμα 64 παρατίθεται η μεταβολή του δείκτη ΔΕ για κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης.

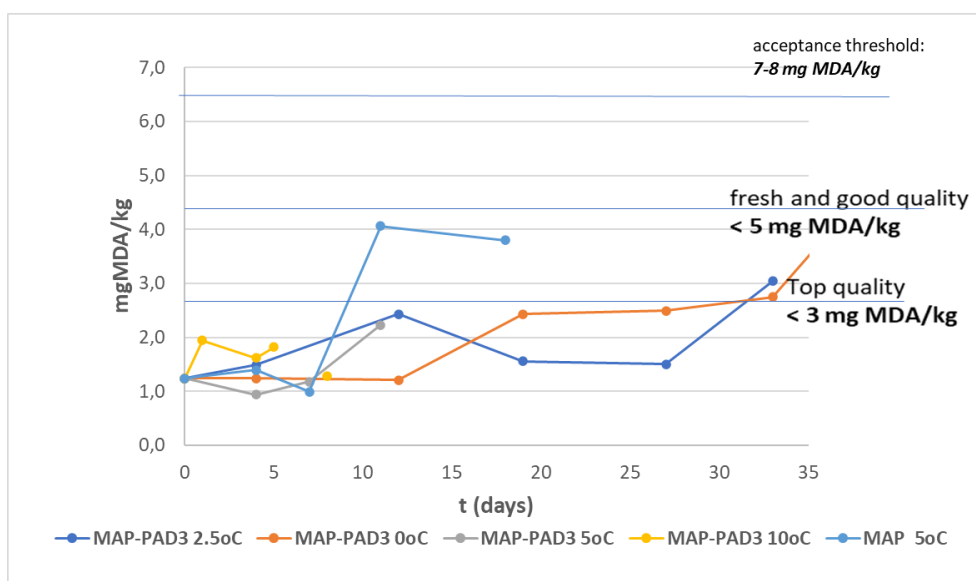


Διάγραμμα 64: Μεταβολή του δείκτη ΔΕ του χρώματος σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης

Από τις τιμές του δείκτη ΔΕ, παρατηρείται μια τάση αύξησης του δείκτη στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, παρόλα αυτά φαίνεται πως δεν μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα, καθώς και ο δείκτης του χρώματος παρουσιάζει αυξομειώσεις σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης για όλες τις μελετώμενες συνθήκες.

5.3.10 Μελέτη μεταβολής των λιπαρών οξέων

Η μεταβολή λιπαρών οξέων είναι συχνό φαινόμενο στα ιχθυηρά, καθώς αποτελούν πλούσια πηγή ακόρεστων λιπαρών. Στο διάγραμμα, φαίνεται η μεταβολή της οξείδωσης των λιπαρών οξέων του φιλέτου λαβρακιού σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Όπως αναφέρθηκε ξανά για το ολόκληρο λαβράκι, τα όρια του διαγράμματος οξείδωσης των λιπαρών οξέων, παρουσιάζονται όπως έχουν προκύψει από μελέτη, συγκεκριμένα, για τιμές μικρότερες των 3 mg MDA/kg το ιχθυηρό θεωρείται άριστης ποιότητας, για τιμές μικρότερες των 5 mg MDA/kg θεωρείται καλής ποιότητας και το όριο αποδοχής κυμαίνεται σε 7-8 mg MDA/kg.



Διάγραμμα 65: Μεταβολή της οξείδωσης λιπαρών για κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης

Όπως παρατηρείται, η οξείδωση των λιπαρών οξέων αυξάνεται, κατά κύριο λόγο, συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης, που είναι αναμενόμενο, αλλά δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί μέσω των μεταβολών στο Διάγραμμα 65. Φαίνεται, βέβαια, πως αυξάνεται εντονότερα και σε μικρότερο χρονικό διάστημα, η οξείδωση των λιπαρών, στο δείγμα που βρίσκεται συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα αλλά χωρίς τη χρήση PAD (δείγμα MAP).

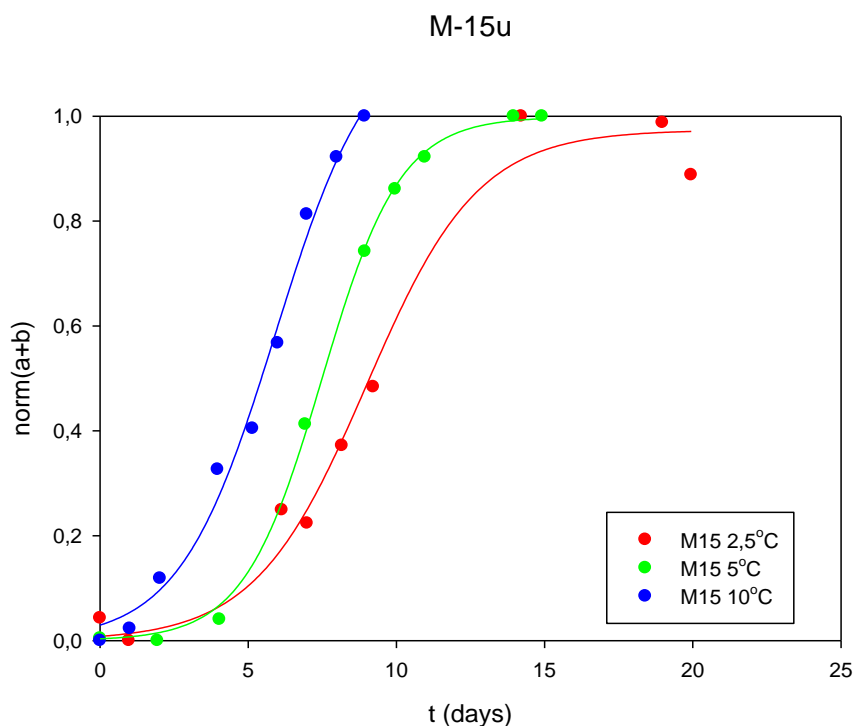
5.4 Μελέτη απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΤΙ

5.4.1 Κινητική μελέτη της απόκρισης των ΤΤΙ

Οι ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες, η αρχή λειτουργίας των οποίων βασίζεται στην ενζυμική υδρόλυση ενός λιπαρού υποστρώματος, που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, ήταν οι δείκτες με ένζυμο λιπάση *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα, σε εύρος αναλογίας ενζύμου υποστρώματος, συγκεκριμένα M-15u, M-20u, M-25u, M-50u, M-75u και M-100u, για τους οποίους πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες σε ένα εύρος θερμοκρασιών, συγκεκριμένα, 0, 2.5, 5 και 10°C. Παρατίθεται παρακάτω, η κινητική μελέτη για κάθε τύπο ενζυμικού δείκτη που μελετήθηκε, από την προσαρμογή των παραμέτρων του χρώματος a και b που μετρούνταν, στο σιγμοειδές μοντέλο της εξίσωσης (4.6), με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος SigmaPlot 10.0, για την εύρεση των κινητικών σταθερών k_1 και k_2 . Επιπλέον, από τις κινητικές παραμέτρους, με τη χρήση της εξίσωσης Arrhenius, υπολογίζονται η ενέργεια ενεργοποίησης καθώς και κινητικές σταθερές αναφοράς για κάθε τύπο ΤΤΙ. Τέλος μπορεί να προσδιοριστεί ένα συνολικό μοντέλο (Εξίσωση 4.8) που θα υπολογίζει την απόκριση οποιουδήποτε δείκτη τύπου M, για οποιαδήποτε θερμοκρασία και χρόνο.

5.4.1.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 15u

Στο Διάγραμμα 66, εμφανίζεται η μεταβολή της απόκρισης του δείκτη M-15u, για τις θερμοκρασίες 2.5, 5 και 10°C.



Διάγραμμα 66: Μεταβολή απόκρισης $norm(a+b)$ σε συνάρτηση με το χρόνο για θερμοκρασίες 2.5, 5 και 10°C για τον ενζυμικό δείκτη M-15u

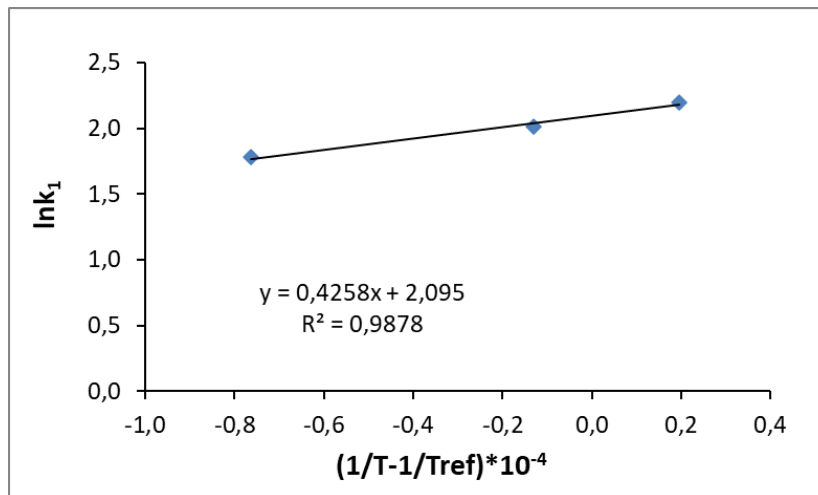
Όπως διακρίνεται από το διάγραμμα 66, σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο ρυθμός μεταβολής της απόκρισης είναι πιο έντονος και φτάνει στο αποδεκτό όριο μεταβολής σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο δείκτης που εμφανίζει την ταχύτερη μεταβολή είναι στους 10°C (μπλε γραμμή).

Στον Πίνακα 24, παρατίθενται οι κινητικές σταθερές της απόκρισης k_1 και k_2 για κάθε θερμοκρασία καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης R^2 της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων στην εξίσωση απόκρισης.

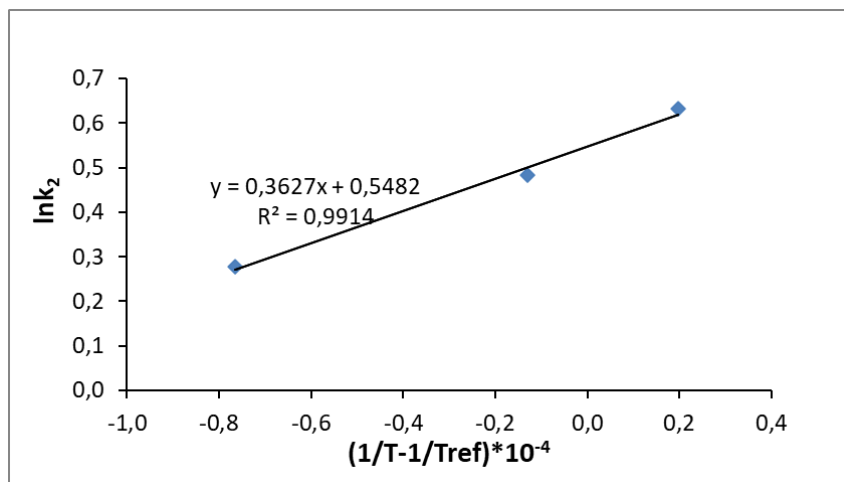
Πίνακας 24: Κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και συντελεστής συσχέτισης R^2 για τον ενζυμικό δείκτη M-15u

T (°C)	k_1	k_2 (d)	R^2
2,5	$8,989 \pm 0,418$	$1,881 \pm 0,434$	0,982
5	$7,490 \pm 0,077$	$1,620 \pm 0,066$	0,982
10	$5,921 \pm 0,383$	$1,320 \pm 0,229$	0,991

Κατόπιν, στα Διαγράμματα 67 και 68 παρουσιάζεται η εξίσωση Arrhenius των κινητικών σταθερών ($\ln k_1$ και $\ln k_2$) και η προσαρμογή της εξίσωσης, για θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 4^\circ\text{C}$.



Διάγραμμα 67: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_1 του ενζυμικού δείκτη M-15u



Διάγραμμα 68: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_2 του ενζυμικού δείκτη M-15u

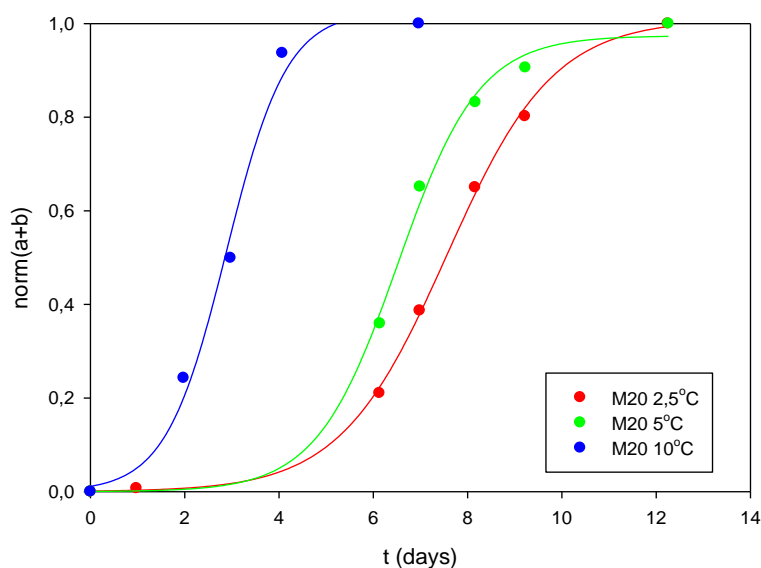
Σύμφωνα, με την προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius, υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) από την κλίση των ευθειών καθώς και οι κινητικές σταθερές αναφοράς ($\ln k_{1,ref}$ και $\ln k_{2,ref}$) από τις αντίστοιχες αποτέμνουσες και παρατίθενται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25: Ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) και κινητικές σταθερές αναφοράς ($k_{1,ref}$ και $k_{2,ref}$) για τον ενζυμικό δείκτη M-15u

$E_{A_1} \left(\frac{kJ}{mol} \right)$	35,4
$k_{1ref} (d^{-1})$	8,13
$E_{A_2} \left(\frac{kJ}{mol} \right)$	30,2
$k_{2ref} (d^{-1})$	1,73

5.4.1.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 20u

M-20u



Διάγραμμα 69: Μεταβολή απόκρισης $norm(a+b)$ σε συνάρτηση με το χρόνο για θερμοκρασίες 2,5, 5 και 10°C για τον ενζυμικό δείκτη M-20u

Στο Διάγραμμα 69, παρουσιάζεται η μεταβολή απόκρισης του ενζυμικού δείκτη M-20u και όπως είναι εμφανές, παρατηρείται η ίδια αντιστοιχία που αναφέρθηκε προηγουμένως. Δηλαδή, τον ταχύτερο ρυθμό μεταβολής της απόκρισης του δείκτη φέρει ο δείκτης στην μεγαλύτερη θερμοκρασία, στους 10°C, κι ακολουθούν οι 5 (πράσινη γραμμή) και 2,5°C (κόκκινη γραμμή), αντιστοίχως.

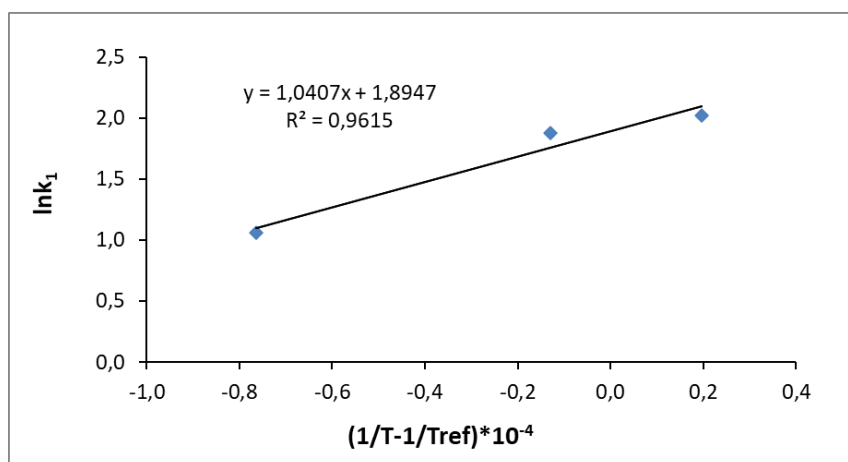
Στον Πίνακα 26, παρατίθενται οι κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και ο συντελεστής προσαρμογής R^2 για κάθε θερμοκρασία.

Πίνακας 26: Κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και συντελεστής συσχέτισης R^2 για τον ενζυμικό δείκτη M-20u

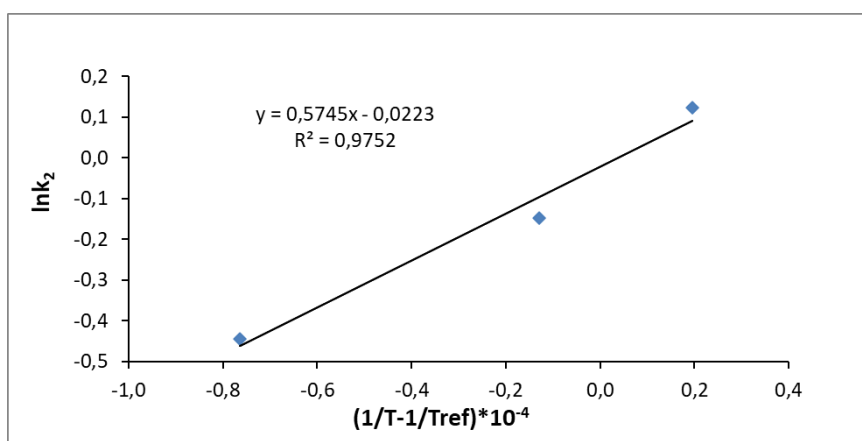
T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
2,5	$7,558 \pm 0,061$	$1,132 \pm 0,054$	0,990
5	$6,522 \pm 0,107$	$0,863 \pm 0,136$	0,995
10	$2,886 \pm 0,157$	$0,641 \pm 0,138$	0,931

Από τα αποτελέσματα, επιβεβαιώνονται οι παρατηρήσεις που είναι εμφανείς και στο διάγραμμα, δηλαδή ότι οι κινητικές σταθερές μειώνονται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης του ενζυμικού δείκτη.

Στη συνέχεια, στα Διαγράμματα 70 και 71 παρουσιάζεται η προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius των κινητικών σταθερών ($\ln k_1$ και $\ln k_2$) και η προσαρμογή της εξίσωσης, για θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 4^\circ\text{C}$.



Διάγραμμα 70: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_1 του ενζυμικού δείκτη M-20u



Διάγραμμα 71: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_2 του ενζυμικού δείκτη M-20u

Σύμφωνα με την προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) και οι κινητικές σταθερές αναφοράς ($\ln k_{1,ref}$ και $\ln k_{2,ref}$) και παρατίθενται στον Πίνακα 27.

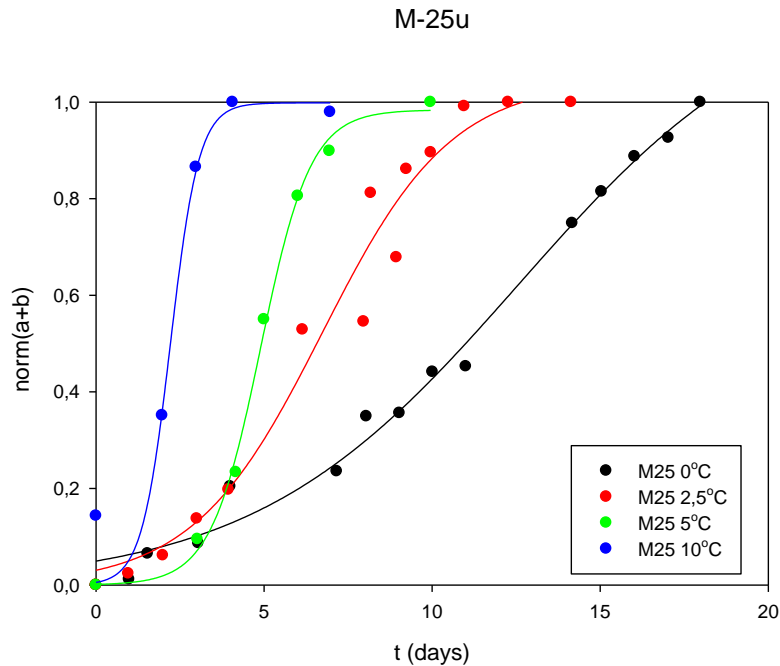
Πίνακας 27: Ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) και κινητικές σταθερές αναφοράς ($k_{1,ref}$ και $k_{2,ref}$) για τον ενζυμικό δείκτη M-20u

$E_{A1} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	87,6
$k_{1ref} \left(\text{d}^{-1} \right)$	6,65
$E_{A2} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	32,5

$k_{2ref} (d^{-1})$	0,99
---------------------	------

5.4.1.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 25u

Η μεταβολή της απόκρισης του ενζυμικού δείκτη M-25u, εμφανίζεται στο Διάγραμμα 72, για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5 και 10°C.



Διάγραμμα 72: Μεταβολή απόκρισης $norm(a+b)$ σε συνάρτηση με το χρόνο για θερμοκρασίες 0, 2.5, 5 και 10°C για τον ενζυμικό δείκτη M-25u

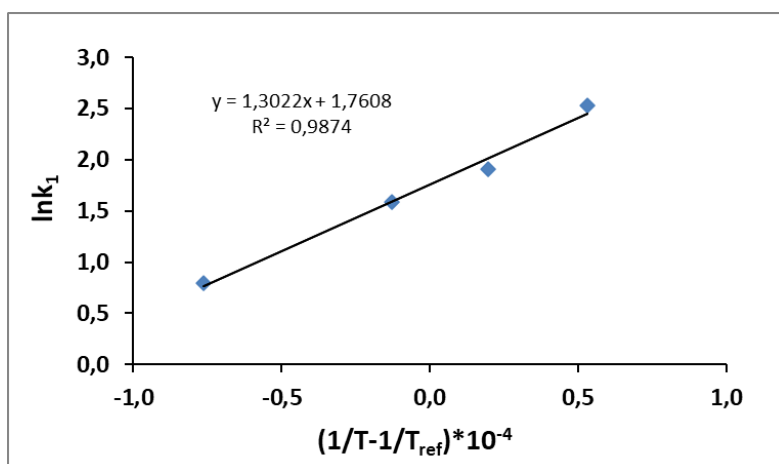
Παρομοίως, με τα προηγούμενα διαγράμματα, και στο Διάγραμμα 72 φαίνεται η πιο αργή μεταβολή της απόκρισης να εμφανίζεται στους 0°C (μαύρη γραμμή), που είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία.

Στον παρακάτω Πίνακα 28, παρατίθενται οι κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και ο συντελεστής προσαρμογής R^2 για κάθε θερμοκρασία.

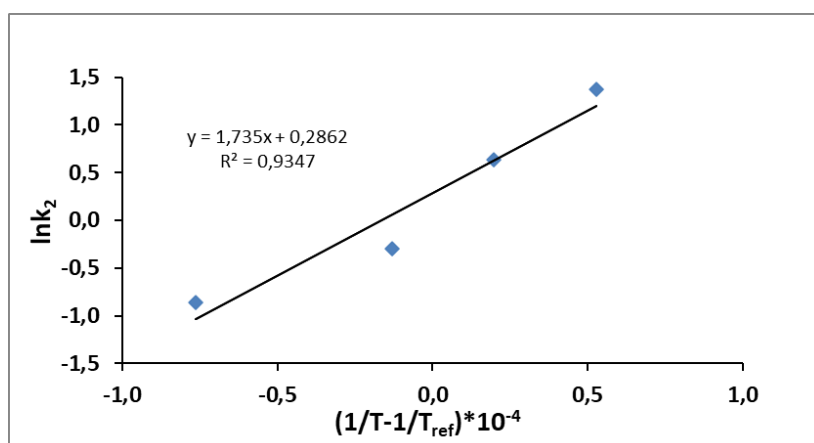
Πίνακας 28: Κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και συντελεστής συσχέτισης R^2 για τον ενζυμικό δείκτη M-25u

T (°C)	k_1	k_2	R^2
0	$12,571 \pm 0,975$	$3,951 \pm 0,433$	0,990
2,5	$6,733 \pm 0,381$	$1,886 \pm 0,259$	0,977
5	$4,901 \pm 0,078$	$0,742 \pm 0,067$	0,997
10	$2,214 \pm 0,190$	$0,424 \pm 0,187$	0,968

Στη συνέχεια, στα Διαγράμματα 73 και 74 παρουσιάζεται η προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius των κινητικών σταθερών ($\ln k_1$ και $\ln k_2$) και η προσαρμογή της εξίσωσης, για θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref}= 4^{\circ}\text{C}$.



Διάγραμμα 73: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_1 του ενζυμικού δείκτη M-25u



Διάγραμμα 74: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_2 του ενζυμικού δείκτη M-25u

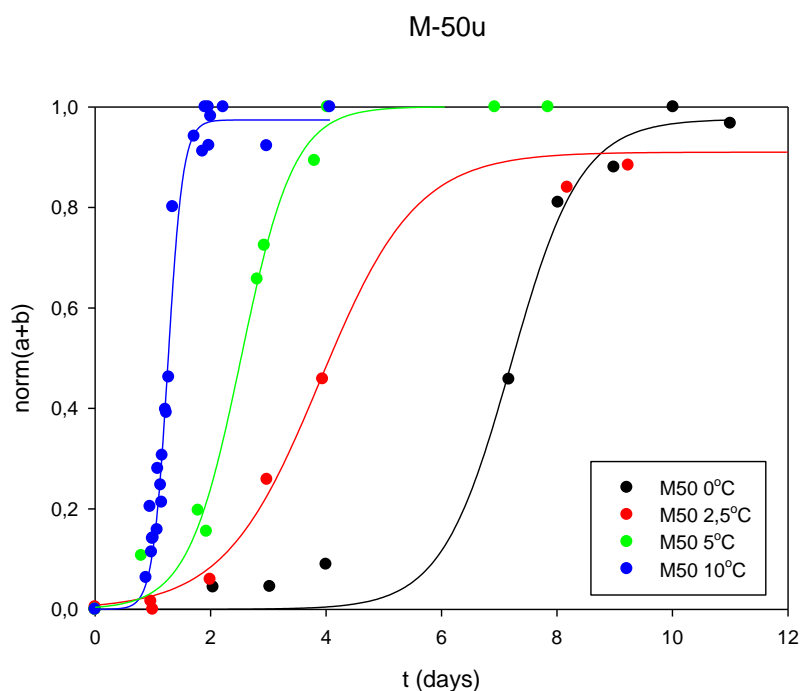
Σύμφωνα με την προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) και οι κινητικές σταθερές αναφοράς ($\ln k_{1,ref}$ και $\ln k_{2,ref}$) και παρατίθενται στον Πίνακα 29.

Πίνακας 29: : Ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) και κινητικές σταθερές αναφοράς για τον ενζυμικό δείκτη M-25u

$E_{A_1} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	108,3
$k_{1ref} (d^{-1})$	5,82
$E_{A_2} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	144,2
$k_{2ref} (d^{-1})$	1,33

5.4.1.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 50u

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθεται η μελέτη για τον ενζυμικό δείκτη M-50u σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2,5, 5 και 10°C.



Διάγραμμα 75: Μεταβολή απόκρισης $norm(a+b)$ σε συνάρτηση με το χρόνο για θερμοκρασίες 0, 2,5, 5 και 10°C για τον ενζυμικό δείκτη M-50u

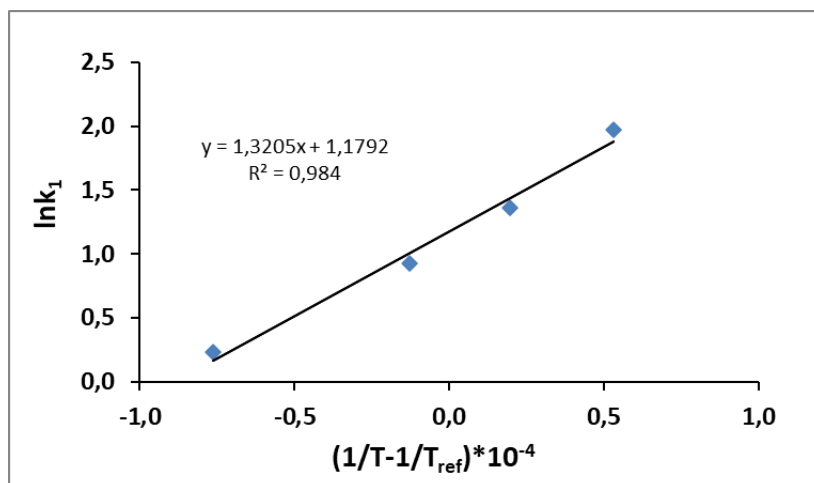
Τα αποτελέσματα στο Διάγραμμα 75, φέρουν τον αντίστοιχο σχολιασμό με τους προηγούμενους τύπους ενζυμικών δεικτών σε διαφορετικές τιμές ενεργότητας. Όπως φαίνεται, και από τις κινητικές σταθερές που υπολογίζονται μέσω της εφαρμογής στο σιγμοειδές μοντέλο απόκρισης, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 30.

Στον Πίνακα 30, παρατίθενται οι κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και ο συντελεστής προσαρμογής R^2 για κάθε θερμοκρασία.

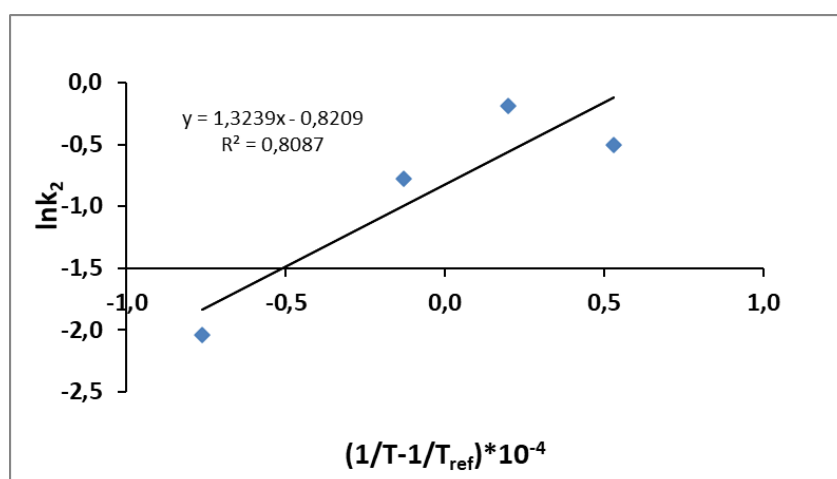
Πίνακας 30: Κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και συντελεστής συσχέτισης R^2 για τον ενζυμικό δείκτη M-50u

T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	$7,203 \pm 0,119$	$0,603 \pm 0,159$	0,990
2,5	$3,897 \pm 0,169$	$0,832 \pm 0,162$	0,990
5	$2,528 \pm 0,286$	$0,459 \pm 0,206$	0,992
10	$1,260 \pm 0,016$	$0,130 \pm 0,016$	0,980

Στη συνέχεια, στα Διαγράμματα 76 και 77 παρουσιάζεται η προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius των κινητικών σταθερών ($\ln k_1$ και $\ln k_2$) και η προσαρμογή της εξίσωσης, για θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 4^\circ\text{C}$.



Διάγραμμα 76: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_1 του ενζυμικού δείκτη M-50u



Διάγραμμα 77: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_2 του ενζυμικού δείκτη M-50u

Σύμφωνα με την προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) και οι κινητικές σταθερές αναφοράς ($\ln k_{1,ref}$ και $\ln k_{2,ref}$) και παρατίθενται στον Πίνακα 31.

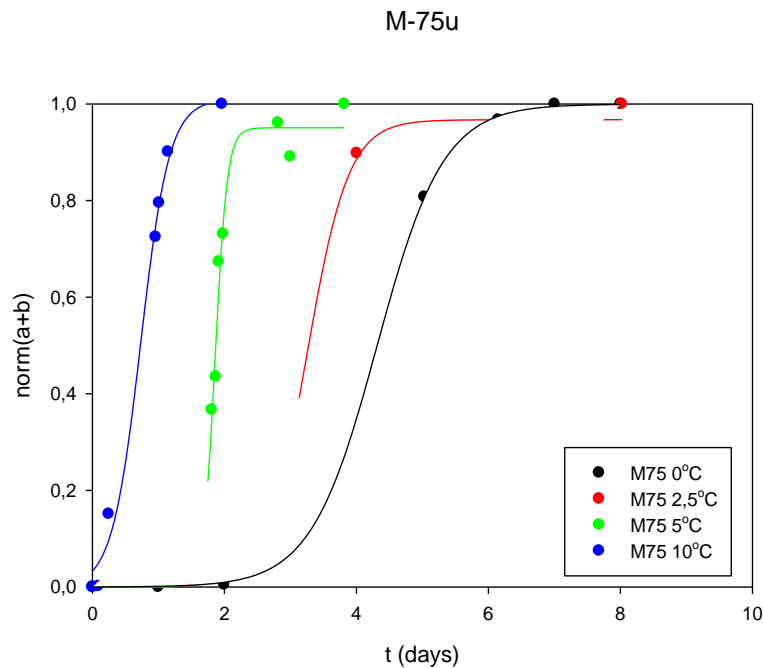
Πίνακας 31: Ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) και κινητικές σταθερές αναφοράς (k_1 και k_2) για τον ενζυμικό δείκτη M-50u

$E_{A1} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	109,8
$k_{1ref} \left(\text{d}^{-1} \right)$	3,25
$E_{A2} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	110,1

$k_{2ref} (d^{-1})$	0,44
---------------------	------

5.4.1.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 75u

Στο Διάγραμμα 78, εμφανίζεται η μεταβολή απόκρισης του δείκτη M-75u για τις θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5 και 10°C.



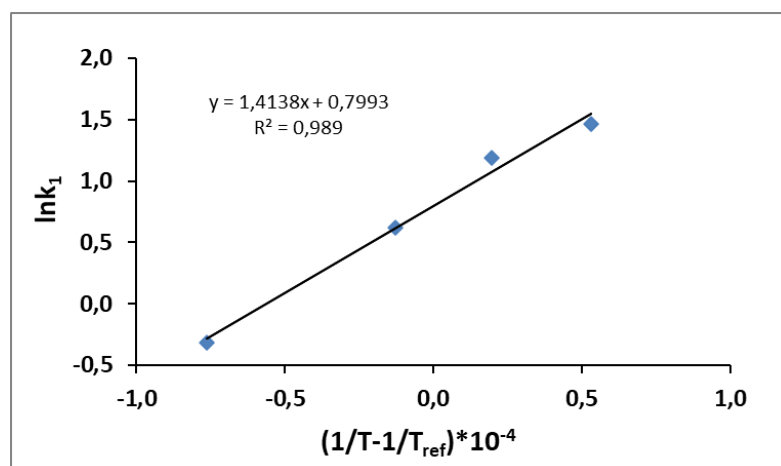
Διάγραμμα 78: Μεταβολή απόκρισης $norm(a+b)$ σε συνάρτηση με το χρόνο για θερμοκρασίες 0, 2.5, 5 και 10°C για τον ενζυμικό δείκτη M-75u

Στον παρακάτω Πίνακα 32, παρατίθενται οι κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και ο συντελεστής προσαρμογής R^2 για κάθε θερμοκρασία.

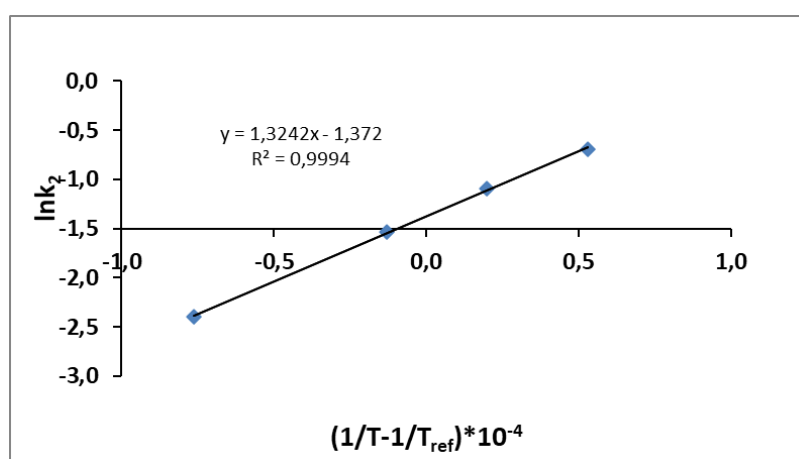
Πίνακας 32: Κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και συντελεστής συσχέτισης R^2 για τον ενζυμικό δείκτη M-75u

T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	$4,314 \pm 0,052$	$0,501 \pm 0,037$	0,988
2,5	$3,278 \pm 0,049$	$0,335 \pm 0,042$	0,995
5	$1,860 \pm 0,013$	$0,216 \pm 0,018$	0,988
10	$0,732 \pm 0,048$	$0,091 \pm 0,027$	0,994

Στη συνέχεια, στα Διαγράμματα 79 και 80 παρουσιάζεται η προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius των κινητικών σταθερών ($\ln k_1$ και $\ln k_2$) και η προσαρμογή της εξίσωσης, για θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 4^\circ\text{C}$.



Διάγραμμα 79: Προσαρμογή του γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_1 του ενζυμικού δείκτη M-75u



Διάγραμμα 80: Προσαρμογή του γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_2 του ενζυμικού δείκτη M-75u

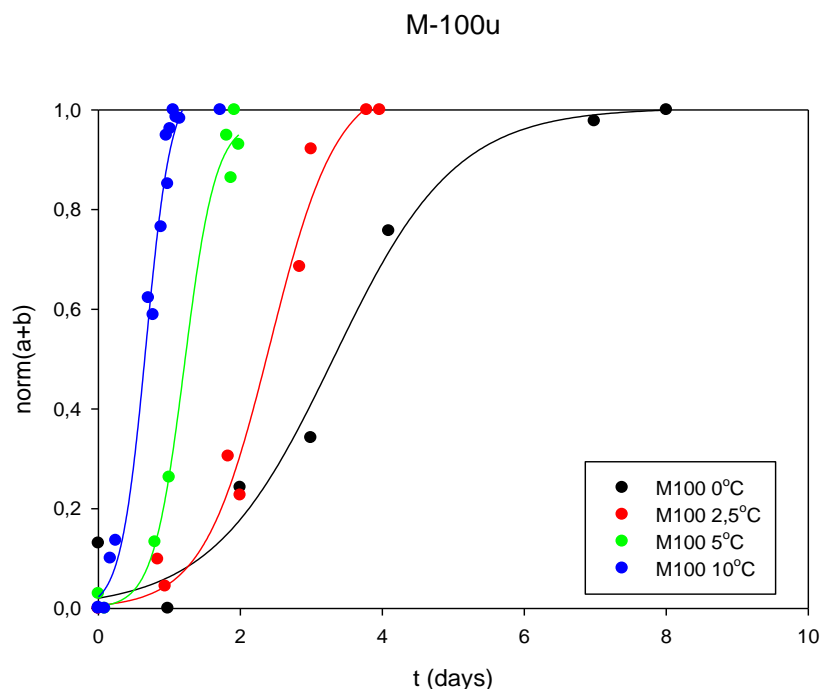
Σύμφωνα με την προσαρμογή στη γραμμικοποιημένη εξίσωση Arrhenius, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) και οι κινητικές σταθερές αναφοράς ($\ln k_{1,ref}$ και $\ln k_{2,ref}$) και παρατίθενται στον Πίνακα 33.

Πίνακας 33: Ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) και κινητικές σταθερές αναφοράς για τον ενζυμικό δείκτη M-75u

$E_{A_1} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	117,5
$k_{1ref} (d^{-1})$	2,22
$E_{A_2} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	110,1
$k_{2ref} (d^{-1})$	0,25

5.4.1.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών δεικτών τύπου M ενεργότητας 100u

Στο Διάγραμμα 81, εμφανίζεται η μεταβολή της απόκρισης του ενζυμικού δείκτη M-100u σε θερμοκρασίες αποθήκευσης, 0, 2,5, 5 και 10°C.



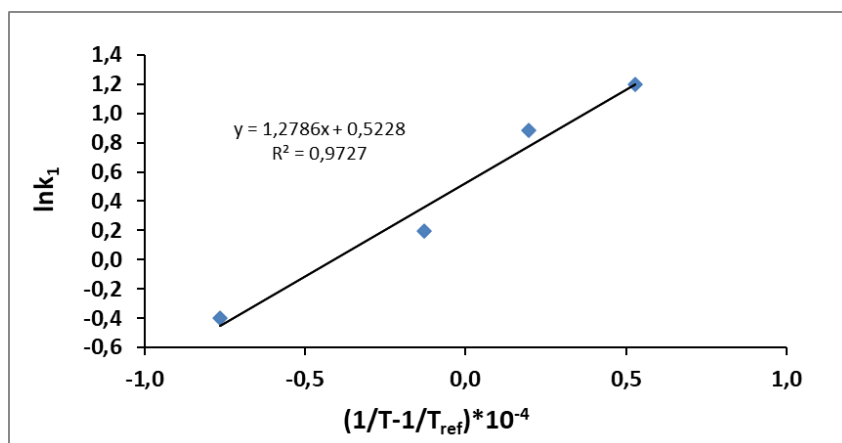
Διάγραμμα 81: Μεταβολή απόκρισης $norm(a+b)$ σε συνάρτηση με το χρόνο για θερμοκρασίες 0, 2,5, 5 και 10°C για τον ενζυμικό δείκτη M-100u

Στον παρακάτω Πίνακα 34, παρατίθενται οι κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και ο συντελεστής προσαρμογής R^2 για κάθε θερμοκρασία.

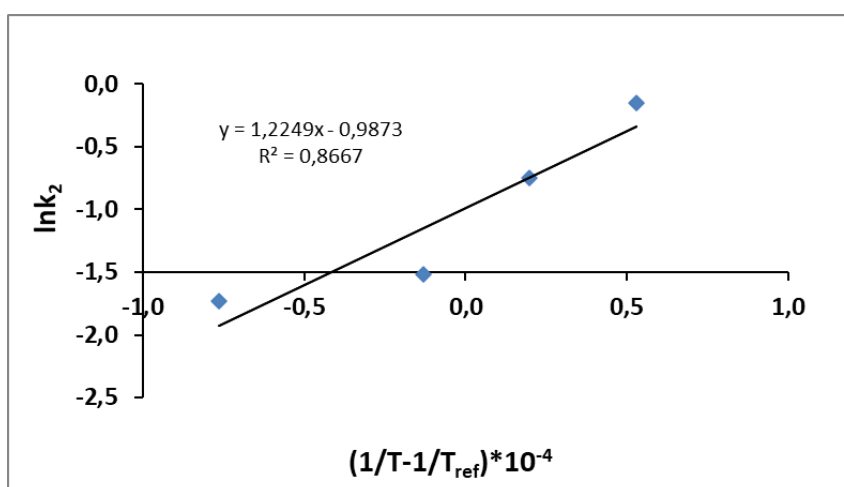
Πίνακας 34: Κινητικές σταθερές της απόκρισης (k_1 και k_2) και συντελεστής συσχέτισης R^2 για τον ενζυμικό δείκτη M-100u

T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	$3,313 \pm 0,245$	$0,858 \pm 0,215$	0,974
2,5	$2,418 \pm 0,122$	$0,472 \pm 0,086$	0,981
5	$1,213 \pm 0,131$	$0,219 \pm 0,085$	0,993
10	$0,671 \pm 0,029$	$0,177 \pm 0,023$	0,987

Στη συνέχεια, στα Διαγράμματα 82 και 83 παρουσιάζεται η προσαρμογή στη γραμμικοποιημένη εξίσωση Arrhenius των κινητικών σταθερών ($\ln k_1$ και $\ln k_2$) και η προσαρμογή της εξίσωσης, για θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 4^\circ\text{C}$.



Διάγραμμα 82: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_1 του ενζυμικού δείκτη M-100u



Διάγραμμα 83: Προσαρμογή του μοντέλου Arrhenius στην κινητική σταθερά k_2 του ενζυμικού δείκτη M-100u

Σύμφωνα με την προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) και οι κινητικές σταθερές αναφοράς ($\ln k_{1,ref}$ και $\ln k_{2,ref}$) και παρατίθενται στον Πίνακα 35.

Πίνακας 35: Ενέργειες ενεργοποίησης (E_a) και κινητικές σταθερές αναφοράς ($k_{1,ref}$ και $k_{2,ref}$) για τον ενζυμικό δείκτη M-100u

$E_{A_1} \left(\frac{kJ}{mol} \right)$	106,3
$k_{1ref} (d^{-1})$	1,69
$E_{A_2} \left(\frac{kJ}{mol} \right)$	101,8
$k_{2ref} (d^{-1})$	0,37

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι με αύξηση της ενεργότητας των ενζυμικών δεικτών τύπου M, μειώνονται οι κινητικές σταθερές αναφοράς ($k_{1,ref}$ και $k_{2,ref}$), όπως αυτά έχουν υπολογιστεί από την προσαρμογή στο μοντέλο της εξίσωσης Arrhenius. Από τους συντελεστές προσαρμογής, R^2 , φαίνεται πως η προσαρμογή των κινητικών σταθερών των δεικτών είναι ικανοποιητική, με τιμές 0,97 για την κινητική σταθερά k_1 και 0,86 για την k_2 .

5.4.2 Διάρκεια ζωής των ενζυμικών δεικτών

Οι ενζυμικοί δείκτες TPI παρουσιάζουν μεταβολή χρώματος από πράσινο, σε πορτοκαλί και τελικά σε κόκκινο χρώμα. Το όριο λήξης των δεικτών έχει οριστεί ως τιμή απόκρισης $no_{TM}(a+b)=0,8$, τιμή που αντιστοιχεί στο τελικό σημείο της εκθετικής φάσης και σε οπτική μεταβολή είναι η αλλαγή σε πορτοκαλί χρώμα. Επομένως, ο χρόνος ζωής ενός ενζυμικού δείκτη αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται ώστε η μεταβολή της απόκρισης $no_{TM}(a+b)$ να φτάσει την τιμή 0,8.

Ο χρόνος ζωής υπολογίζεται από την εξίσωση (4.6), για απόκριση ίση με το όριο λήξης, δηλαδή 0,8, και τα αποτελέσματα για κάθε ενεργότητα σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης που μελετήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 36.

Πίνακας 36: Διάρκεια ζωής των ενζυμικών δεικτών τύπου M που μελετήθηκαν

T (°C)	M-15u	M-20u	M-25u	M-50u	M-75u	M-100u
0	-	-	18,0	8,0	5,0	4,5
2,5	11,6	9,1	9,3	5,0	3,7	3,1
5	9,7	7,7	5,9	3,2	2,2	1,5
10	7,7	3,9	2,8	1,4	1,0	0,9

Είναι εμφανές, πως ο χρόνος ζωής ενός ενζυμικού δείκτη τύπου M, επηρεάζεται τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από την ενεργότητα του ενζύμου. Ειδικότερα, όσο μεγαλύτερη ενεργότητα έχει ο ενζυμικός δείκτης τόσο μειώνεται ο χρόνος απόκρισης που εμφανίζει σε σταθερή θερμοκρασία, και αντίστοιχα όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος απόκρισης του.

5.5 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών δεικτών

Στο κεφάλαιο αυτό, προσδιορίζεται το συνολικό μαθηματικό μοντέλο του δείκτη τύπου M, για να δύναται η επιλογή της κατάλληλης ενεργότητας ενζύμου, ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της αλλοίωσης του μελετώμενου τρόφιμου. Το μοντέλο αυτό εκφράζει την εξάρτηση της απόκρισης των δεικτών από τη συγκέντρωση (units), το χρόνο (days) και τη θερμοκρασία αποθήκευσης (K) και περιγράφεται από την εξίσωση (4.8)

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,ref}c^{-a} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2,ref}c^{-b} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (4.8)$$

Με τη βοήθεια του υπολογιστικού εργαλείου του excel, Solver, και της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, υπολογίζονται οι παράμετροι $k_{1,ref}$, $k_{2,ref}$, E_A , a και b , της εξίσωσης που εμφανίζεται παραπάνω. Συγκεκριμένα, η συνθήκη επίλυσης στο Solver είναι η ελαχιστοποίηση της διαφοράς των πειραματικών από τις προβλεπόμενες τιμές του μοντέλου.

Στον Πίνακα 37, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου των ενζυμικών δεικτών τύπου M.

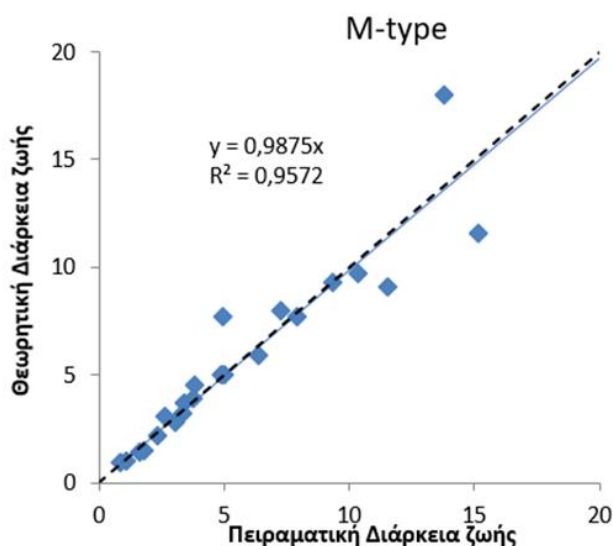
Πίνακας 37: Παράμετροι συνολικού μαθηματικού μοντέλου των ενζυμικών δεικτών τύπου M

$k_{1ref} (d^{-1})$	$k_{2ref} (d^{-1})$	$E_A \left(\frac{kJ}{mol}\right)$	a	b
85,57	66,70	96,99	0,846	1,222

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αξιοπιστία αυτού του συνολικού μαθηματικού μοντέλου των ενζυμικών δεικτών τύπου M, γίνεται σύγκριση των πειραματικών δεδομένων του χρόνου ζωής των δεικτών με τη διάρκεια ζωής όπως αυτή προκύπτει από το μοντέλο.

Στο Διάγραμμα 84, παρουσιάζονται τα σημεία όλων των ενεργοτήτων ενζύμου και όλων των θερμοκρασιών με τεταγμένη τη θεωρητική διάρκεια ζωής και τετμημένη την πειραματική. Ιδανικά, επιδιώκεται η απόσταση τους από τη διχοτόμο, $y=ax$, να είναι σχεδόν μηδενική δηλαδή οι δύο χρόνοι να ταυτίζονται, καθώς και η κλίση της γραμμικής προσαρμογής των δεδομένων της διάρκειας ζωής να είναι ίση ή όσο κοντά γίνεται στη μονάδα (και ο συντελεστής συσχέτισης της προσαρμογής να είναι ικανοποιητικός). Όπως είναι εμφανές, τα περισσότερα σημεία βρίσκονται είτε επάνω είτε αρκετά κοντά στη διχοτόμο, με κάποιες αποκλίσεις στους μεγαλύτερους χρόνους

ζωής των ΤΤΙ. Επιπλέον, η κλίση που προκύπτει από τη γραμμή τάσης είναι ίση με 0,9875 που αποκλίνει ελάχιστα από τη μονάδα και ο συντελεστής προσαρμογής ισούται με $R^2=0.96$. Επομένως, δεν παρατηρείται σημαντική απόκλιση μεταξύ των πειραματικών μετρήσεων και των μετρήσεων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου και επομένως, αυτό μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο.



Διάγραμμα 84: Συσχέτιση θεωρητικής και πειραματικής διάρκειας ζωής των ενζυμικών δεικτών τύπου M

5.6 Διερεύνηση για την επιλογή κατάλληλου ΤΤΙ για τα δείγματα ολόκληρου και φιλέτου λαβρακιού

Μέσω της μελέτης που παρουσιάστηκε για την κινητική αλλοίωση του ολόκληρου αλλά και του φιλέτου λαβρακιού, σε συνδυασμό και με την μελέτη απόκρισης των ενζυμικών δεικτών, θα διερευνηθεί, στο παρόν κεφάλαιο, η επιλογή της κατάλληλης ενεργότητας των δεικτών τύπου M που αντιστοιχεί στην υποβάθμιση της αλλοίωσης του λαβρακιού.

Η κατάλληλη επιλογή δείκτη ΤΤΙ, προϋποθέτει τη συσχέτιση του χρόνου ζωής του μελετώμενου τρόφιμου με το χρόνο ζωής του δείκτη, καθώς και την ενέργεια ενεργοποίησης, που θα πρέπει να εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές. Όταν η διαφορά των ενεργειών ενεργοποίησης είναι μικρότερη από 40 kJ/mol, τότε το σφάλμα στην εκτίμηση της ποιότητας είναι μικρότερα από 15%, το οποίο είναι συνήθως αποδεκτό (Ταουκίς & Labuza, 1989).

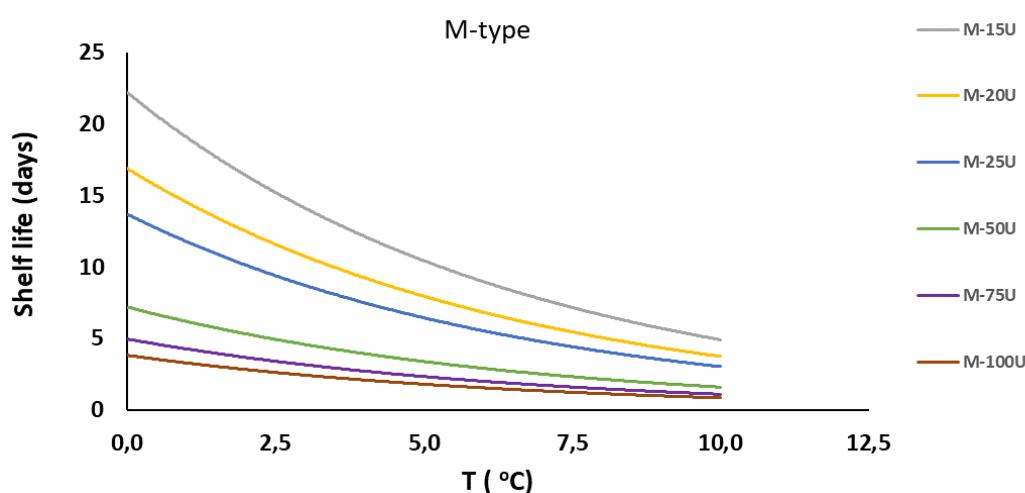
Στον Πίνακα 38, παρουσιάζονται οι ενέργειες ενεργοποίησης των δεικτών τύπου M, καθώς και των δειγμάτων ολόκληρου και φιλέτου λαβρακιού, που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, σε συνθήκες συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας και τροποποιημένης ατμόσφαιρας με τη χρήση 3 διαφορετικών ειδών PADs, με κωδικοποίηση PAD1, PAD2 για το ολόκληρο και PAD3 για το φιλέτο, όπως υπολογίστηκαν από τους ρυθμούς αλλοίωσης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας.

Πίνακας 38: Ενέργεια ενεργοποίησης ΤΠΙ τύπου Μ, και των δειγμάτων ολόκληρου και φιλέτου λαβρακιού.

	Δείκτης τύπου Μ	ΜΑΡ	ΜΑΡ-PAD1	ΜΑΡ-PAD2	ΜΑΡ-PAD3
$E_A (\frac{kJ}{mol})$	96.99	63.45	84.41	93.95	131,88

Στη συνέχεια γίνεται η αντιστοίχιση των δεικτών ΤΠΙ τύπου Μ με τα δείγματα ολόκληρου και φιλέτου λαβρακιού στις μελετώμενες συνθήκες αποθήκευσης.

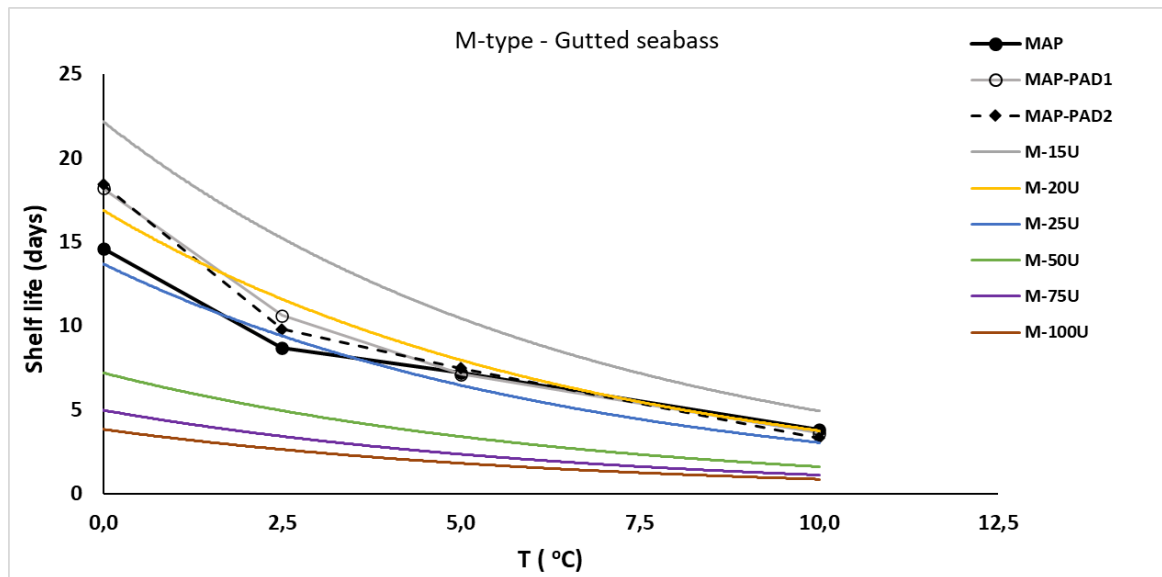
Στο Διάγραμμα 85, παρουσιάζονται οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών δεικτών τύπου Μ, όπως αυτή υπολογίστηκαν από το συνολικό μαθηματικό μοντέλο, σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.



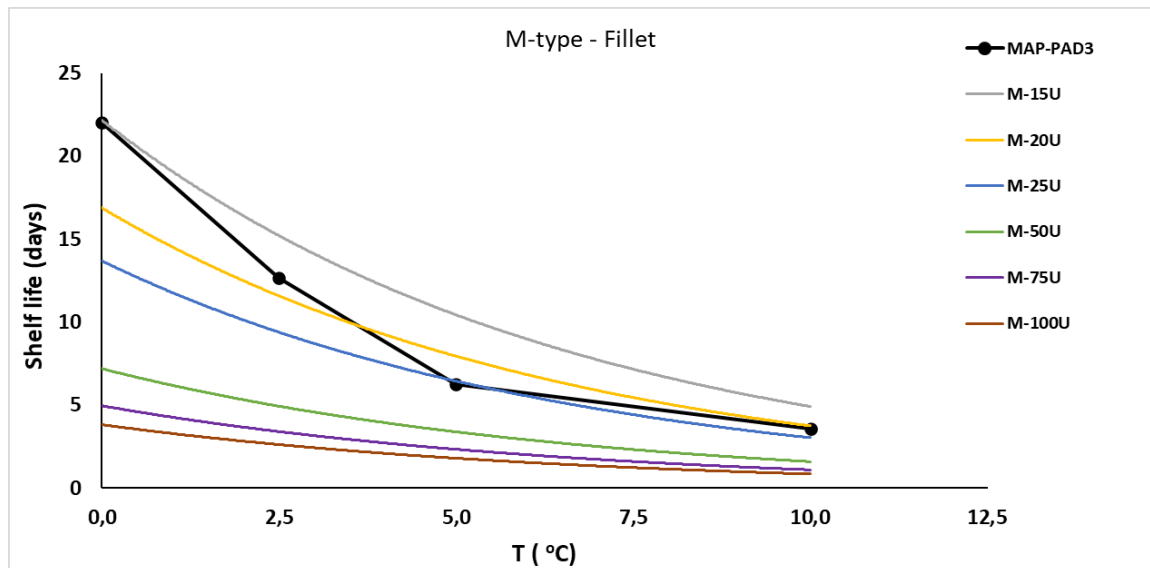
Διάγραμμα 85: Θεωρητικός χρόνος ζωής των ενζυμικών δεικτών τύπου Μ

Όπως είναι εμφανές στο διάγραμμα, με αύξηση τόσο της ενεργότητας του ενζύμου του δείκτη τύπου Μ, όσο και της θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος ζωής του δείκτη ΤΠΙ.

Αντιστοίχως αντιδρά και η διάρκεια ζωής των ιχθύων, δηλαδή με αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η διατηρησιμότητα του. Στα διαγράμματα 85 και 86, παρουσιάζεται ο χρόνος ζωής συνολικά του δείκτη τύπου Μ, καθώς και ο χρόνος ζωής των δειγμάτων λαβρακιού, στις συνθήκες που μελετήθηκαν.



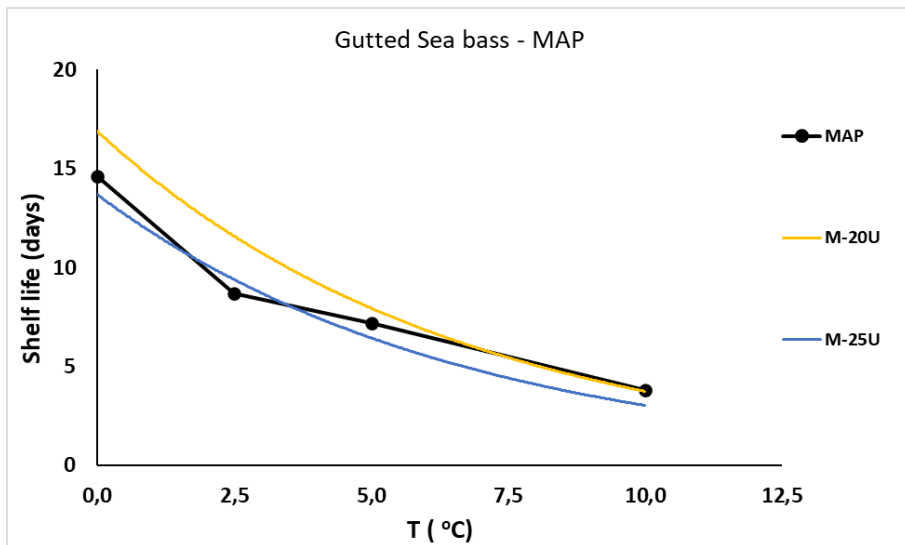
Διάγραμμα 86: Χρόνος ζωής των δεικτών τύπου M και του ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες συσκευασίας MAP, MAP-PAD1 και MAP-PAD2



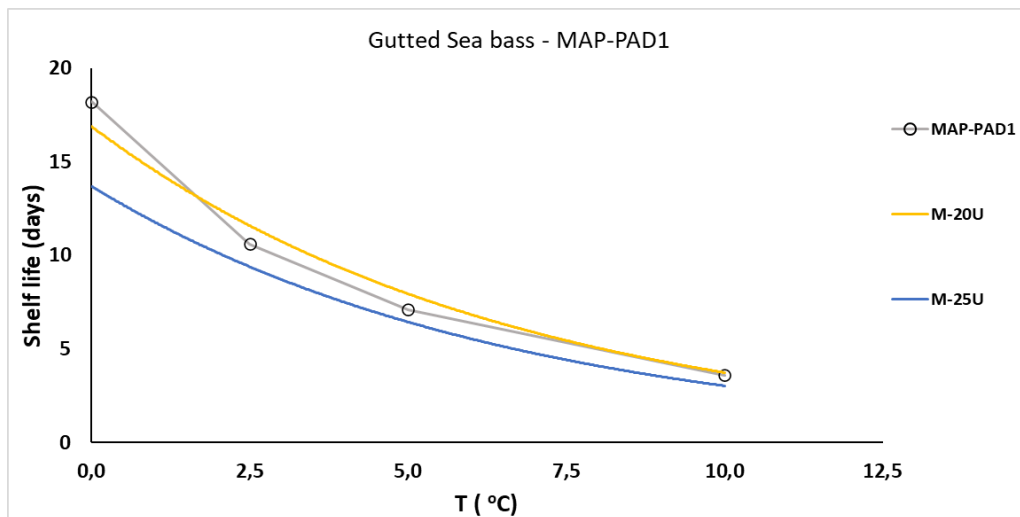
Διάγραμμα 87: Χρόνος ζωής των δεικτών τύπου M και του φιλέτου λαβρακιού σε συνθήκες συσκευασίας MAP-PAD3

Οι ενζυμικοί δείκτες τύπου M παρουσιάζουν ενέργεια ενεργοποίησης με μέγιστη διαφορά κατά περίπου 35 kJ/mol από την ενέργεια ενεργοποίησης των δειγμάτων λαβρακιού. Συγκεκριμένα αυτή η διαφορά παρουσιάζεται για το δείγμα φιλέτου με χρήση MAP-PAD3, όπου η ενέργεια ενεργοποίησης του είναι υψηλότερη κατά 35 kJ/mol από εκείνη του δείκτη. Στα υπόλοιπα δείγματα η διαφορά μεταξύ των ενεργειών ενεργοποίησης εμφανίζεται μικρότερη. Η διαφορά αυτή είναι αποδεκτή και ικανοποιητική για την αντιστοίχιση των δεικτών τύπου M με το λαβράκι.

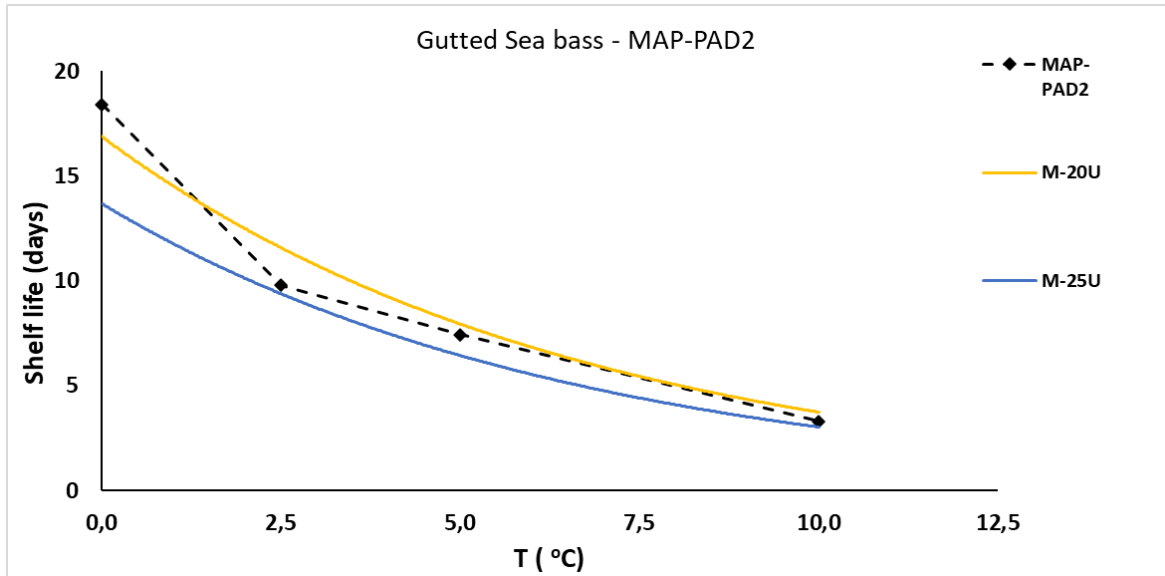
Στα παρακάτω διαγράμματα εμφανίζεται ο χρόνος ζωής των επικρατέστερων δεικτών τύπου M, με ενεργότητες 20 και 25u, και των αντίστοιχων δειγμάτων λαβρακιού, σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.



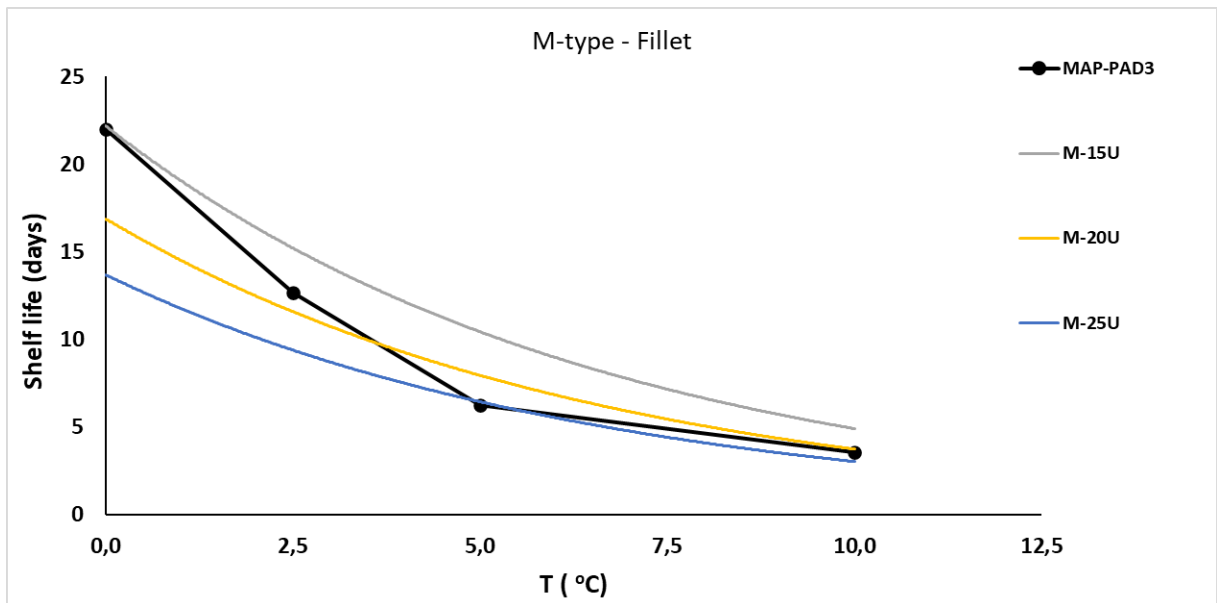
Διάγραμμα 88: Διάγραμμα χρόνου ζωής των επικρατέστερων δεικτών M20u, M25u και του δείγματος ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες MAP



Διάγραμμα 89: Διάγραμμα χρόνου ζωής των επικρατέστερων δεικτών M20u, M25u και του δείγματος ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες MAP-PAD1



Διάγραμμα 90: Διάγραμμα χρόνου ζωής των επικρατέστερων δεικτών M20u, M25u και του δείγματος ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες MAP-PAD2



Διάγραμμα 91: Διάγραμμα χρόνου ζωής των επικρατέστερων δεικτών M20u, M25u και του δείγματος φιλέτου λαβρακιού σε συνθήκες MAP-PAD3

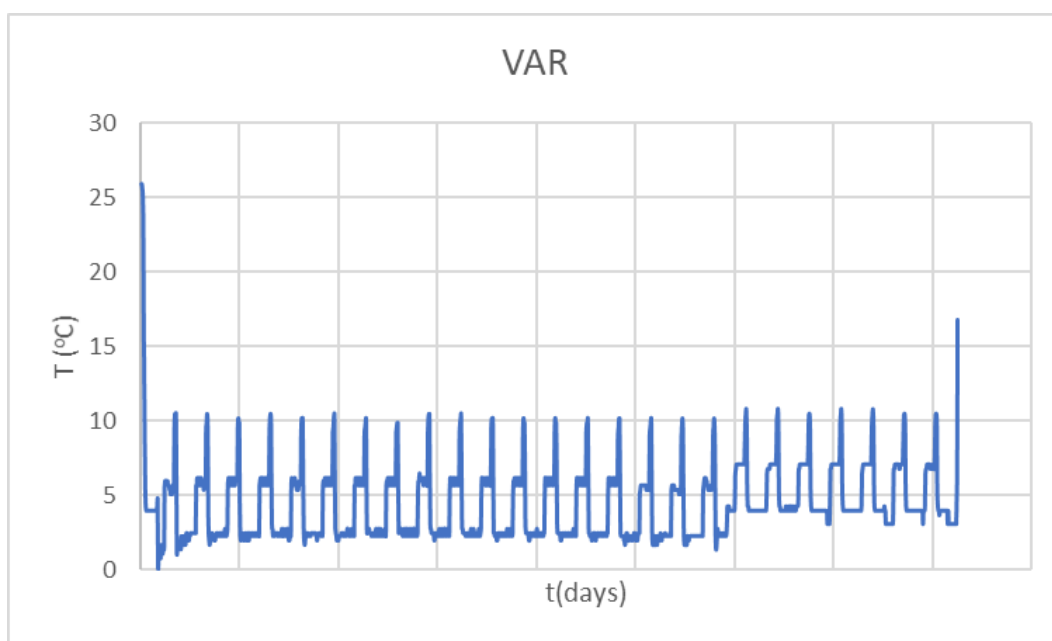
Από τα διαγράμματα, παρατηρείται πως καλύτερη αντιστοίχιση TTI και λαβρακιού, για όλες τις συνθήκες συσκευασίας, φέρει ο δείκτης M25u, διότι στις υψηλότερες θερμοκρασίες εμφανίζει ελάχιστα μικρότερες τιμές στο χρόνο ζωής, επομένως δρα προστατευτικά ως προς τον καταναλωτή, στην περίπτωση που το ιχθυηρό εκτεθεί σε ακατάλληλες θερμοκρασίες. Ενώ στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, οι οποίες είναι αυτές που ενδείκνυνται για το τρόφιμο, ο χρόνος ζωής θα καθορίζεται από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.

Ιδανικά, οι καμπύλες ΤΤΙ και λαβρακιού, θα έπρεπε να ταυτίζονται αλλά αυτό, όπως είναι κατανοητό, είναι εξαιρετικά δύσκολο. Επομένως, καταλήγουμε ότι οι ενζυμικοί δείκτες ΤΤΙ, στη μελέτη της παρούσας εργασίας, ιδανικά θα λειτουργούν επικουρικά της ημερομηνίας λήξης του τρόφιμου καθώς δεν καθίσταται δυνατό να τις αντικαταστήσουν πλήρως.

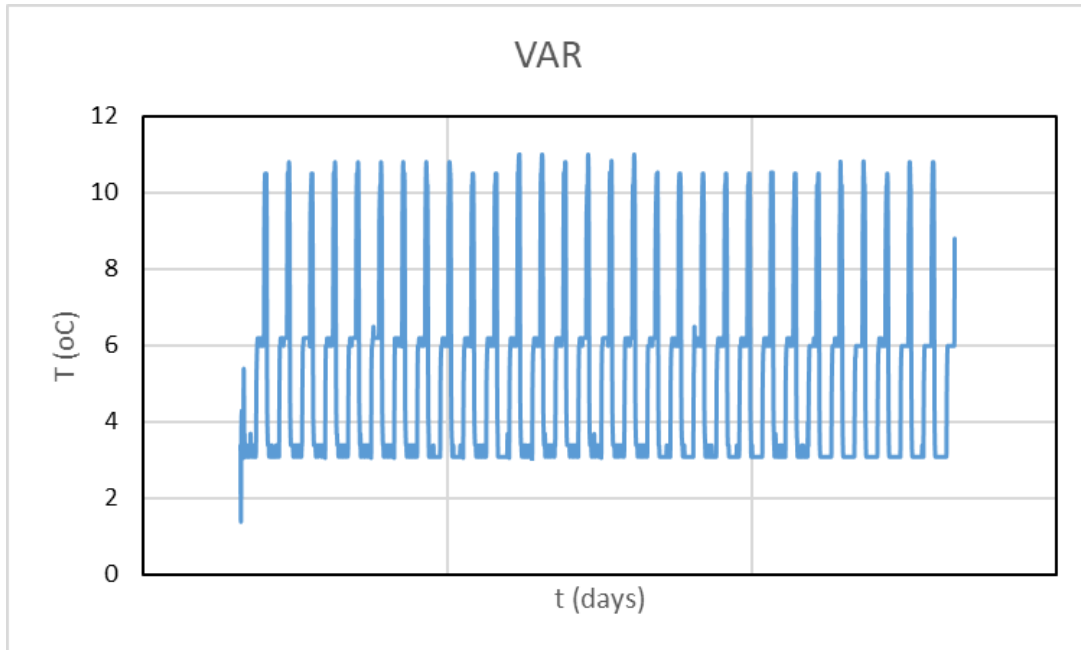
5.7 Έλεγχος αξιοπιστίας ενζυμικών ΤΤΙ και λαβρακιού με την έκθεση σε εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ

Η μέση θερμοκρασιακή κατανομή που εξήχθη από το καταγραφικό θερμοκρασίας (data loggers) που είχε τοποθετηθεί στους θαλάμους αποθήκευσης, τόσο για το ολόκληρο όσο και για το φιλέτο, φαίνεται διαγραμματικά στο Διάγραμμα 92 και 93, αντίστοιχα. Οι θάλαμοι ήταν ρυθμισμένοι ώστε να εκθέτουν το τρόφιμο στις εξής θερμοκρασίες,

- 10 ώρες στους 2,5 °C
- 5 ώρες στους 6°C, και
- 1 ώρα στους 10°C



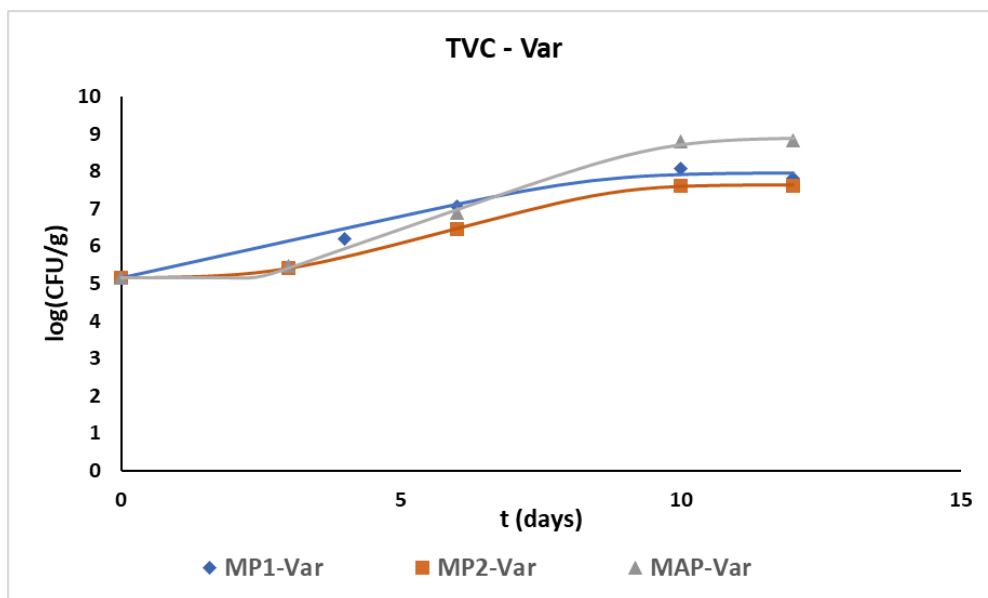
Διάγραμμα 92: Θερμοκρασιακή κατανομή VAR του ολόκληρου λαβρακιού και των προσαρμοσμένων δεικτών M25U



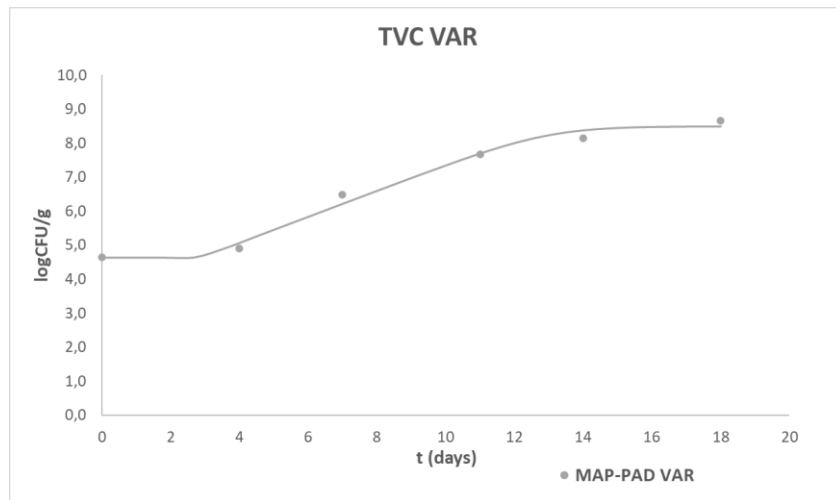
Διάγραμμα 93: Θερμοκρασιακή κατανομή VAR του φιλέτου λαβρακιού και των προσαρμοσμένων δεικτών M25U

5.7.1 Μικροβιακή ανάλυση

5.7.1.1 Ολική μικροβιακή χλωρίδα



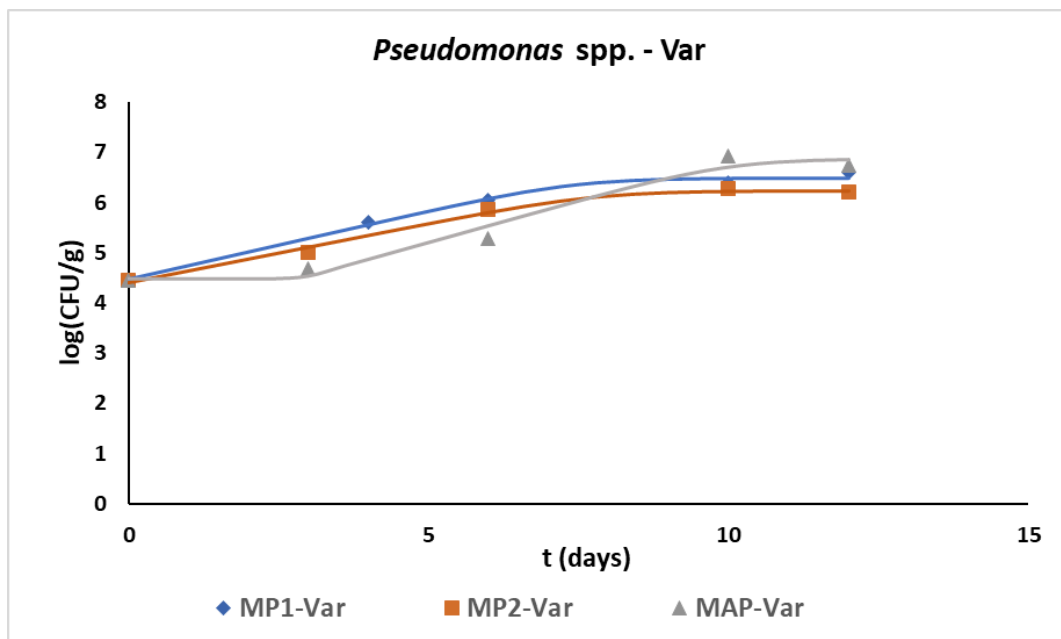
Διάγραμμα 94: Ανάπτυξη ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) ολόκληρου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP, MAP-PAD1, MAP-PAD2



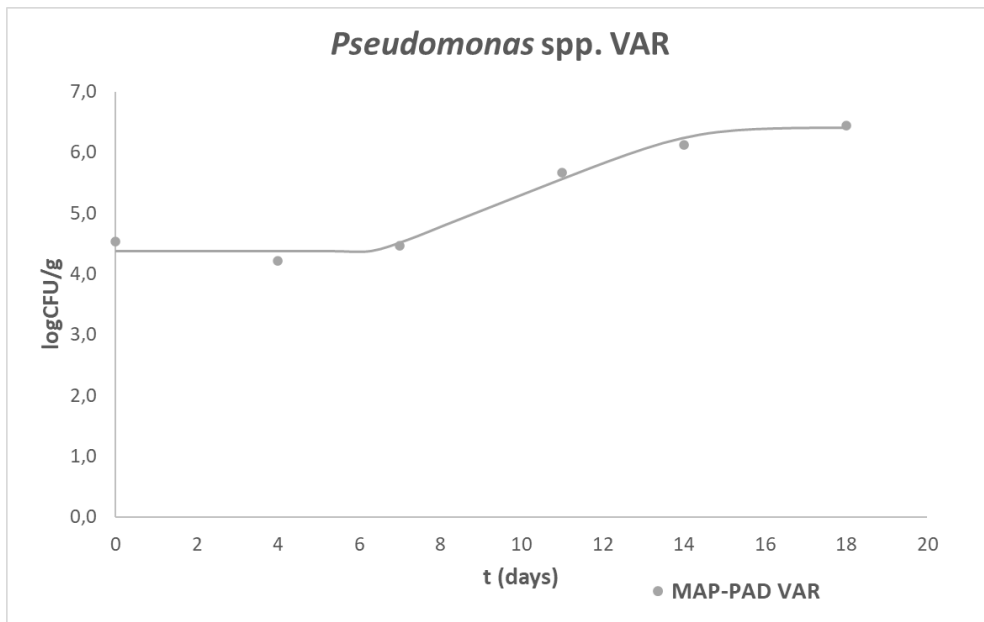
Διάγραμμα 95: Ανάπτυξη ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) φιλέτου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP-PAD3

Όπως και στα αποτελέσματα της μικροβιακής χλωρίδας στις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης, για το ολόκληρο φιλέτο, πιο αργή ανάπτυξη εμφανίζουν τα δείγματα με την χρήση του PAD2. Στα δείγματα MAP, MAP-PAD1 και MAP-PAD3 εμφανίζουν λανθάνουσα φάση περίπου 4 ημέρες.

5.7.1.2 Ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*)



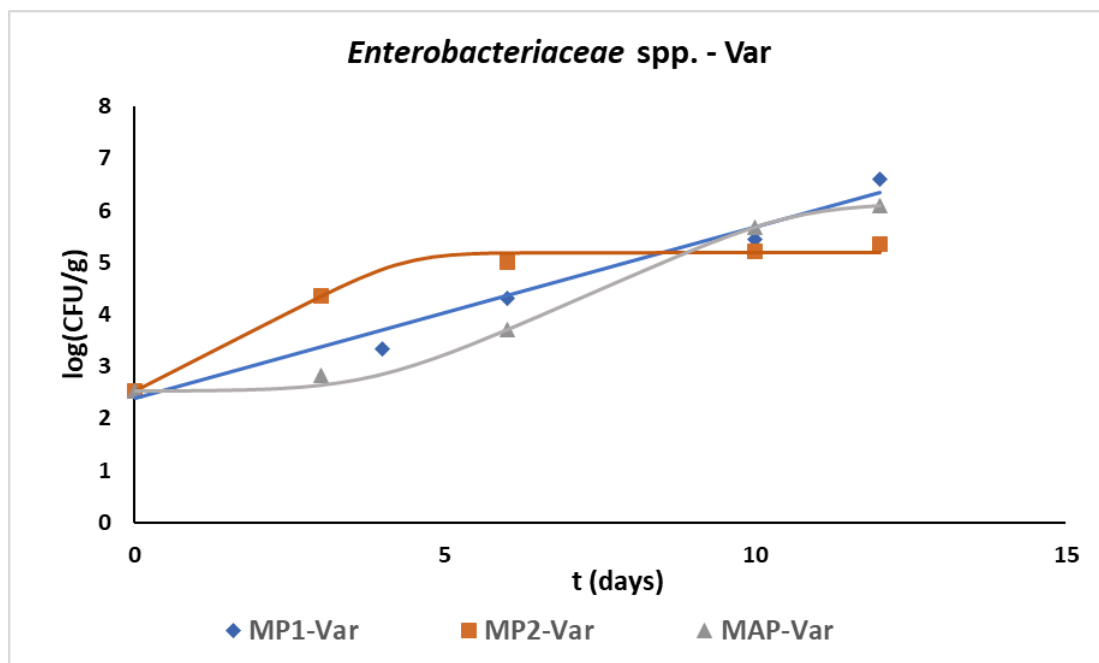
Διάγραμμα 96: Ανάπτυξη ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) ολόκληρου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP, MAP-PAD1, MAP-PAD2



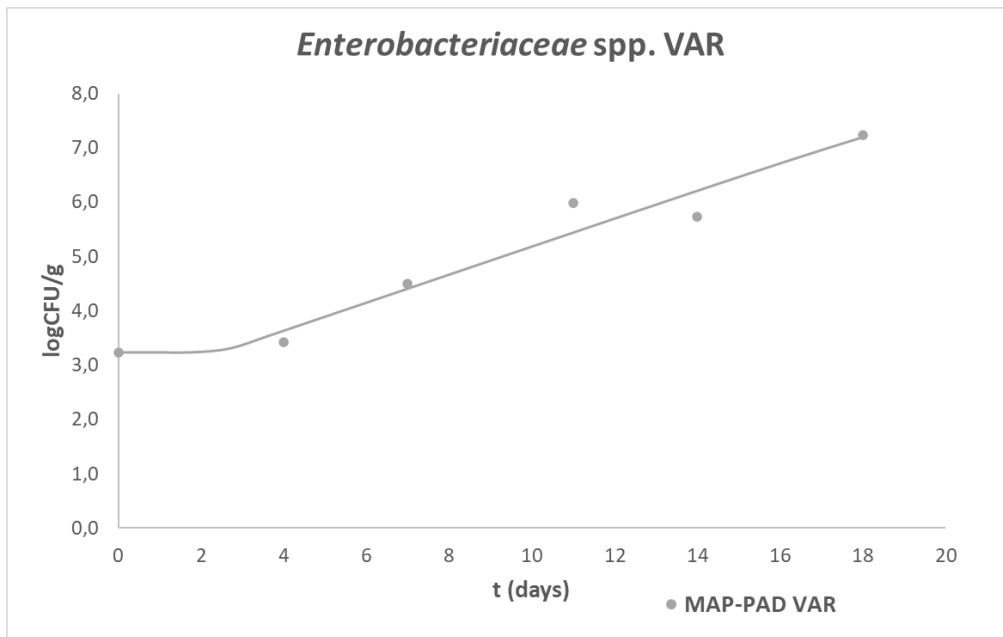
Διάγραμμα 97: Ανάπτυξη ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) φιλέτου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP-PAD3

Και στις ψευδομονάδες, παρατηρείται πως την πιο αργή ανάπτυξη την εμφανίζει το δείγμα με το PAD2. Η λανθάνουσα φάση του φιλέτου (MAP-PAD3) είναι 6 ημέρες και του ολόκληρου, του MAP συγκεκριμένα, 3 ημέρες.

5.7.1.3 Εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae spp.*)



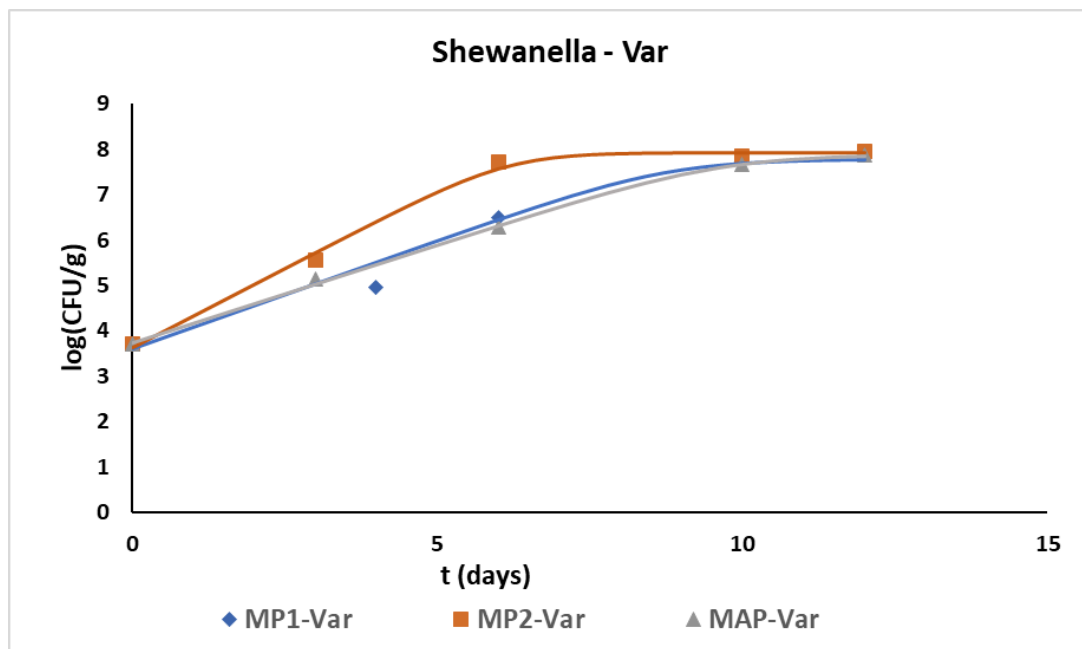
Διάγραμμα 98: Ανάπτυξη εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae spp.*) ολόκληρου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP, MAP-PAD1, MAP-PAD2



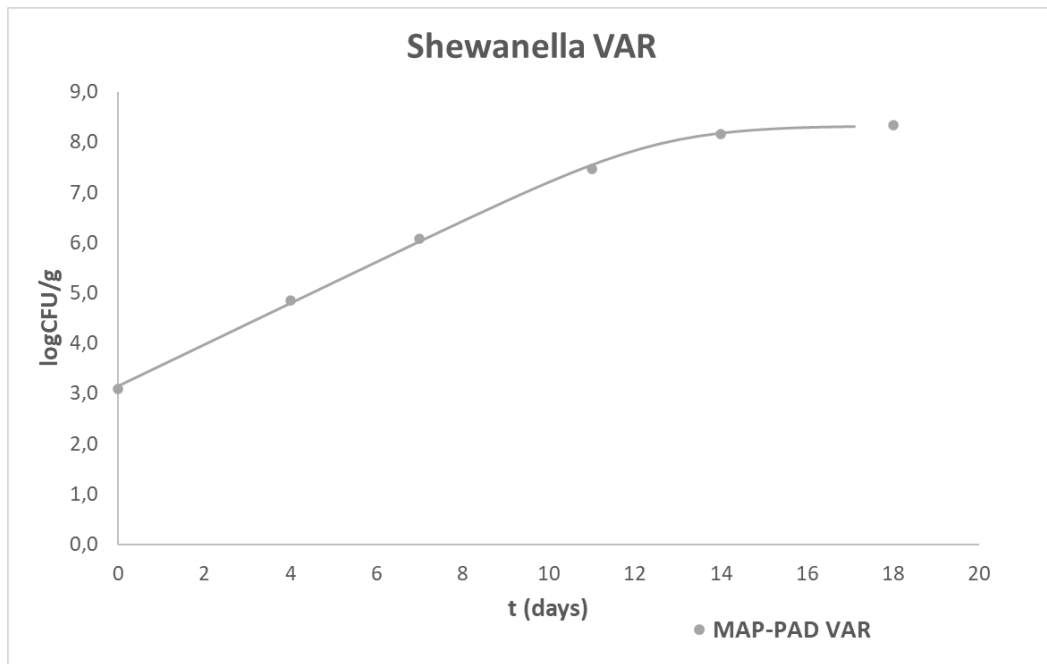
Διάγραμμα 99: Ανάπτυξη εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae spp.*) φιλέτου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP-PAD3

Ίδια συμπεράσματα, με τις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, παρατηρούνται και στις μεταβαλλόμενες συνθήκες, με τα δείγματα MAP να εμφανίζουν λανθάνουσα φάση ίση με 4 ημέρες, και τα δείγματα MAP-PAD3 ίση με 3 ημέρες.

5.7.1.4 Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (*Shewanella*)



Διάγραμμα 100: Ανάπτυξη βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο ολόκληρου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP, MAP-PAD1, MAP-PAD2

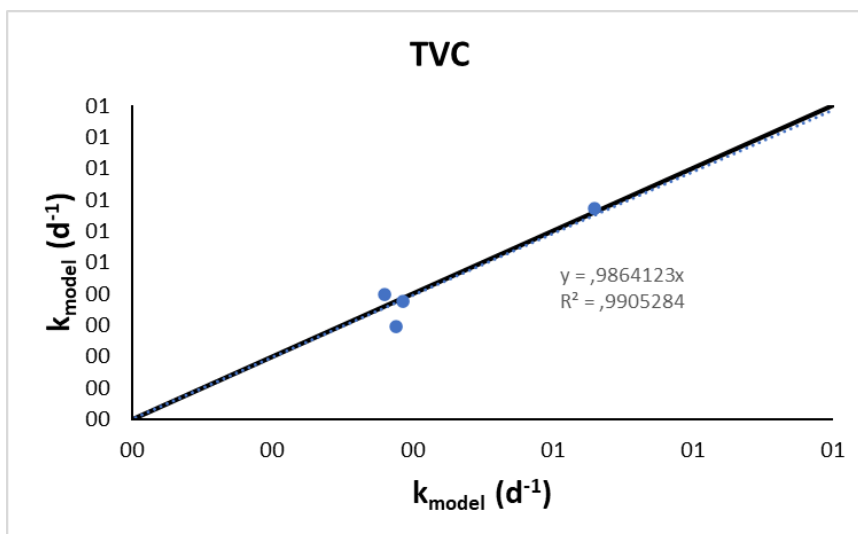


Διάγραμμα 101: Ανάπτυξη βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο φιλέτου λαβρακιού για τις συνθήκες MAP-PAD3

Για τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο, η πιο αργή ανάπτυξη εμφανίζεται στη συνθήκη MAP-PAD2, το οποίο είναι λογικό καθώς η ανάπτυξη της Shewanella, σε συνθήκες χρήσης διοξειδίου του άνθρακα, μειώνεται .

5.7.2 Σύγκριση πειραματικών και υπολογισμένων με βάση το μοντέλο ρυθμών

Στο διάγραμμα 102, παρουσιάζεται η προσαρμογή των πειραματικών ρυθμών, υπολογισμένων από το μοντέλο Baranyi και των ρυθμών που υπολογίστηκαν θεωρητικά από την προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius , της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, για τις μεταβαλλόμενες συνθήκες.



Διάγραμμα 102: Συσχέτιση πειραματικών ρυθμών και θεωρητικών υπολογισμένων με βάση την προσαρμογή στην εξίσωση Arrhenius για μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας

Όπως είναι εμφανές, η συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και θεωρητικών ρυθμών είναι πολύ ικανοποιητική, με συντελεστή προσαρμογής R^2 καθώς και κλίση της $y=ax$, σχεδόν ίσες με τη μονάδα. Αυτό επιβεβαιώνει, την αξιοπιστία του μοντέλου Baranyi για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων της ποιοτικής υποβάθμισης του λαβρακιού.

5.7.3 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής

Όπως στα δείγματα στις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, έτσι και στις μεταβαλλόμενες, ο προσδιορισμός της διατηρησιμότητας γίνεται μέσω της ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Υπολογίζεται για αποδεκτό όριο αλλοίωσης την τιμή $7 \log(\text{CFU})/\text{g}$, από τις εξισώσεις (4.11), (4.12). Στον πίνακα 39, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη διατηρησιμότητα των δειγμάτων αποθηκευμένων σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακά συνθήκες.

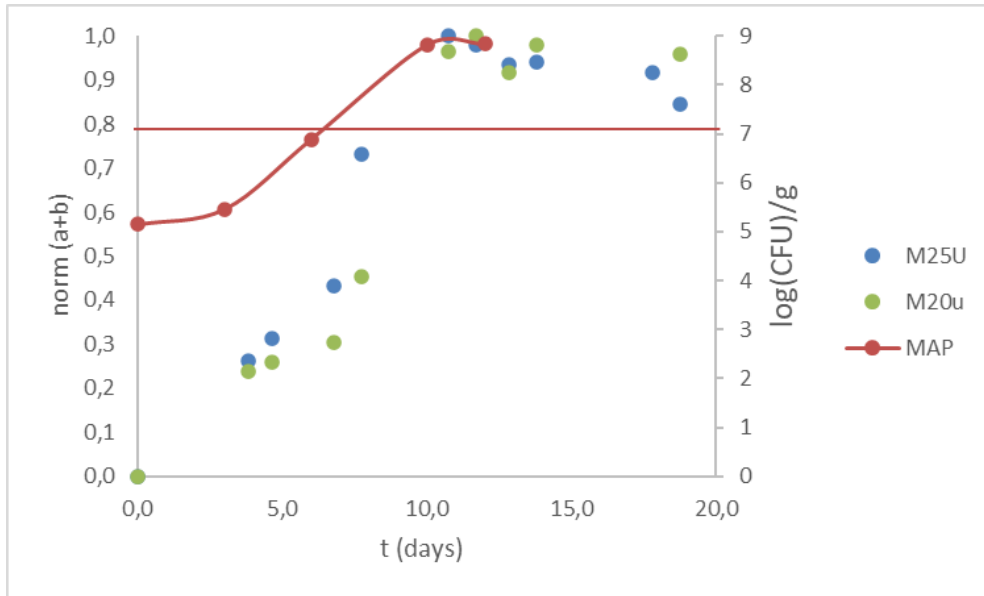
Πίνακας 39: Χρόνος ζωής για τα δείγματα σε κάθε συνθήκη αποθηκευμένα σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενο περιβάλλον

Συσκευασία	Shelf life (d)
AIR	4
MAP	7
MAP-PAD1	8
MAP-PAD2	9
MAP-PAD3	9

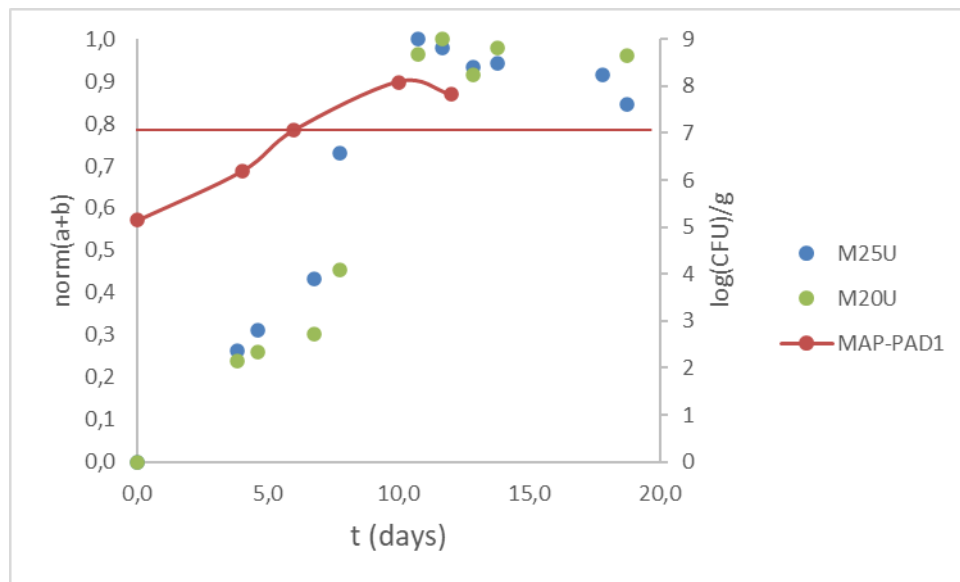
Όπως είναι λογικό, οι μεταβαλλόμενες συνθήκες ακολουθούν την συμπεριφορά που παρατηρήθηκε στα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες.

5.7.4 Σύγκριση αλλοίωσης λαβρακιού και απόκρισης των δεικτών TTI σε μεταβαλλόμενες συνθήκες

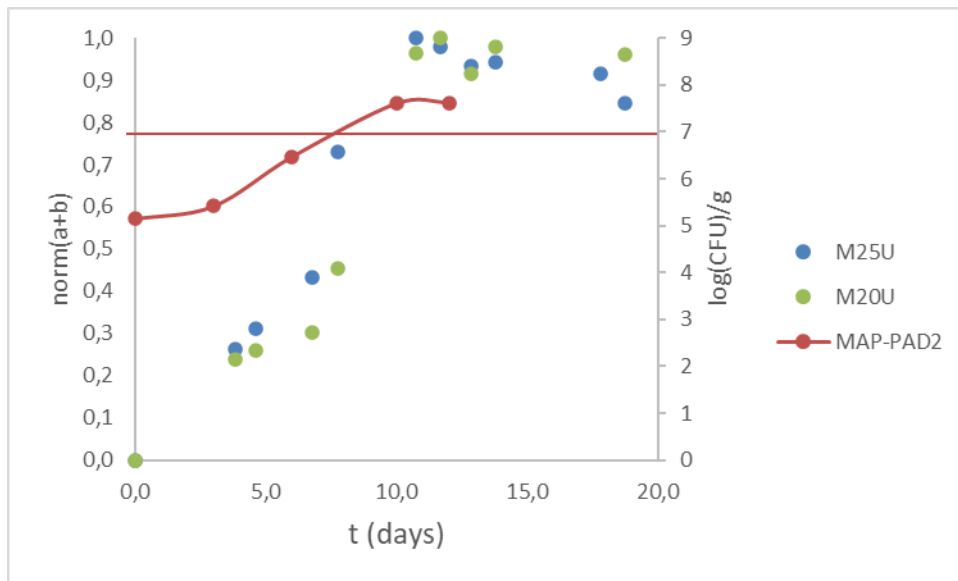
Στα διαγράμματα που παρατίθενται παρακάτω, παρουσιάζονται διαγραμματικά η ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας του λαβρακιού, σε κάθε συνθήκη συσκευασίας, και οι πειραματικές τιμές απόκρισης των επικρατέστερων δεικτών TTI, σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας. Η χαρακτηριστική γραμμή αντιπροσωπεύει τα όρια του χρόνου ζωής, του ιχθυηρού ($\log(\text{CFU})/\text{g}=7$) και της απόκρισης του TTI ($\text{norm}(a+b)=0,8$).



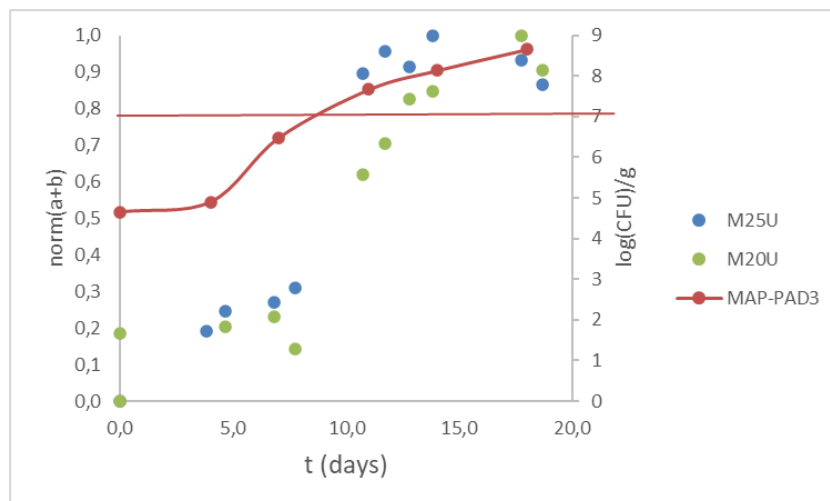
Διάγραμμα 103: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες MAP και απόκριση των δεικτών M20U, M25U σε μεταβαλλόμενες συνθήκες



Διάγραμμα 104: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες MAP-PAD1 και απόκριση των δεικτών M20U, M25U σε μεταβαλλόμενες συνθήκες



Διάγραμμα 105: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) ολόκληρου λαβρακιού σε συνθήκες MAP-PAD2 και απόκριση των δεικτών M20U, M25U σε μεταβαλλόμενες συνθήκες



Διάγραμμα 106: Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) φιλέτου λαβρακιού σε συνθήκες MAP-PAD3 και απόκριση των δεικτών M20U, M25U σε μεταβαλλόμενες συνθήκες

Η διακύμανση του μεταβαλλόμενου θερμοκρασιακά περιβάλλοντος, χρησιμοποιείται για να αντιπροσωπεύσει την πορεία του τρόφιμου και του προσαρμοσμένου δείκτη σε πραγματικές συνθήκες, κατά τις οποίες θα βρεθεί εκτεθειμένο σε ένα εύρος θερμοκρασιών.

Όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα, η υποβάθμιση της ποιότητας του λαβρακιού μέσω της ανάπτυξης ολικής μικροβιακής χλωρίδας, προσαρμόζεται με την απόκριση των επικρατέστερων δεικτών που επιλέχθηκαν, και είναι εμφανές πως δείκτης και τρόφιμο, στο κρίσιμο όριο αποδεκτότητας, παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά.

Κεφάλαιο 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν κεφάλαιο, θα γίνει αναφορά των αποτελεσμάτων της μελέτης που παρουσιάστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Το αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας αποτελείται από δύο σκέλη, το πρώτο ήταν η μελέτη της κινητικής αλλοίωσης δειγμάτων λαβρακιού ιχθυοκαλλιέργειας, φιλέτου και ολόκληρου απεντερωμένου, συσκευασμένα με τη χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας και η μελέτη της επίδρασης της ενεργής συσκευασίας, στην επιβράδυνση των φαινομένων υποβάθμισης της ποιότητας και την επέκταση του χρόνου ζωής. Μελετήθηκαν σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης, η μικροβιακή ανάπτυξη του λαβρακιού και διάφοροι φυσικοχημικοί δείκτες που σχετίζονται με την ποιότητα. Το δεύτερο σκέλος, αποτελούσε την μελέτη της κινητικής απόκρισης των ενζυμικών δεικτών ΤΠΙ διαφορετικής ενεργότητας, σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες. Οι δύο προαναφερθείσες μελέτες πραγματοποιήθηκαν με απώτερο στόχο τη συσχέτιση της κινητικής αλλοίωσης του λαβρακιού με την απόκριση των ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΠΙ, ώστε να γίνει η επιλογή του κατάλληλου δείκτη για την παρακολούθηση της ασφάλειας και ποιότητας του προϊόντος κατά την ψυκτική αλυσίδα. Τέλος, για την επαλήθευση των όσων αναφέρθηκαν, πραγματοποιήθηκε και μελέτη σε μεταβαλλόμενες συνθήκες αποθήκευσης, προσομοιάζοντας τις συνθήκες όπου εκτίθεται ένα ιχθυηρό κατά την ψυκτική αλυσίδα.

Γενικότερα, η ζήτηση των καταναλωτών για φρέσκα προϊόντα, που αυξάνεται συνεχώς, συμπεριλαμβανομένων και των αυξανόμενων απαιτήσεων που αφορούν την ποιότητα και την ασφάλεια των προϊόντων, έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στη μελέτη ανάπτυξης νέων συστημάτων για την ικανοποίηση αυτών. Η ενεργή και η έξυπνη συσκευασία αποτελούν συστήματα, τα οποία μελετώνται αρκετά χρόνια και η επίδρασή τους θεωρείται αποτελεσματική, για την κάλυψη των ολοένα και περισσότερων απαιτήσεων.

Η συσκευασία των ιχθυηρών με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας αλλά και η επίδραση με χρήση εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα, σύμφωνα με τη μελέτη στην παρούσα εργασία, ήταν αποτελεσματική. Τα αποτελέσματα της μικροβιακής ανάλυσης ανέδειξαν την ωφέλιμη χρήση της συσκευασίας υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) συνδυαστικά με την προσθήκη εκπομπών CO₂, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου ζωής στις συσκευασίες με τη χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας συγκριτικά με τη χρήση συσκευασίας αέρα, και παρατηρήθηκε επιπλέον παράταση της διατηρησιμότητας των συσκευασμένων ιχθυηρών με τη χρήση εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα. Η παράταση της διατηρησιμότητας ήταν πιο αποτελεσματική, όταν οι θερμοκρασίες έκθεσης του τροφίμου ήταν οι κατάλληλες, για παράδειγμα στους 0°C η διατηρησιμότητα των δειγμάτων του ολόκληρου λαβρακιού, με τη χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας

και εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα, ήταν 18 ημέρες, η αντίστοιχη με χρήση μόνο τροποποιημένης ατμόσφαιρας ήταν 14 ημέρες ενώ για τα δείγματα συσκευασμένα σε αέρα ήταν μόλις 9 ημέρες. Δηλαδή, η διατηρησιμότητα του ιχθύος διπλασιάστηκε με την χρήση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα. Βέβαια, και στις υψηλότερες συνθήκες παρουσιάστηκε μικρή παράταση της διάρκειας ζωής, καθώς το ολόκληρο λαβράκι σε αερόβια συσκευασία στους 10°C, είχε χρόνο ζωής 2 μέρες ενώ των αντίστοιχων δειγμάτων με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας ήταν 3 ημέρες. Για τα δείγματα του φιλέτου, παρατηρήθηκε παράταση του χρόνου ζωής μεταξύ των δειγμάτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη χρήση PAD (MAP-PAD3) στους 5°C, κατά 1 ημέρα, η διατηρησιμότητα ήταν 5 και 6 ημέρες, αντίστοιχα. Στον πίνακα 40 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της διατηρησιμότητας του λαβρακιού σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης, όπου τα δείγματα AIR, MAP, MAP-PAD1 και MAP-PAD2 αναφέρονται στο ολόκληρο λαβράκι, και τα δείγματα MAP-PAD3 και MAP(φιλέτο) (στους 5 °C) αναφέρονται στα φιλέτα λαβράκι.

Πίνακας 40: Διατηρησιμότητα των δειγμάτων λαβρακιού για κάθε συνθήκη

T (°C)	Συσκευασία	Χρόνος ζωής (d)
0°C	AIR	9
	MAP	14
	MAP-PAD1	18
	MAP-PAD2	18
	MAP-PAD3	22
2,5°C	AIR	6
	MAP	8
	MAP-PAD1	10
	MAP-PAD2	9
	MAP-PAD3	13
5°C	AIR	4
	MAP	7
	MAP-PAD1	7
	MAP-PAD2	8
	MAP (φιλέτο)	5
	MAP-PAD3	6
10°C	AIR	2
	MAP	3
	MAP-PAD1	3
	MAP-PAD2	3
	MAP-PAD3	3

Αντίστοιχα, η διάρκεια ζωής που υπολογίστηκε στα δείγματα των μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακά συνθηκών ήταν για το ολόκληρο λαβράκι 7, 8 και 9 ημέρες για τις

συνθήκες MAP, MAP-PAD1 και MAP-PAD2 αντίστοιχα, και για το φιλέτο σε συνθήκες MAP-PAD3 ήταν 9 ημέρες.

Η εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών που υπολογίστηκαν από το μοντέλο Baranyi, για την εύρεση της ενέργειας ενεργοποίησης, είχαν πολύ καλή προσαρμογή με συντελεστή προσαρμογής R^2 να κυμαίνεται μεταξύ τιμών 0,82-0,99. Από την εφαρμογή σε αυτό το μοντέλο, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης για κάθε συνθήκη, οι τιμές των οποίων παρατίθενται στον Πίνακα 41, η κωδικοποίηση του οποίου είναι η αντίστοιχη με τον Πίνακα 40.

Πίνακας 41: Ενέργεια ενεργοποίησης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών για κάθε συνθήκη αποθήκευσης

E _A (kJ/mol)				
Συσκευασία	TVC	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	<i>Shewanella</i>
AIR	83,10	87,26	120,67	80,06
MAP	63,45	86,17	76,66	91,10
MAP-PAD1	84,41	47,83	65,84	83,75
MAP-PAD2	93,95	59,00	86,49	96,26
MAP-PAD3	131,88	189,33	167,99	124,30

Πέραν της ανάπτυξης μικροοργανισμών, μελετήθηκαν και οι μεταβολές σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, τα οποία υποβαθμίζουν την αλλοίωση. Σε όλα τα δείγματα η σύσταση του οξυγόνου μειωνόταν καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης, και μηδενιζόταν στο τέλος του χρόνου ζωής. Η σύσταση του διοξειδίου του άνθρακα, στα δείγματα συσκευασμένα σε αέρα ξεκινάει από μηδενική σύσταση κι αυξάνεται κατά την αποθήκευση. Στα συσκευασμένα δείγματα σε συνθήκες MAP και ενεργής συσκευασίας η περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα ξεκινά από 22-27%, αναλόγως το δείγμα, η οποία με την πάροδο του χρόνου μειώνεται και στη συνέχεια αυξάνεται φτάνοντας σε μια τελική τιμή που κυμαινόταν από 35-40% για το ολόκληρο λαβράκι στις ενεργές συσκευασίες, ενώ δεν ξεπερνούσε το 25% στις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Στο φιλέτο, αντίστοιχα, η συσκευασία με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας δεν ξεπέρασε το 40%, ενώ η τελική τιμή στα δείγματα με χρήση PADs κυμαινόταν από 65-70%. Συγκεκριμένα, στα δείγματα MAP το ελάχιστο σημείο στη σύσταση εμφανίζεται νωρίτερα, συγκεκριμένα για το ολόκληρο λαβράκι στις 3-4 ημέρες, ενώ στο φιλέτο στις 7 ημέρες, και φτάνει σε

χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις συσκευασίες που χρησιμοποιούν εκπομπές CO₂. Οι αντίστοιχες τιμές περιεκτικότητας σε διοξείδιο του άνθρακα για τις μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακά συνθήκες έφταναν σε τελική τιμή για τα δείγματα με τη χρήση PAD, στο ολόκληρο λαβράκι, που κυμαινόταν από 40-45%, ενώ στο αντίστοιχο με τη χρήση MAP δεν ξεπέρασε το 30%, και για το φιλέτο η τελική τιμή με τη χρήση PAD ήταν 66%.

Όσον αφορά τη μεταβολή του pH των δειγμάτων, αρχικά παρατηρήθηκε μείωση μέχρι την 7^η ημέρα αποθήκευσης για το ολόκληρο λαβράκι, ενώ για το φιλέτο μέχρι την 11^η ημέρα, έως και την τιμή 6,2, και στη συνέχεια αυξήθηκε φτάνοντας σε τιμή που κυμάνθηκε για όλα τα δείγματα από 6,3-6,5. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά τη νεκρική ακαμψία, και η αύξηση στις μεταβολικές δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα στον μυϊκό ιστό. Επιπλέον, από τις μετρήσεις υφής και χρώματος δεν προέκυψε κάποιο συγκεκριμένο αποτέλεσμα, καθώς παρατηρούνταν αυξομειώσεις σε όλη τη διάρκεια αποθήκευσης. Τέλος, μετρούνταν και η οξείδωση των λιπαρών οξέων με τη μέθοδο Tbars, η οποία για όλα τα δείγματα έδειχνε μια αυξητική τάση, αλλά δεν έφερε κάποιο συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Βέβαια, σχεδόν κανένα από τα δείγματα δεν ξεπέρασε το όριο αποδοχής προς κατανάλωση (7-8 mg MDA/kg), και στα περισσότερα δεν ξεπέρασε ούτε το όριο της καλής ποιότητας (5 mg MDA/kg).

Μελετήθηκε επίσης, στα πλαίσια της εργασίας, η κινητική απόκριση των ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών TTI, τύπου M, για το εύρος ενεργοτήτων 15-20-25-50-75-100u. Από τη μελέτη αυτή, ήταν εμφανές πως με αύξηση τόσο της ενεργότητας όσο και της θερμοκρασίας, η διάρκεια ζωής του δείκτη μειώνεται. Οι μετρήσεις της μεταβολής του χρώματος των TTI, επεξεργάστηκαν μέσω του υπολογιστικού προγράμματος SigmaPlot 10.0, από το οποίο υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές k_1 και k_2 που περιγράφουν το κινητικό μοντέλο της απόκρισης των TTI. Μέσω της προσαρμογής αυτών των παραμέτρων στην εξίσωση του Arrhenius, υπολογίστηκε για κάθε ενεργότητα του δείκτη η ενέργεια ενεργοποίησης και οι κινητικές παράμετροι αναφοράς. Από τα αποτελέσματα, φάνηκε πως με αύξηση της ενεργότητας, υπήρξε μείωση των κινητικών σταθερών αναφοράς και, κατά κύριο λόγο, αύξηση της ενέργειας ενεργοποίησης. Επιπλέον, υπολογίστηκε και η διάρκεια απόκρισης (ζωής) των ενζυμικών δεικτών, με το όριο λήξης των δεικτών, οπτικά μεταφραζόμενο με μεταβολή του δείκτη σε κόκκινο χρώμα, την τιμή απόκρισης ίση με 0,8 ($\log_{10}(a+b)=0,8$), όπου επιβεβαιώθηκε η παρατήρηση που έγινε διαγραμματικά, και με αύξηση της ενεργότητας και της θερμοκρασίας, μειωνόταν η διάρκεια ζωής. Οι τιμές που υπολογίστηκαν φαίνονται στον Πίνακα 42.

Πίνακας 42: Διάρκεια ζωής δεικτών TTI τύπου M για εύρος ενεργοτήτων

T (°C)	M-15u	M-20u	M-25u	M-50u	M-75u	M-100u
0	-	-	18,0	8,0	5,0	4,5

2,5	11,6	9,1	9,3	5,0	3,7	3,1
5	9,7	7,7	5,9	3,2	2,2	1,5
10	7,7	3,9	2,8	1,4	1,0	0,9

Προκειμένου να γίνει η συσχέτιση της απόκρισης του δείκτη τύπου M με την ποιοτική υποβάθμιση των δειγμάτων λαβρακιού, υπολογίστηκε το συνολικό μαθηματικό μοντέλο των ενζυμικών δεικτών αυτού του τύπου, από το οποίο προσδιορίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης και είχε τιμή 96,99 kJ/mol. Η αξιοπιστία αυτού του μοντέλου ελέγχθηκε, συγκρίνοντας το πειραματικό χρόνο ζωής που υπολογίστηκε, με το χρόνο ζωής που προκύπτει από το μοντέλο, και η συσχέτιση τους ήταν πολύ ικανοποιητική με συντελεστή προσαρμογής R^2 ίσο με 0,96.

Εν συνεχεία, η κατάλληλη επιλογή του δείκτη TPI προϋποθέτει παραπλήσιες τιμές στους χρόνους ζωής του τρόφιμου και του δείκτη και διαφορά στην ενέργεια ενεργοποίησης μικρότερη των 40 kJ/mol (Ταουκίς & Labuza, 1989), που μεταφράζεται σε σφάλμα εκτίμησης μικρότερο του 15%. Το κριτήριο για την ενέργεια ενεργοποίησης πληρούνταν. Από τη συσχέτιση του χρόνου ζωής των δειγμάτων λαβρακιού και των δεικτών τύπου M, οι επικρατέστεροι ήταν οι δείκτες με ενεργότητες M20u και M25u. Τέλος, έγινε και μελέτη των συνθηκών αλλοίωσης των δειγμάτων και των επικρατέστερων TPI σε μεταβαλλόμενες συνθήκες, ώστε να προσομοιαστεί η πορεία του προϊόντος σε πραγματικές συνθήκες, για τον έλεγχο της αξιοπιστίας, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και της απόκρισης των δεικτών TPI, ιδιαίτερα προς το όριο λήξης του χρόνου ζωής. Η καλύτερη αντιστοίχιση παρατηρήθηκε για τον δείκτη M25u, ο οποίος στις υψηλότερες θερμοκρασίες εμφάνιζε ελάχιστα μικρότερες τιμές, επομένως λειτουργεί προστατευτικά για τον καταναλωτή, στην περίπτωση που το προϊόν εκτεθεί σε ακατάλληλες θερμοκρασίες, ενώ στις χαμηλότερες, όπου και ενδείκνυνται για το τρόφιμο, ο χρόνος θα καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης. Ιδανικά, η επιθυμία είναι η κινητική απόκριση του δείκτη και η κινητική αλλοίωσης του τρόφιμου να ταυτίζονται, αλλά αυτό είναι εξαιρετικά απαιτητικό. Επομένως, σύμφωνα με την μελέτη στην παρούσα διπλωματική εργασία, ο ενζυμικός δείκτης TPI τύπου M, δεν δύναται να αντικαταστήσει ολοκληρωτικά την ημερομηνία λήξης, αλλά μπορεί να λειτουργήσει επικουρικά με αυτήν για την διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας του προϊόντος.

Η αποτελεσματικότητα της συσκευασίας με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας, και ακόμα περισσότερο της ενεργής συσκευασίας με τη χρήση εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα, φαίνεται πως είναι ικανοποιητική, για την παράταση της διατηρησιμότητας και της ποιότητας των ιχθυηρών, μέσω πολυάριθμων μελετών σε βάθος χρόνου. Επομένως, μελλοντικά θα ήταν ωφέλιμο, να αναπτυχθούν περισσότερα μαθηματικά μοντέλα για την περιγραφή της αλλοίωσης ποιότητας των

προϊόντων σε συνδυασμό με τη χρήση ενεργών συσκευασιών και τροποποιημένης ατμόσφαιρας, προκειμένου να υπάρξει ακριβής προσαρμογή στα συστήματα αυτά, τα οποία μοντέλα δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς ακόμη. Επιπλέον, και η εφαρμογή της έξυπνης συσκευασίας αποτελεί μια καινοτόμα και υποσχόμενη τεχνολογία, η οποία έχει μελετηθεί και αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, αλλά υπάρχουν αρκετά εμπόδια στην εμπορική εφαρμογή της μαζικά.

Ως συνέχεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μέσα από τα αποτελέσματα της οποίας φαίνεται η θετική επίδραση της ενεργής συσκευασίας, για την παράταση της διατηρησιμότητας και της ποιότητας καθώς και η χρησιμότητα της έξυπνης συσκευασίας για την ασφάλεια και την ενημέρωση του καταναλωτή όσον αφορά το προϊόν επιλογής του. Είναι σημαντικό να μελετηθούν τα συστήματα αυτά και να γενικευτούν για περαιτέρω τρόφιμα, όπως είναι τα τυριά, τα πουλερικά, τα κρέατα και άλλων ειδών ιχθυηρά, τα οποία είναι προϊόντα με μεγάλη εξάρτηση από τη θερμοκρασία και κατάλληλοι στόχοι για την ασφαλή χρήση της ενεργής συσκευασίας. Επίσης, σημαντική είναι και η μελέτη της επίδρασης σε αυτά τα συστήματα άλλων παραγόντων πέραν της θερμοκρασίας, όπως είναι η έκθεση στο φως και το pH. Οι καινοτομίες στον τομέα της ενεργής και έξυπνης συσκευασίας μπορούν να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις των καταναλωτών και να συμβάλλουν στην ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων που καταναλώνουν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agerbo, P., Jorgensen, B. M., Jensen, B., Borresen, T., & Holmer, G. (1992). Enzyme inhibition by secondary lipid autoxidation products from fish oil. In *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 3(10), 549-553.
- Alparslan Y., Gürel C., Metin C., Hasanhocaoglu H., Baygar T. 2012. Determination of Sensory and Quality Changes at Treated Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) During Cold-Storage. *Food Processing & Technology*. Volume 3.
- Ang', J. F., & Haard, N. F. (1985). *CHEMICAL COMPOSITION AND POSTMORTEM CHANGES IN SOFT TEXTURED MUSCLE FROM INTENSELY FEEDING ATLANTIC COD (GADUS MORHUA, L)*. In *Journal of Food Biochemistry*, 9(1), 49-64.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 199–218.
- Basurco B. Lovatelli A.. 2003. The aquaculture situation in the Mediterranean Sea predictions for the future. In: Research Gate. Full-text (PDF) Available from: May 17, 2016.
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P.. 2009. *Food Chemistry*. Springer. 4th Revised and extended edition. Pages 617-639
- Botta J.R.. 1995. *Evaluation of Seafood Freshness Quality*. Library of Congress. USA.
- Cadun, A., Cakli, S., & Kisla, D. (2005). A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry*, 90(1–2), 53–59.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18(5), 391–397.
- Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 305-317.
- Dalgaard, P., & Huss, H. H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. In *International Journal of Food Microbiology*, 19, 283-294.
- Dalgaard, P., & Huss, H. H. (1997). Mathematical modelling used for evaluation and prediction of microbial fish spoilage. *Seafood safety, processing and biotechnology*, 73-89.
- Dolan K.D., Singh R.P. and Wells J.H., (1985). Evaluation of time-temperature related quality changes in ice cream during storage. *J. Food Proc. Preserv.*, (9) 253-71.

Erkan N., Özden Ö. 2006. Gutted and Un-Gutted Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) Stored in Ice: Influence on Fish Quality and Shelf-Life. *International Journal of Food Properties*. Volume 9. Pages 331-345.

Fellows P. 2000. Dehydration. In: Fellows P. *Food Processing Technology: Principles and Practice*. 2nd Edition. CRC Press. Chapter 15. Pages 311-339. Cambridge, England.

Giannoglou, M., Evangelopoulou, A. M., Perikleous, N., Baclori, C., Tsironi, T., & Taoukis, P. (2019). Time temperature integrators for monitoring the shelf life of ready-to-eat chilled smoked fish products. *Food Packaging and Shelf Life*, 22.

Giannoglou, M., Touli, A., Platakou, E., Tsironi, T., & Taoukis, P. S. (2014). Predictive modeling and selection of TTI smart labels for monitoring the quality and shelf-life of frozen seafood. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 294-301.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121–137.

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*. Volume 219. Pages 584-587.

Gutiérrez, E., Lozano, S., & Guillén, J. (2020). Efficiency data analysis in EU aquaculture production. *Aquaculture*, 520(December 2019).

Haard, N. F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, 25(4), 289–307.

Heidmann Soccol, M. C., & Oetterer, M. (2003). Use of Modified Atmosphere in Seafood Preservation. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY AN INTERNATIONAL JOURNAL*, 46, 569–580.

J. M. FARBER, *Listeria monocytogenes* in Fish Products. *J Food Prot* 1 December 1991, 54 (12), 922–924.

Koutsoumanis, K. (2001). Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1821–1829.

Koutsoumanis, K., & Nychas, G.-J. E. (2000). Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 60). 171-184

Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., Taoukis, P.S. and Nychas, G.J. (1998). MODELLING THE EFFECT OF OREGANO (*ORIGANUM VULGARE*) ESSENTIAL OIL ON THE DEATH/SURVIVAL OF *SALMONELLA ENTERITIDIS* IN HOMEMADE TARAMASALAD. *Acta Hort.* 476, 171-178

Kyranas, 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.

Love R.M., (1997). Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. In: *Fish Processing Technology*, (edited by G.M. Hall), Blackie Academic, Chapman and Hall, London, UK.pp.1-30

Özden Ö., Erkan N. 2008. Comparison of biochemical composition of three aqua cultured fishes (*Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Dentex dentex*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. Volume 59. Pages 545–557

Parlapani, F. F., Haroutounian, S. A., Nychas, G. J. E., & Boziaris, I. S. (2015). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2°C. *Food Microbiology*, 50, 44–53.

Perdikaris, C., & Paschos, I. (2010). Organic aquaculture in Greece: A brief review. *Reviews in Aquaculture*, 2(2), 102–105.

Taoukis, P. S. (2001). Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. *Food process modelling*, 512.

Taoukis, P. S., & Labuza, T. P. (1989). Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products. *Journal of Food Science*, 54(4), 783-788.

Taoukis, P. S., Labuza, T. P. (2003). Time-temperature indicators (TTIs). *Novel food packaging techniques*, 103-126.

Tinker J.H., Slavin J.W., Learson R.J., Empola V.G., (1985). Evaluation of automated timetemperature monitoring system in measuring for freshness of chilled fish. IIF-IIR Commissions C2, D3 4 286-90

Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B., & Aksnes, A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 146(3), 395–401.

Tsironi T., Stamatiou A., Giannoglou M., Velliou E., Taoukis P.S., (2011). Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets LWT - *Food Science and Technology* 44 (2011), 1156-1163.

Tsironi T.N., Taoukis P.S., (2019). Advances in Conventional and Nonthermal Processing of Fish for Quality Improvement and Shelf Life Extension. Reference Module in Food Science. Elsevier, pp. 1–7.

Tsironi, T., Anjos, L., Pinto, P. I. S., Dimopoulos, G., Santos, S., Santa, C., Manadas, B., Canario, A., Taoukis, P., & Power, D. (2019). High pressure processing of

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets and tools for flesh quality and shelf life monitoring. *Journal of Food Engineering*, 262(May), 83–91.

Tsironi, T., Gogou, E., Velliou, E., Taoukis, P. S. (2008). Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) on shelf-life optimization of vacuum-packed chilled tuna. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 108-115

Tsironi, T., 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)

Wang M.-S., Wang L.-H., Bekhit A. E.-D., Yang J., Hou Z.-P., Wang Y.-Z., Dai Q.-Z., Zeng X.-A.. 2018. A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing. *Journal of food engineering*. Volume 223. Pages 32-41

Ελληνική Οργάνωση Παραγωγών Υδατοκαλλιέργειας (ΕΛΟΠΥ), Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια - Ετήσια έκθεση 2021.

Καββαδίας Σ.. 2002. Ετήσιες διακυμάνσεις αιματολογικών παραμέτρων στο ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.) και συσχετισμός τους με τις φυσιολογικές μεταβολές αβιοτικών παραμέτρων, σε εντατική εκτροφή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

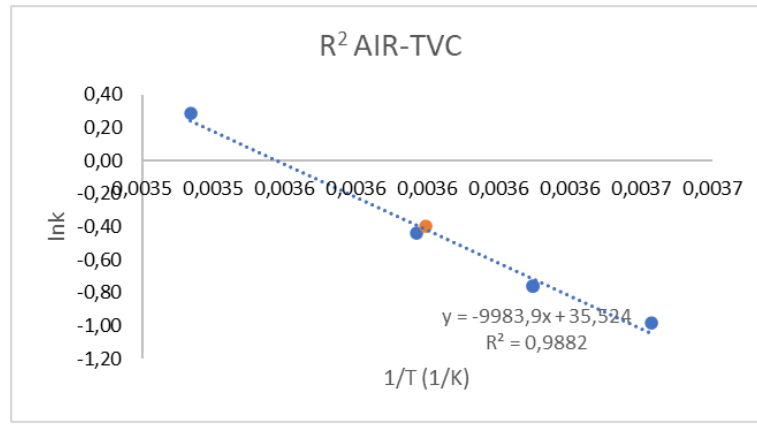
Παπαναστασίου Δ.. 1990. Τεχνολογία και ποιοτικός έλεγχος αλιευμάτων Ι. Εκδόσεις Ίων.

Τούλη Α.. 2013. Έξυπνη συσκευασία: Μελέτη και εφαρμογή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (TTI) στη ψυκτική αλυσίδα κατεψυγμένων θαλασσινών. Διπλωματική εργασία. Αθήνα

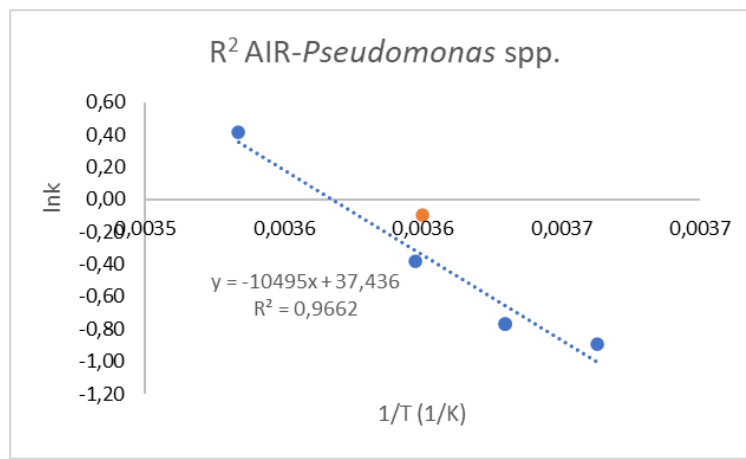
Τσιρώνη Θ..N.. 2010, Μελέτη μη θερμικών προκατεργασιών για τη βελτίωση διατηρησιμότητας ιχθυηρών. Αθήνα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

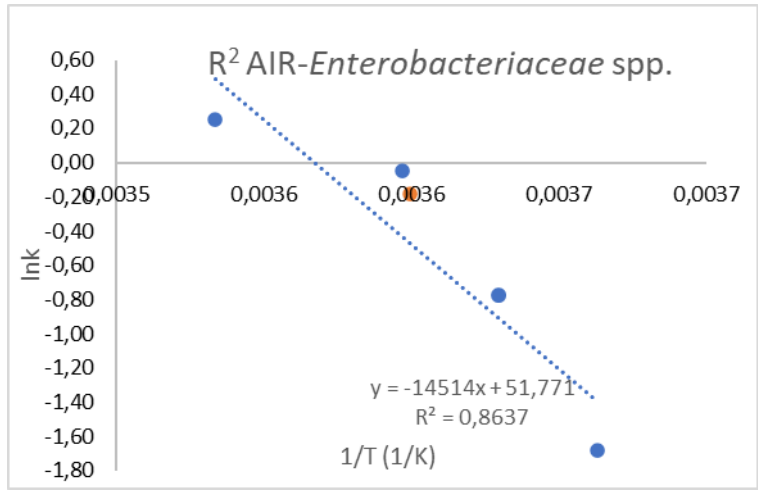
Διαγράμματα εφαρμογής γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius για δείγματα λαβρακιού (ολόκληρο και φιλέτο)



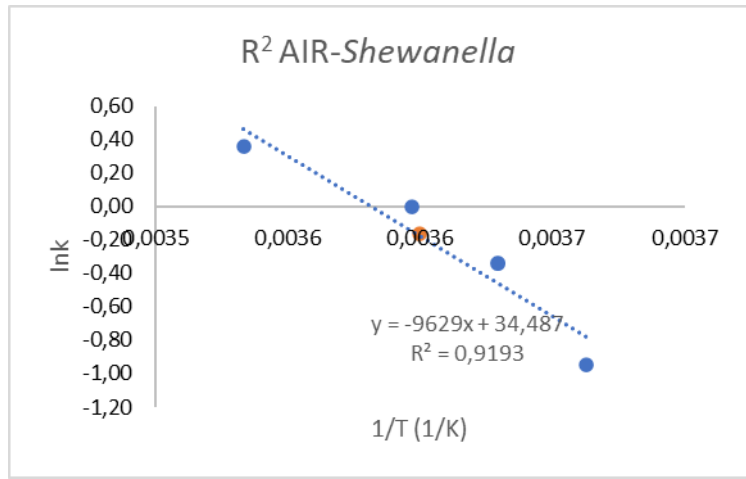
Διάγραμμα 1: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες AIR



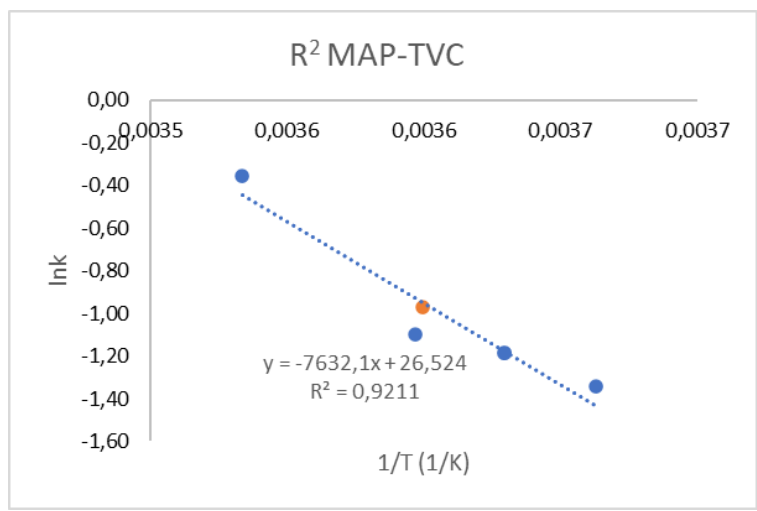
Διάγραμμα 2: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες AIR



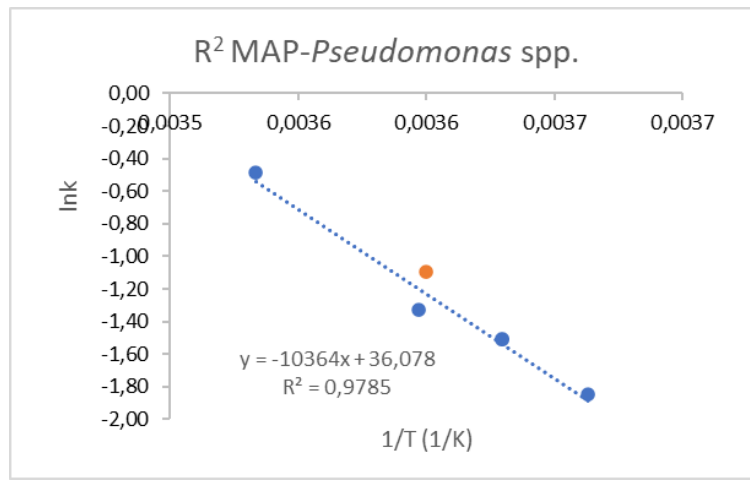
Διάγραμμα 3: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες AIR



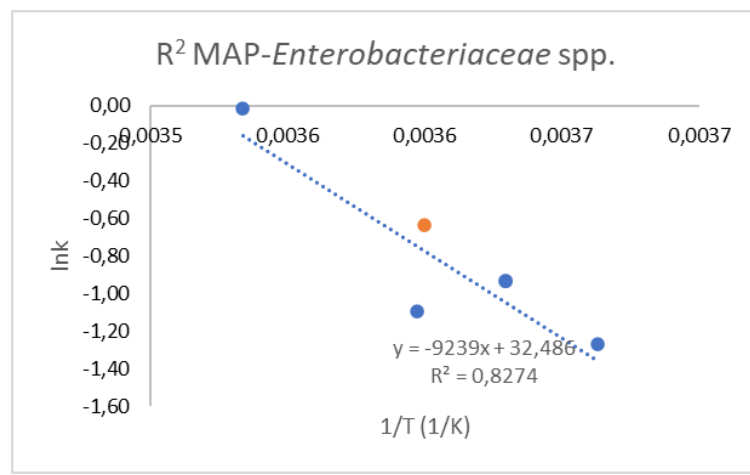
Διάγραμμα 4: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες AIR



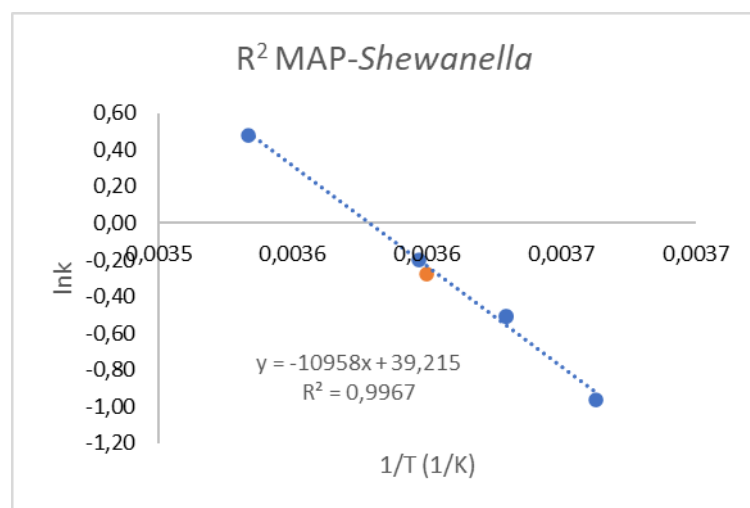
Διάγραμμα 5: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP



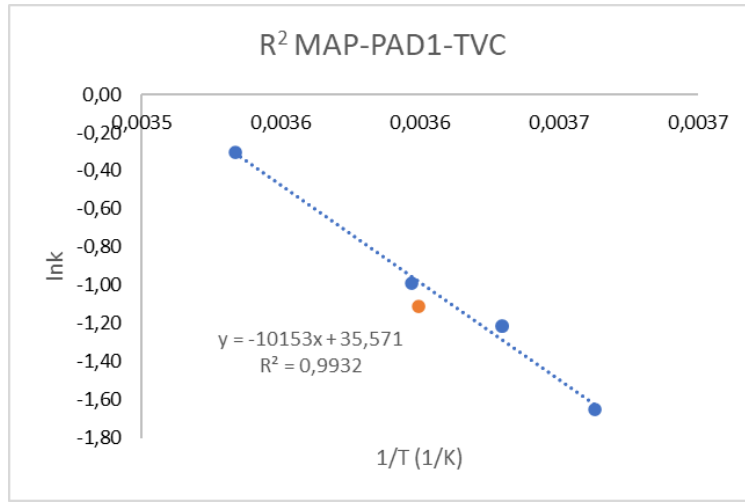
Διάγραμμα 6: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP



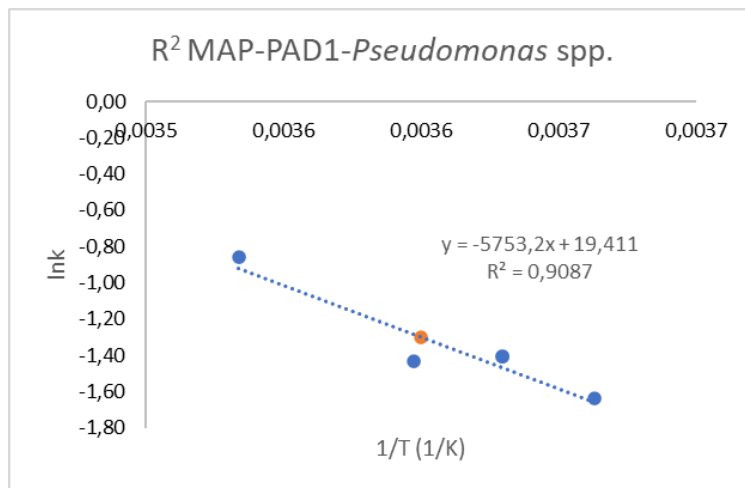
Διάγραμμα 7: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP



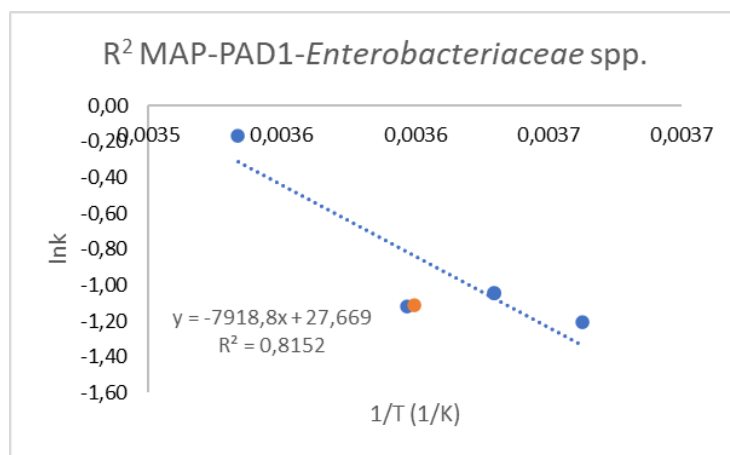
Διάγραμμα 8: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP



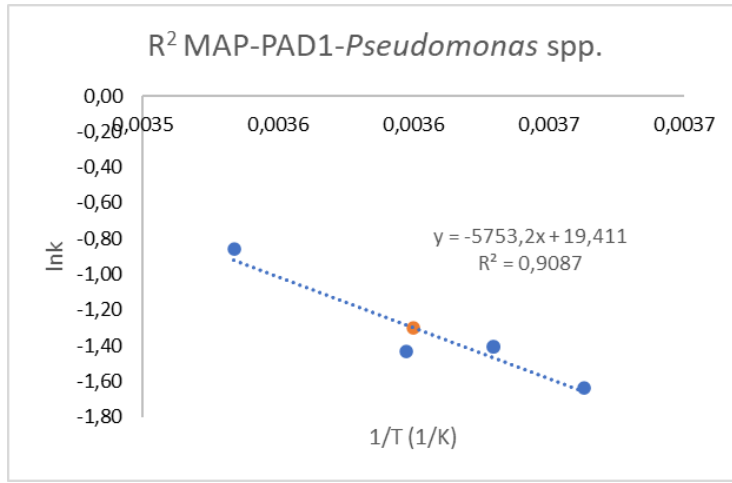
Διάγραμμα 9: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD1



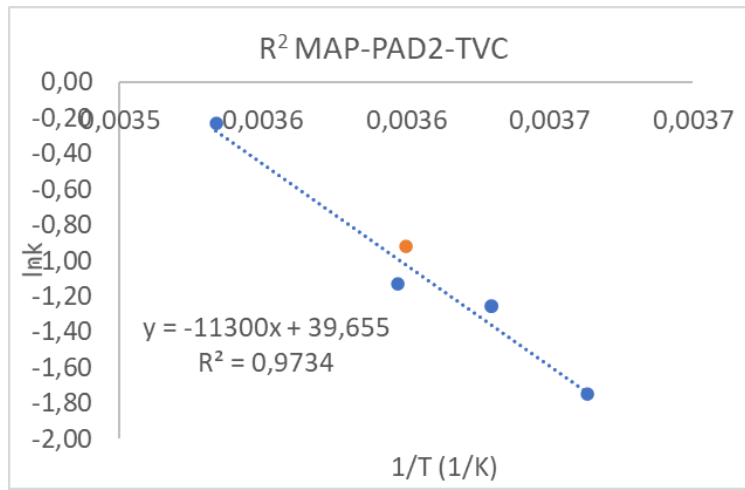
Διάγραμμα 10: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD1



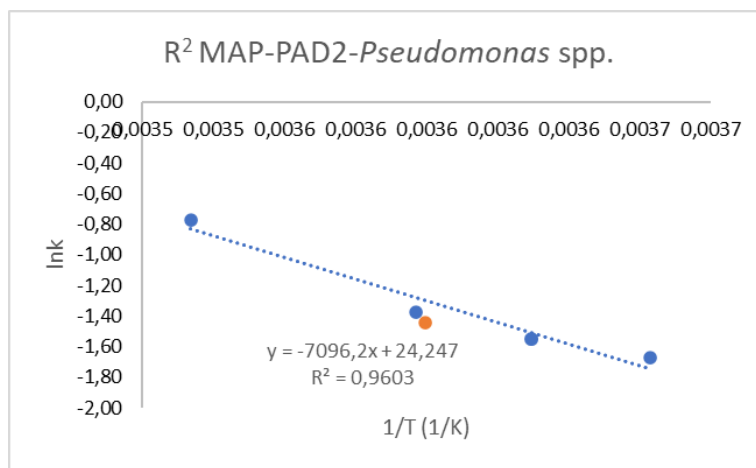
Διάγραμμα 11: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD1



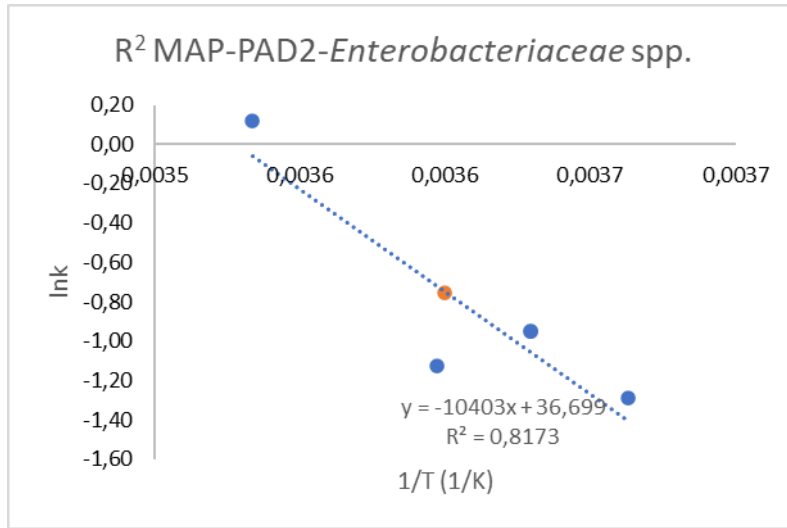
Διάγραμμα 12: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD1



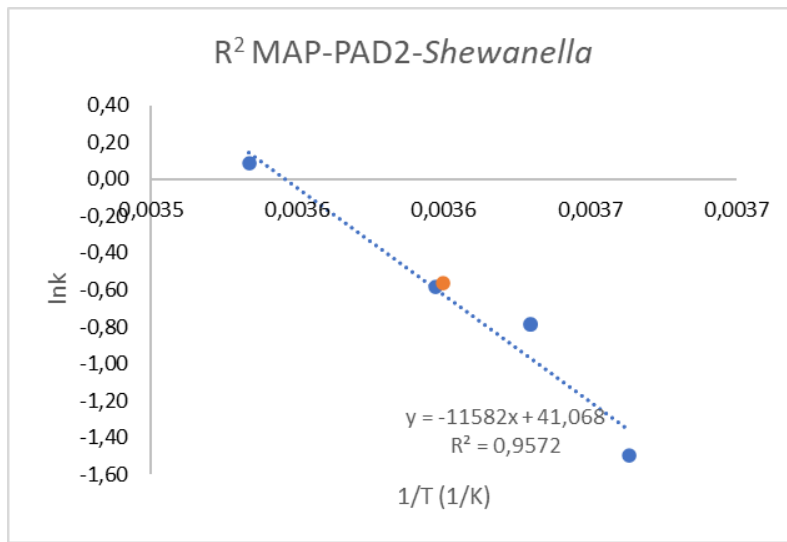
Διάγραμμα 13: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD2



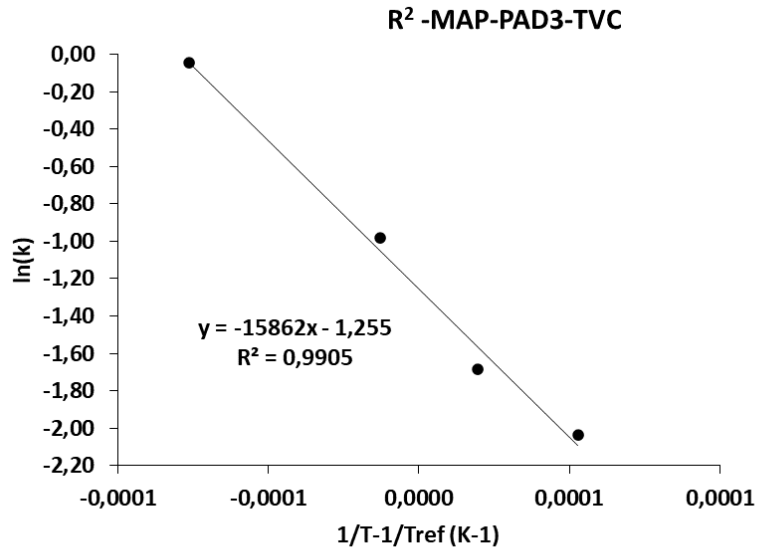
Διάγραμμα 14: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD2



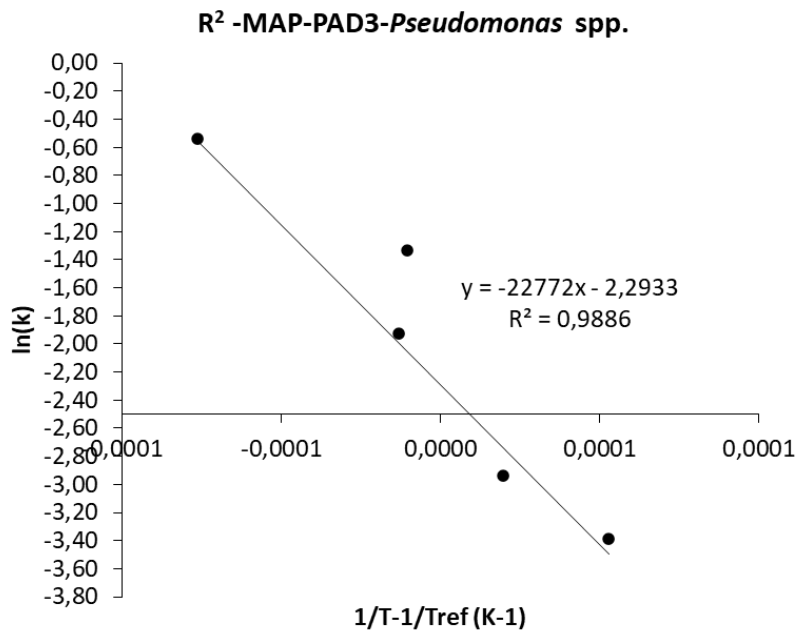
Διάγραμμα 15: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD2



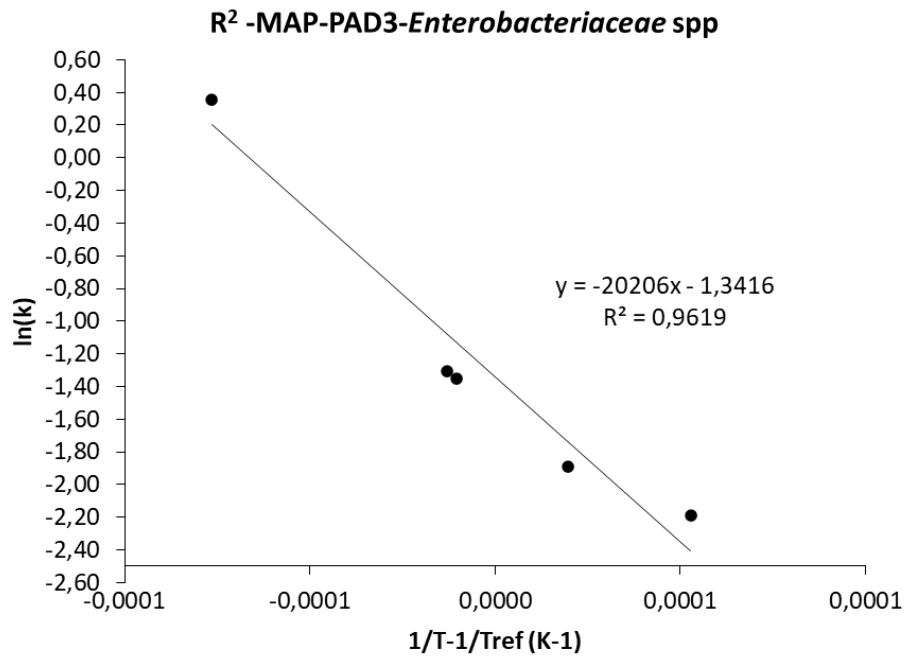
Διάγραμμα 16: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο για το ολόκληρο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD2



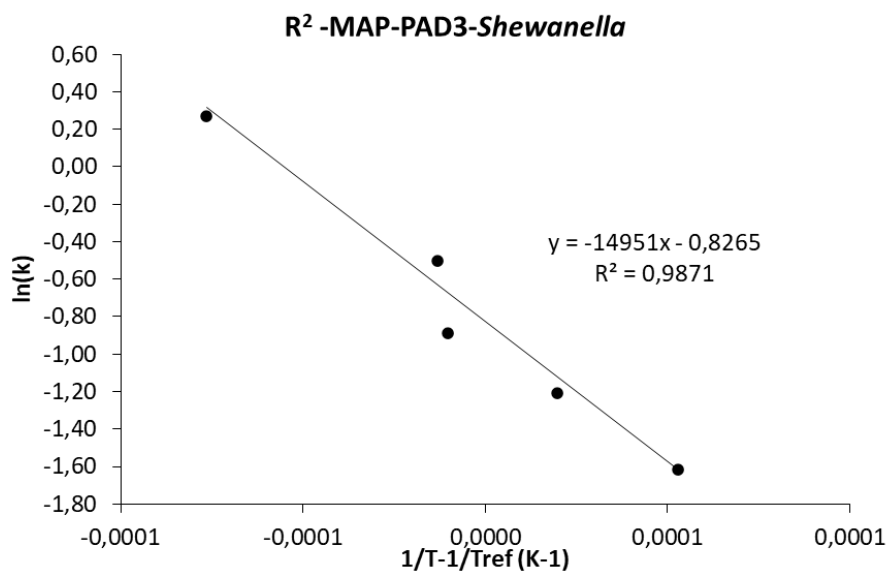
Διάγραμμα 17: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας για το φιλέτο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD3



Διάγραμμα 18: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων για το φιλέτο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD3



Διάγραμμα 19: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων για το φιλέτο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD3



Διάγραμμα 20: Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο για το φιλέτο λαβράκι σε συνθήκες MAP-PAD3