



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**«Μελέτη της επίδρασης μεμβρανών Πολυγαλακτικού Οξέος (PLA)
ενισχυμένων με αιθέρια έλαια δυόσμου και κόλιανδρου στον χρόνο ζωής
φρέσκων φιλέτων λαβρακιού»**



Σκεύας Ιωάννης, Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της επίδρασης μεμβρανών Πολυγαλακτικού Οξέος (PLA)
ενισχυμένων με αιθέρια έλαια δυόσμου και κόλιανδρου στον
χρόνο ζωής φρέσκων φιλέτων λαβρακιού»

Σκεύας Ιωάννης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μπαδέκα Αναστασία

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μπαδέκα Αναστασία, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων
(επιβλέπουσα), abadeka@uoi.gr.

Ιωάννα Κοσμά, Επικ. Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων,
i.kosma@uoi.gr.

Σκάλκος Δημήτριος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων,
dskalkos@uoi.gr.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Αναστασία Μπαδέκα για την ανάθεση του θέματος της παρούσας μελέτης και την καθοδήγησή για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη του παρόντος κειμένου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Αλεξία Γκουρογιάννη που μου προσέφερε την απαραίτητη καθοδήγηση και συμβουλές σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, τόσο κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επικ. Καθηγήτρια Ιωάννα Κοσμά για τις χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες της στο πειραματικό κομμάτι και στην επεξεργασία των δεδομένων.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης μεμβρανών Πολυγαλακτικού Οξέος (PLA) ενισχυμένων με αιθέρια έλαια δυόσμου και κόλιανδρου στον χρόνο ζωής φρέσκων φιλέτων λαβρακιού. Τα φιλέτα, χωρίστηκαν σε 4 ομάδες που συσκευάζονται με 4 διαφορετικούς τρόπους:

- α) σε σακούλα πολυαμιδίου - πολυαιθυλενίου (PA-PE) (δείγμα μάρτυρας /control),
- β) καλυμμένα με μεμβράνη πολυγαλακτικού οξέος (PLA) και στη συνέχεια σε σακούλα PA-PE,
- γ) καλυμμένα με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με 2% αιθέριο έλαιο κόλιανδρου (COL) και στη συνέχεια σε σακούλα PA-PE,
- δ) καλυμμένα με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με 2% αιθέριο έλαιο δυόσμου (SPR) και στη συνέχεια σε σακούλα PA-PE.

Τα δείγματα παρέμειναν υπό ψύξη (4°C) για 7 ημέρες.

Για τη μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών συσκευασιών στην ποιότητα των φιλέτων λαβρακιού και στον χρόνο ζωής τους, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις, και, επίσης, μελετήθηκε η μεταβολή των πτητικών τους συστατικών κατά τον χρόνο συντήρησης.

Συγκεκριμένα δείγματα λαβρακιών ελήφθησαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ημέρες 0, 3, 5, 6, 7 από την αρχική ημέρα συσκευασίας) για μικροβιολογικές [Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), *Pseudomonas*, υδροθειούχα βακτήρια, Γαλακτικά βακτήρια (LAB)], φυσικοχημικές αναλύσεις [Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVBN), Άζωτο της Τριμεθυλαμίνης (TMA), Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), pH] και για μελέτη πτητικών συστατικών.

Οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν Υδρόθειο (H_2S) αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στο τέλος του χρόνου ζωής του φιλέτου λαβρακιού, όταν δηλαδή η OMX ξεπεράσει τα 7 log₁₀cfu/g), χωρίς να ξεπεράσουν το επίπεδο των 5-6 logcfu/g, ενώ τα βακτήρια της οικογένειας LAB βρίσκονται σε πληθυσμούς πολύ χαμηλότερους. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα ξεπερνά το αποδεκτό όριο των 7 log cfu/g μετά από έξι (6) ημέρες αποθήκευσης στο δείγμα μάρτυρα (7,46 log cfu/g), στο δείγμα συσκευασμένο με μεμβράνη πολυγαλακτικού οξέος προσεγγίζει τα 7,27 log cfu/g την μέρα 6, ενώ τα δείγματα με το PLA και τα αιθέρια έλαια, ξεπερνούν τα 7 cfu/g την ημέρα 7 (7,54 log cfu/g - SPR και 7,38 log cfu/g - COL).

Σχετικά με τη χημική μεταβολή των δειγμάτων, το Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVBN), με αρχική τιμή τα 20,3 mg N/100 g ψαριού την ημέρα 0 της δειγματοληψίας, παρουσιάζει ραγδαία αύξηση, καταγράφοντας μη αποδεκτές τιμές 36,2 mg N/100 g ψαριού την 5η μέρα στο δείγμα μάρτυρα, 37,8 mg N/100g ψαριού την 6η μέρα στο δείγμα συσκευασμένο με μεμβράνη πολυγαλακτικού οξέος, ενώ στα δείγματα που συσκευάστηκαν με εμπλουτισμένες με αιθέρια έλαια μεμβράνες πολυγαλακτικού οξέος, το Ολικό Πτητικό Άζωτο ξεπέρασε το αποδεκτό όριο των 35 mg N/100 g ψαριού την ημέρα 7 (40,6 mg N/100 g ψαριού για το SPR και 37,8 mg N/100 g ψαριού για το COL) .

Παρόμοιο προφίλ αύξησης παρουσιάζει και η συγκέντρωση της Τριμεθυλαμίνης (TMA) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, φθάνοντας τα επίπεδα των 12,2 mg/100 g ψαριού την 6^η ημέρα στο δείγμα μάρτυρα, 12,2 mg/100g ψαριού στο δείγμα με PLA την ημέρα 7, ενώ στις μεμβράνες με τα αιθέρια έλαια, η TMA έφτασε τα 9,45 mg/100 g ψαριού την ημέρα 7. Το όριο αποδοχής για την τριμεθυλαμίνη είναι τα 12 mg N/100g ψαριού.

Στις μετρήσεις του TBA, τα επίπεδα θειοβαρβιτουρικού ήταν ήδη υψηλά σε σχέση με το προτεινόμενο όριο των 3 mg μηλονικής διαλδεΰδης/kg ψαριού από την ημέρα 0 του πειράματος με αρχική τιμή το 3,49 mg μηλονικής διαλδεΰδης/kg ψαριού. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε διαφορά στα επιμέρους δείγματα, με τις τιμές την 7^η ημέρα δειγματοληψίας να είναι 10,26, 10,13, 9,90 και 9,41 mg/100 g ψαριού για το δείγμα μάρτυρα, το δείγμα με PLA, το δείγμα με 2% SPR και το δείγμα με 2% COL αντίστοιχα.

Η αρχική τιμή του pH ήταν 6,34, με την τιμή να φτάνει την 7η μέρα συντήρησης ακόμα και 6,68 στο συσκευασμένο δείγμα με μεμβράνη πολυγαλακτικού οξέος και χαμηλότερα στα υπόλοιπα. Συγκεκριμένα, το pH έφτασε στην τιμή 6,65 και 6,68 στο δείγμα μάρτυρα και στο δείγμα συσκευασμένο σε μεμβράνη πολυγαλακτικού οξέος αντίστοιχα και 6,56-6,57 στο δείγμα με 2% SPR και στο δείγμα με 2% COL αντίστοιχα.

Τέλος, ο προσδιορισμός και η ανάλυση των πτητικών συστατικών των δειγμάτων λαβρακιού κατά τη συντήρησή τους, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας - Φασματοσκοπίας Μαζών σε συνδυασμό με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction) (SPME/GC-MS). Σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα από τις ενώσεις που εντοπίστηκαν, παρατηρήθηκαν έντονες διακυμάνσεις στο πτητικό προφίλ των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων δειγμάτων. Αρκετές από τις ενώσεις μπορεί να προέρχονται τόσο από τα αιθέρια έλαια SPR και COL που χρησιμοποιήθηκαν στις μεμβράνες όσο και από το ίδιο το δείγμα ψαριού (από τη διατροφή του). Η συσκευασία PLA εμπλουτισμένη με αιθέρια έλαια, ιδιαίτερα με COL, φαίνεται να επιβραδύνει αποτελεσματικά την παραγωγή πτητικών ενώσεων που σχετίζονται με την αλλοίωση.

Λέξεις κλειδιά: Μεμβράνες PLA, αιθέρια έλαια, κόλιανδρος, δυόσμος, φιλέτα λαβρακιού, μικροβιολογικές αναλύσεις, πτητικά, TVBN, TMA, TBA, pH.

ABSTRACT

The aim of this postgraduate thesis was to study the effect of Polylactic Acid (PLA) membranes enhanced with peppermint and coriander essential oils on the shelf life of fresh sea bass fillets. The fillets were divided into 4 groups packaged in 4 different ways:

- a) in a polyamide - polyethylene (PA-PE) bag (control sample),
- b) covered with a polylactic acid (PLA) membrane and then in a PA-PE bag,
- c) covered with a PLA membrane enriched with 2% coriander essential oil (COL) and then in a PA-PE bag,
- d) covered with a PLA membrane enriched with 2% spearmint essential oil (SPR) and then in a PA-PE bag.

The samples remained refrigerated (4°C) for 7 days.

To study the effect of different packaging on the quality of sea bass fillets and their shelf life, microbiological and physicochemical analyses were performed, and the change in their volatile components during storage was also studied.

Specifically, sea bass samples were taken at regular intervals (days 0, 3, 5, 6, 7 from the initial day of packaging) for microbiological [Total Viable Count (TVC), *Pseudomonas*, hydrogen sulfide producing bacteria, Lactic acid bacteria (LAB)], physicochemical analyses [Total Basic Volatile Nitrogen (TVBN), Trimethylamine (TMA), Thiobarbituric acid (TBA), pH] and for the study of volatile components.

Pseudomonas spp. microorganisms and hydrogen sulfide (H₂S) producing bacteria are the dominant microorganisms at the end of the shelf life of sea bass fillet, i.e. when the TVC exceeds 7 log₁₀cfu/g, the *pseudomonas* spp. did not exceed the level of 5-6 log cfu/g, while bacteria of the LAB family are found in lower populations.

TVC exceeds the acceptable limit of 7 log cfu/g after six (6) days of storage in the control sample (7.46 log cfu/g), in the sample packaged with polylactic acid membrane it approaches 7.27 log cfu/g on day 6, while the samples with PLA and essential oils exceed 7 log cfu/g on day 7 (7.54 log cfu/g - SPR and 7.38 log cfu/g - COL).

Regarding the chemical changes of the samples, Total Volatile Nitrogen (TVBN), with an initial value of 20.3 mg N/100 g fish on day 0 of sampling, shows a rapid increase, recording unacceptable values of 36.2 mg N/100 g fish on day 5 in the control sample, 37.8 mg N/100g fish on day 6 in the sample packaged with polylactic acid membrane, while in the samples packaged with polylactic acid membranes enriched with essential oils, Total Volatile Nitrogen exceeded the acceptable limit of 35 mg N/100 g fish on day 7 (40.6 mg N/100 g fish for SPR and 37.8 mg N/100 g fish for COL).

A similar profile increase is also shown by the concentration of Trimethylamine (TMA) throughout the preservation period, reaching levels of 12.2 mg/100 g fish on day 6 in the control sample, 12.2 mg/100g fish in the PLA sample on day 7, while in the membranes with essential oils, TMA reached 9.45 mg/100 g fish on day 7. The acceptance limit for trimethylamine is 12 mg N/100g fish. Thiobarbiturate (TBA) levels were already high in relation to the proposed limit of 3 mg malondialdehyde/kg fish from day 0 of the experiment with an initial value of 3.49 mg malondialdehyde/kg fish. However, a difference was observed

in the individual samples, with the values on the 7th day of sampling being 10.26, 10.13, 9.90 and 9.41 mg/100 g of fish for the control sample, the sample with PLA, the sample with 2% SPR and the sample with 2% COL respectively.

The initial pH value was 6.34, with the value reaching 6.68 on the 7th day of preservation in the sample packaged in polylactic acid membrane and lower in the rest. Specifically, the pH reached 6.65 and 6.68 in the control sample and the sample packaged in polylactic acid membrane respectively, and 6.56-6.57 in the sample with 2% SPR and the sample with 2% COL respectively.

Finally, the determination and analysis of the volatile components of the sea bass samples during their preservation was carried out using the Gas Chromatography - Mass Spectrometry technique in combination with the Solid Phase Microextraction technique (SPME/GC-MS). According to the results obtained from the compounds identified, strong fluctuations were observed in the volatile profile of the four different groups of samples. Several of the compounds may originate from both the spearmint and coriander essential oils used in the PLA membranes and from the fish sample itself (from its diet). PLA packaging enriched with essential oils, especially coriander, appears to effectively slow down the production of volatile compounds associated with spoilage.

Keywords: PLA membranes, essential oils, coriander, mint, sea bass fillets, microbiological analyses, volatiles, TVBN, TMA, TBA, pH.

	ΣΕΛΙΔΑ
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Διατροφική αξία ψαριών	11
1.2 Μηχανισμοί αλλοίωσης ιχθύων	15
1.2.1 Μικροβιακή αλλοίωση των ιχθύων	15
1.2.2 Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (SSOs)	17
1.2.3 Απαιτήσεις για την ανάπτυξη των βακτηρίων	19
1.2.4 Μικροβιολογικά κριτήρια	22
1.2.5 Αυτόλυση	24
1.2.6 Χημική Οξείδωση	25
1.3 Μέθοδοι εκτίμησης ποιότητας ιχθύων	25
1.3.1 Δείκτες αλλοίωσης ψαριών	27
1.3.1.1 Ολικό βασικό πτητικό άζωτο (TVBN)	29
1.3.1.2 Τριμεθυλαμίνη (TMA)	30
1.3.1.3 Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA)	31
1.4 Συντήρηση ψαριών υπό ψύξη	32
1.5 Στοιχεία των μελετούμενων μικροοργανισμών	33
1.5.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)	33
1.5.2 Ψυχρόφιλοι Μικροοργανισμοί	34
1.5.3 <i>Pseudomonas</i> spp.	35
1.5.4 Υδροθειούχα βακτήρια ή βακτήρια που παράγουν H ₂ S	35
1.5.5 Γαλακτικά βακτήρια (LAB)	36
1.6 Θεωρία των εμποδίων	37
1.6.1 Συσκευασία Πολυαιθυλενίου-πολυαμιδίου (PA-PE)	38
1.6.2 Μεμβράνη πολυγαλακτικού (PLA)	38
1.6.3 Αιθέρια έλαια	40
1.6.3.1. Αιθέριο έλαιο κόλιανδρου	42

1.6.3.2. Αιθέριο έλαιο δυόσμου	44
1.7. Πτητικές ενώσεις - δείκτες φρεσκότητας/αλλοίωσης	45
ΣΚΟΠΟΣ	50
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
2.1. Παρασκευή μεμβρανών	51
2.2. Προετοιμασία Δειγμάτων Λαβρακιού	51
2.3. Συσκευασία δειγμάτων	51
2.4. Μικροβιολογική ανάλυση	53
2.4.1 Θρεπτικά υλικά	53
2.4.2. Δειγματοληψία	54
2.5. Φυσικοχημικές Αναλύσεις	56
2.5.1 Μέτρηση pH	56
2.5.2 Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Αζώτου (TVBN)	56
2.5.3 Προσδιορισμός Τριμεθυλαμίνης (TMA)	57
2.5.4. Προσδιορισμός Θειοβαρβιτουρικού Οξέος (TBA)	58
2.6 Προσδιορισμός Πτητικών Συστατικών	59
2.7 Στατιστική ανάλυση	60
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
3.1. Μικροβιολογικές Αναλύσεις	62
3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)	62
3.1.2. <i>Pseudomonas Spp</i>	64
3.1.3. Υδροθειούχα Βακτήρια (H ₂ S producing bacteria)	67
3.1.4. Οξυγαλακτικά Βακτήρια (L.A.B)	69

3.2 Φυσικοχημικές Αναλύσεις	73
3.2.1. Τριμεθυλαμίνη (TMA)	73
3.2.2. Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVBN)	76
3.2.3. Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBA)	79
3.2.4 Μέτρηση pH	81
3.3 Προσδιορισμός Πτητικών Ενώσεων	84
4. Συμπεράσματα	99
5. Μελλοντικές Προτάσεις	100
6. Βιβλιογραφία	102

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα ζήτημα μεγίστης σημασίας για τη βιομηχανία των τροφίμων είναι η συντήρηση, αποθήκευση και προώθηση ασφαλών και υψηλής ποιότητας προϊόντων. Για το σκοπό αυτό, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός και η επιλογή υλικών συσκευασίας με τις κατάλληλες προδιαγραφές και ιδιότητες. Μέχρι πρόσφατα, επικρατούσαν τα παραδοσιακά υλικά συσκευασίας (χαρτί, γυαλί, πλαστικό, κ.ά). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας, νέα υλικά συσκευασίας έχουν έρθει στο προσκήνιο με υψηλότερη απόδοση και χαρακτηριστικά με σαφώς θετικότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Οι νέες αυτές τεχνολογίες, μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης τροφίμων, οδήγησαν σε έναν νέο τύπο συσκευασίας, που δεν προστατεύει μόνο παθητικά τα συσκευασμένα τρόφιμα, αλλά παίζει επίσης ενεργό ρόλο, παρέχοντας τρόφιμα υψηλής ποιότητας και μεγαλύτερης διάρκειας ζωής, συγκριτικά με την κλασική συσκευασία.

Η παραγωγή και η κατανάλωση πλαστικών προϊόντων για εφαρμογές συσκευασίας έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Η αύξηση αυτή συνδυαστικά με την περιβαλλοντική ευαισθητοποίηση, προκαλεί μεγαλύτερη ανησυχία στους ανθρώπους σχετικά με τη χρήση πλαστικών που προέρχονται από πετρέλαιο. Τα περισσότερα πλαστικά υλικά κατασκευάζονται από υδρογονάνθρακες με βάση το πετρέλαιο, που είναι ένας μη ανανεώσιμος πόρος.

Η ανάγκη για προστασία του περιβάλλοντος, ελαχιστοποιώντας τα μη βιοαποικοδομήσιμα απόβλητα έχει δημιουργήσει μεγάλη ζήτηση για τον σχεδιασμό φιλικών προς το περιβάλλον συσκευασιών που παράγονται από διάφορους ανανεώσιμους πόρους, ιδίως βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών, με στόχο την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων. Αυτά τα υλικά, είτε εξάγονται απευθείας από τη βιομάζα (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια), είτε συντίθενται από βιοπροερχόμενα μονομερή (πολυγαλακτικό οξύ), είτε παράγονται απ' ευθείας από τους οργανισμούς (βακτηριακή κυτταρίνη). Χαρακτηριστικό αυτών των υλικών είναι η ικανότητά τους να βιοαποικοδομούνται με αποτέλεσμα να κερδίζουν έδαφος έναντι των πλαστικών.

Οι βιοαποικοδομήσιμες συσκευασίες τροφίμων μπορεί να αντικαταστήσουν στο μέλλον την πλαστική συσκευασία, παρέχοντας στη βιομηχανία τροφίμων πιο βιώσιμες αλλά και πιο υγιεινές εναλλακτικές λύσεις συσκευασίας.

Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων έχει εγκρίνει το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) ως ασφαλή ουσία για να χρησιμοποιηθεί ως υλικό συσκευασίας που έρχεται σε επαφή με τρόφιμα.

Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές που προέρχεται από τα μονομερή γαλακτικού οξέος ανανεώσιμων πηγών, όπως άμυλο καλαμποκιού, ρίζες ταπιόκας, τσιπς, άμυλο, ζαχαροκάλαμο, όξινος ορός γάλακτος. Έχει καλή μηχανική αντοχή και θερμική πλαστικότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές εφαρμογές. Έχει διακριθεί ως μια ενδιαφέρουσα επιλογή για ενεργή συσκευασία τροφίμων λόγω της βιοδιασπασιμότητας του και των αποδεκτών φυσικών και μηχανικών ιδιοτήτων του. Είναι ένας θερμοπλαστικός πολυεστέρας γραμμικής αλυσίδας που έχει τη δυνατότητα να αντικαταστήσει συμβατικά πολυμερή όπως πολυαμίδιο, πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο και τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο.

Για την επιπλέον ενίσχυση των μεμβρανών κρίνεται απαραίτητη η χρήση πρόσθετων, όπως αρωματικών, αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών παραγόντων, βιταμινών, προβιοτικών και μεταλλικών στοιχείων. Με αυτό τον τρόπο, η συσκευασία θα έχει θρεπτική αξία από μόνη της.

Τα αιθέρια έλαια (EOs) είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που λαμβάνονται από φυτά. Υπάρχουν πολλές πολύτιμες ενώσεις που αποτελούν μέρος της σύνθεσής τους, τα τερπενοειδή και τα φαινυλοπροπανοειδή είναι τα κύρια (π.χ καρβακρόλη, θυμόλη) αλλά τα λιπαρά οξέα, τα οξείδια και τα παράγωγα θείου αποτελούν επίσης μέρος της σύνθεσής τους. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των ΕΟ που προέρχονται από πολλά φυτά έχουν αναγνωριστεί και αρχίζει να εφαρμόζεται τελευταία μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για την παράταση της διάρκειας ζωής των ιχθυηρών και των προϊόντων τους. Η εφαρμογή των ΕΟ επιτρέπει την αναστολή της ανάπτυξης αρκετών παθογόνων βακτηρίων και μικροοργανισμών αλλοίωσης που οι συνθετικές ενώσεις μερικές φορές δεν μπορούν να εξαλείψουν. Επιπλέον, προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες με λιγότερες παρενέργειες και λειτουργικές ιδιότητες. Τα αποτελέσματα πολύ αυστηρών ποιοτικών ελέγχων τα έχουν αναγνωρίσει ως Γενικά Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή (GRAS), επιτρέποντας τη χρήση τους σε τρόφιμα ως ασφαλή πρόσθετα. Ωστόσο, μερικές φορές είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα με τα πρόσθετα του εμπορίου, τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες στο προϊόν ή ακόμη και προβλήματα τοξικότητας. Αυτό καθιστά απαραίτητο να εξεταστεί η χρήση τους σε

συνδυασμό με άλλα συντηρητικά, αναζητώντας ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα που επιτρέπει την επίτευξη καλύτερης δραστηριότητας σε χαμηλότερη συγκέντρωση αλλά επαρκή για την αποφυγή εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετάται η συνεργιστική δράση του πολυγαλακτικού οξέος και των αιθεριων ελαίων SPR και COL για την παράταση της διάρκειας ζωής των φιλέτων λαβρακιού.

1.1 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΨΑΡΙΩΝ

Τα ψάρια αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου εδώ και χιλιάδες χρόνια, όχι μόνο για τα γαστρονομικά τους χαρακτηριστικά αλλά και για τη μεγάλη θρεπτική τους αξία. Όπως και το κρέας, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, που χαρακτηρίζονται από εύκολη πέψη, καλύτερη διαθεσιμότητα και σύσταση αμινοξέων, ειδικά σε ό,τι αφορά τα απαραίτητα αμινοξέα. Επίσης, περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα και είναι πλούσια σε βιταμίνες (A, D, E, συμπλέγματος-B) και ιχνοστοιχεία (Ca, P, Zn, Se κλπ.) (https://www.mednutrition.gr/portal/lifestyle/diatrofi/18125-mikrapsaria?utm_source=chatgpt.com.)

Η χημική σύσταση των ψαριών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος, τη διατροφή, την ηλικία, το φύλο, τη μετανάστευση, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την εποχή του έτους. Τα κύρια συστατικά της σάρκας των θαλάσσιων τελεόστεων ψαριών είναι οι πρωτεΐνες σε ποσοστό 9-25 % (κατά μ.ό. 18,5%), τα λιπαρά σε ποσοστό 0,1-25% και το νερό (Pearson, 1976; Olley et al., 1988; Nettleton and Exler, 1992; Mengoli et al., 1994; Haard et al., 1995). Τα λιπαρά της σάρκας των ψαριών περιέχουν σχετικά μικρό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων (συνήθως 20-35%) (Ackman, 1995), ενώ έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ακόρεστα και κυρίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), ιδιαίτερα της σειράς ω-3 με σημαντικότερους εκπροσώπους το εικοσιπενταενικό (EPA: 20:5) και το εικοσιδυοεξαενικό οξύ (DHA: 22:6) αλλά και της σειράς ω-6, όπως είναι π.χ. το λινολεϊκό οξύ (18: 2n-6). Τα ψάρια (κυρίως τα θαλάσσια) και τα οστρακοειδή αποτελούν τη μοναδική φυσική πηγή από την οποία μπορεί να προμηθευτεί ο ανθρώπινος οργανισμός τα EPA και DHA. Τα φωσφολιπίδια των θαλάσσιων ψαριών περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες EPA και DHA (Ackman and Gunnlaugsdottir, 1992).

Τα PUFA της ομάδας ω-3 βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στο λιπαρό μέρος των ψαριών από εκείνα της ω-6 (Kinsella, 1986; Ågren and Hänninen, 1993) και η αναλογία αυτή θεωρείται ευνοϊκή γιατί συμβάλλει:

α) στην πρόληψη ή και μείωση του κινδύνου αρτηριοσκλήρωσης και εμφραγμάτων του μυοκαρδίου (Kinsella, 1986; Nettleton and Exler, 1992; Holub et al., 1992; Ackman, 1995), του κινδύνου θανάτου από καρδιακές αρρυθμίες και του κινδύνου απόφραξης των εγκεφαλικών αιμοφόρων αγγείων που είναι η αιτία των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς τα εγκεφαλικά επεισόδια αποτελούν την τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου και ένα από τους κυριότερους λόγους μόνιμης σοβαρής αναπηρίας,

β) στην πρόληψη αλλά και στη μείωση των συμπτωμάτων της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Armstrong et al., 1994) και άλλων φλεγμονωδών νόσων, όπως η ψωρίαση του δέρματος, κ.λπ. (Holub et al., 1992),

γ) στη μείωση του κινδύνου διάφορων μορφών καρκίνου (Kinsella et al., 1986; Love, 1992; Armstrong et al., 1994), π.χ. καρκίνου του προστάτη στους άνδρες,

δ) στη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας του ματιού, ασθένεια που αποτελεί την κυριότερη αιτία απώλειας όρασης σε ηλικιωμένα άτομα, καθώς και του κινδύνου εκφυλισμού των πνευματικών ικανοτήτων, γεροντικής άνοιας και της ασθένειας Αλτσχάιμερ, και

ε) στην πρόληψη των πρόωρων τοκετών και στη μείωση της πιθανότητας αποβολής.

Ακόμη, τα PUFA της σειράς ω-3 (κυρίως το DHA) αποτελούν ουσιώδη θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη του ανθρώπινου νευρικού ιστού στο στάδιο της εγκυμοσύνης (ειδικότερα στο τρίτο τρίμηνο, όταν αναπτύσσεται ο εγκέφαλος και το νευρικό σύστημα) και στη βρεφική ηλικία. Το DHA θεωρείται απαραίτητο και για την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς χιτώνα των βρεφών (Nettleton and Exler, 1992).

Τα αλιεύματα, παρά τη μεγάλη σημασία τους για τη διατροφή του ανθρώπου και τα οφέλη που προσφέρουν στην υγεία του, μπορούν να αποτελέσουν και πηγή παθογόνων μικροοργανισμών. Γενικά, αν και η πλειονότητα των περιπτώσεων δηλητηριάσεων από αλιεύματα προκαλούνται από τοξίνες (βιοτοξίνες και ισταμίνη) και ιούς (norovirus και ιός της ηπατίτιδας Α), τα ψάρια και τα οστρακοειδή μπορεί να είναι φορείς παθογόνων βακτηρίων, που είτε βρίσκονται φυσιολογικά στο περιβάλλον, είτε προέρχονται από

μολυσμένα ύδατα ή/και από επιμόλυνση μετά τη σύλληψή τους (**Herrera et al., 2006, Ιωάννου, 2012**).

1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΙΧΘΥΩΝ

Η αλλοίωση των ψαριών είναι αποτέλεσμα τριών βασικών μηχανισμών και πιο συγκεκριμένα της χημικής οξείδωσης, της αυτόλυσης και της μικροβιακής δραστηριότητας (**Σακελλαρίου, 2017**).

1.2.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

Τα αλιεύματα, και κυρίως τα ψάρια, είναι πολύ ευαλλοίωτα τρόφιμα. Σε σχέση με το κρέας αλλοιώνονται πιο εύκολα, έχοντας διαφορετικό pH και χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης. Το κρέας έχει ελαφρώς όξινο pH (περίπου 5,5) ενώ τα ψάρια υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν pH 6,8 (**Mossel et al., 1995**). Όταν η αλλοίωση εξελίσσεται, η πλειοψηφία των καταναλωτών θα συμφωνήσουν ότι ο έντονος αποχρωματισμός, η δυσοσμία και η ανάπτυξη βλέννας υποδεικνύουν αλλοίωση του τροφίμου (**Nychas et al., 2007**).

Στα βράγχια, στον πεπτικό σωλήνα και στο δέρμα των ψαριών υπάρχουν διάφορα είδη μικροοργανισμών με πληθυσμούς που ποικίλουν ανάλογα με τον εντοπισμό. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον **Yagoub et al. (2009)** στα βράγχια ψαριών του είδους *Tilapia nilotica* το ολικό βακτηριακό φορτίο κυμαίνεται μεταξύ $3,00 \times 10^6$ - $7,00 \times 10^9$ cfu/mL, στον εντερικό σωλήνα από $1,50 \times 10^5$ έως $1,60 \times 10^8$ cfu/mL και στο δέρμα από $3,00 \times 10^7$ έως $4,00 \times 10^9$ cfu/mL.

Αντίθετα, στη σάρκα των υγιών ζωντανών ψαριών τα βακτήρια είναι απόντα, μη ανιχνεύσιμα ή σε εξαιρετικά χαμηλούς πληθυσμούς (**Nychas et al., 2007**). Οι πληθυσμοί της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) στη σάρκα της νωπής τσιπούρας ιχθυοτροφείου βρέθηκαν να είναι $3,22 \pm 0,442$ (log cfu/g), ενώ αυτοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων $2,76 \pm 0,49$ (log cfu/g) (**Βασιλειάδου, 2006**). Μετά τη θανάτωσή τους, η σάρκα μπορεί να υποστεί ταχεία μικροβιακή αλλοίωση, η οποία οφείλεται στην καταστροφή των έμφυτων προστατευτικών φραγμών (δέρμα, λέπια) και των φυσικών αντιμικροβιακών μηχανισμών άμυνας και εξαρτάται από ορισμένες εξωτερικές παραμέτρους (θερμοκρασία, συσκευασία, μέθοδος επεξεργασίας, κ.ά.).

Το δέρμα και η σάρκα μπορεί να επιμολυνθούν από Gram-θετικά (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) και Gram-αρνητικά βακτήρια (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Morganella*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*) (**Nychas et al., 2007**). Από τα ψυχρότροφα βακτήρια, τα συνηθέστερα είναι τα: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Schewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Photobacterium* και *Aeromonas* (**Liston, 1980**).

Δύο είναι οι κύριες ομάδες βακτηρίων που επιμολύνουν τα ψάρια. Στη μία ανήκουν βακτήρια που βρίσκονται φυσιολογικά στο νερό (αυτόχθονη μικροχλωρίδα), ενώ στην άλλη ανήκουν βακτήρια που εισέρχονται στο περιβάλλον μέσω των αστικών και των βιομηχανικών λυμάτων. Τα αυτόχθονα βακτήρια που μπορεί να απειλήσουν τη δημόσια υγεία είναι τα: *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* και *Listeria monocytogenes* (**Αμπραχίμ, 2006**). Στην άλλη ομάδα περιλαμβάνονται μέλη της οικογένειας των Enterobacteriaceae (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*) ενώ λοιπά είδη που μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο και απομονώνονται περιστασιακά από τα ψάρια, είναι τα *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloides* και *Yersinia enterocolitica* (**Αμπραχίμ, 2006**).

Η μικροχλωρίδα των ψαριών, που είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί, επηρεάζεται κυρίως από τη θερμοκρασία του νερού και από τη μικροχλωρίδα που υπάρχει στον βυθό της περιοχής αλίευσης. Τα ψάρια που αλιεύονται με δίχτυα έχουν υψηλό μικροβιακό φορτίο, καθώς τα δίχτυα σύρονται στον βυθό όπου υπάρχει αυξημένος αριθμός μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, ο αριθμός και το είδος αυτών εξαρτώνται από το είδος των ψαριών, τον βιότοπο, την εποχή αλίευσης, τη θερμοκρασία του νερού, την ποσότητα και την προέλευση της τροφής, τη μέθοδο αλίευσης και την περιεκτικότητα του θαλασσινού νερού σε χλωριούχο νάτριο (**Αμπραχίμ, 2006**).

Κατά την αποθήκευση των ψαριών, τα συνήθη βακτήρια που προκαλούν μικροβιακή αλλοίωση αυξάνονται με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με τα παθογόνα βακτήρια, επομένως τα ψάρια αλλοιώνονται και οι καταναλωτές δεν θα τα καταναλώσουν προτού αναπτυχθούν τα παθογόνα σε επίπεδα που μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα στην υγεία τους. Ο κίνδυνος από αυτά τα παθογόνα βακτήρια μπορεί να ελεγχθεί με τη διατήρησή τους υπό ψύξη, μέσω της εφαρμογής επαρκούς θερμικής επεξεργασίας και της αποφυγής επιμόλυνσης (**Huss, 1995**).

Οι επιμολύνσεις των ψαριών προέρχονται από τις επιφάνειες του πλοίου, τους χειρισμούς των εργαλείων και των διαφόρων επιφανειών, τα κιβώτια στα οποία τοποθετούνται, τα τρίμματα του πάγου, το νερό που χρησιμοποιείται για το ράντισμα ή για την επεξεργασία τους, το αλάτι, το προσωπικό, τα υλικά συσκευασίας και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Αμπραχίμ, 2006, Ιωάννου, 2012)

1.2.2 ΕΙΔΙΚΟΙ ΑΛΛΟΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ (EAM)

Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα μιας σειράς αλλαγών στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου, λόγω της επικράτησης των μικροοργανισμών. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στους μεταβολίτες των μικροοργανισμών και γίνονται αντιληπτές με τις μεταβολές των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των αλιευτικών προϊόντων, όπως είναι η οσμή, το άρωμα και η γενική εμφάνιση (Parlapani et al., 2014).

Οι Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss, 1996, Gram & Dalgaard, 2002).

Οι EAM αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης των 7-9 log cfu/g οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους, έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard et al. 1993, Gram & Huss, 1996, Huis in't Veld, 1996). Το επίπεδο ανάπτυξης των EAM, μπορεί να χαρακτηριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη που αντιπροσωπεύει την αλλοίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημικός δείκτης αλλοίωσης (Chemical Spoilage Index, CSI) (Dalgaard et al., 1993).

Η επικράτηση των EAM δεν είναι καθορισμένη, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από μία σειρά παραγόντων κατά την παραγωγική αλυσίδα όπως επεξεργασία, μεταφορά και συντήρηση.

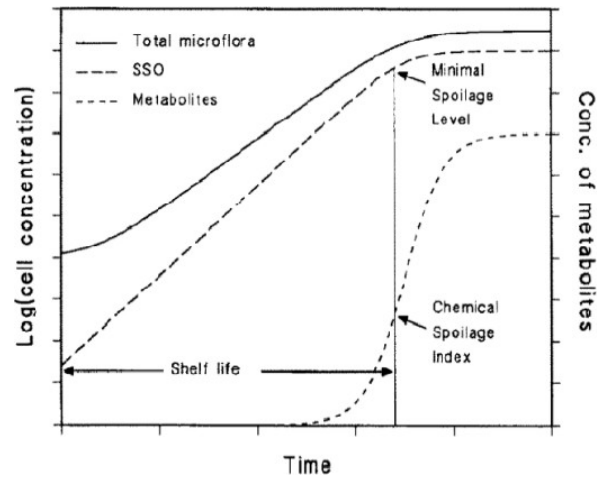
Οι μικροοργανισμοί που τελικά θα επικρατήσουν, είναι αυτοί οι οποίοι προσαρμόζονται καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου. Είναι γνωστό πλέον, ότι σε κάθε τρόφιμο, πέντε είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Πίνακας 1).

Η τροποποίηση ή ο έλεγχος ενός ή περισσότερων παραγόντων οδηγεί σε διαφορετική επιλογή και εξέλιξη των μικροοργανισμών, χαρακτηριστικό που μπορεί να έχει εφαρμογή στη δημιουργία προϊόντων με μεγάλη διάρκεια ζωής (Nychas et al. 2005, Σακελλαρίου, 2007, Αναγνωστόπουλος, 2015).

Πίνακας 1: Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη

Ενδογενείς	Δομή του κρέατος του λαβρακιού: a_w , pH, παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σύσταση θρεπτικών συστατικών
Παράγοντες κατά την επεξεργασία	Επηρεάζουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα του τροφίμου
Εξωγενείς	Θερμοκρασία, σχετική υγρασία
Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες	Ανταγωνισμός και συνεργισμός μεταξύ των βακτηρίων
Συνεργιστικοί παράγοντες	Αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων

Η συγκέντρωση των κυττάρων των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών (SSOs), όσον αφορά την απόρριψη του προϊόντος, μπορεί να οριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης και η συγκέντρωση του μεταβολίτη, που αντιπροσωπεύει την αλλοίωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντικειμενικός χημικός δείκτης μικροβιακής αλλοίωσης (Dalgaard et al., 1993, Βέρδος, 2014, Σακελλαρίου, 2017).



Εικόνα 1: Γενικό πρότυπο μικροβιακής αλλοίωσης. SSO: ειδικοί οργανισμοί αλλοίωσης MSL: ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, CSI: χημικός δείκτης αλλοίωσης (Dalgaard et al., 1993)

1.2.3 ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Για την ανάπτυξή τους οι μικροοργανισμοί χρειάζεται να λάβουν από το περιβάλλον τις ουσίες που απαιτούνται και που έχουν ανάγκη για να συνθέσουν τα κυτταρικά συστατικά τους και να παράγουν ενέργεια. Όλες αυτές οι ουσίες αποτελούν τα θρεπτικά συστατικά.

Σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα επιβάλλεται να περιέχονται όλα τα αναγκαία θρεπτικά στοιχεία σε ποσότητες ανάλογες με τις ειδικές ανάγκες του μικροοργανισμού για τον οποίο προορίζεται. Οι μικροοργανισμοί έχουν διαφορετικές θρεπτικές ανάγκες λόγω των μεγάλων διαφορών που απαιτούνται για τις ειδικές φυσιολογικές ιδιότητές τους.

Το 80-90% του ολικού κυτταρικού βάρους αποτελείται από νερό, καθιστώντας το απαραίτητο στοιχείο στη διατροφή τους. Εκτός από το υδρογόνο και το οξυγόνο (μεταβολικά παράγωγα του νερού), το στερεό κυτταρικό υλικό περιέχει άνθρακα, φώσφορο, άζωτο και θείο σε μικρότερες ποσότητες. Τα στοιχεία αυτά είναι το 95% του ξηρού βάρους του μικροοργανισμού. Το υπόλοιπο 5% αποτελείται από διάφορα άλλα στοιχεία, όπως κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρο, μαγγάνιο, κοβάλτιο, μόλυβδο, ψευδάργυρο, κ.λπ. Τα παραπάνω στοιχεία λειτουργούν ως θρεπτικά συστατικά με τη μορφή ανόργανων αλάτων. Το κάλιο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο και ο σίδηρος είναι απαραίτητα στα θρεπτικά υποστρώματα σε μεγαλύτερες δόσεις, γι' αυτό πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε αυτά με μορφή αλάτων. Αυτό εξηγείται διότι, τα ανόργανα στοιχεία, όταν παρέχονται ως άλατα (π.χ., θειικά, χλωριούχα, φωσφορικά), διαλύονται πιο εύκολα στο υδατικό περιβάλλον όπου αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί. Έτσι, γίνονται πιο προσβάσιμα για απορρόφηση. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσλάβουν αυτά τα στοιχεία κυρίως σε ιοντική μορφή. Τα άλατα διασπώνται σε ιόντα στο υδατικό διάλυμα, επιτρέποντας στα κύτταρα να τα εισάγουν μέσω των μεμβρανικών μεταφορέων. Αν αυτά τα στοιχεία παρέχονταν σε άλλη μορφή (π.χ., ως καθαρά μέταλλα), θα μπορούσαν να είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμα ή ακόμα και τοξικά. Η μορφή των αλάτων επιτρέπει τη σταδιακή απελευθέρωσή τους και την αποφυγή υπερφόρτωσης (Σαρρής et al., 2004, Ιωάννου, 2012).

Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν ιδιαίτερες απαιτήσεις σε στοιχεία, όπως π.χ. το πυρίτιο, που είναι απαραίτητο στα διάτομα και τα μικροσκοπικά φύκη, το νάτριο που είναι απαραίτητο για ορισμένα βακτήρια, για τα κυανοφύκη και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια ή το αλάτι, όπως για ορισμένα δονάκια.

Η δυνατότητα μιας χημικής ένωσης να παρέχει στον μικροοργανισμό ένα ή περισσότερα χημικά στοιχεία εξαρτάται κυρίως από τη δυνατότητα του μικροοργανισμού να προσλάβει και στη συνέχεια να μεταβολίσει την ένωση αυτή. Διάφορα μεγάλα πολυμερικά μόρια, όπως ορισμένες πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, αδυνατούν να χρησιμοποιηθούν εξαιτίας του μεγέθους τους, από τον μικροοργανισμό, δηλαδή δεν μπορούν να μπουν στο κύτταρό του, παρόλο που μέσα σε αυτό υπάρχουν τα ειδικά ένζυμα διάσπασής τους. Για τον λόγο αυτό οι μύκητες και ορισμένα βακτήρια εκκρίνουν εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τα πολυμερικά μεγαλομόρια σε μικρομόρια που εύκολα εισέρχονται μέσα στο κύτταρο (Σαπρής et al., 2004, Ιωάννου, 2012).

Στο εργαστήριο, τα θρεπτικά συστατικά ενσωματώνονται σε θρεπτικά υποστρώματα, πάνω ή μέσα στα οποία αναπτύσσονται τα βακτήρια. Αν ένα υπόστρωμα καλύπτει τις διατροφικές ανάγκες του βακτηριακού κυττάρου, το κύτταρο αυτό θα πολλαπλασιαστεί σε αριθμούς ικανούς να γίνουν αντιληπτοί με γυμνό οφθαλμό. Φυσικά, μετά τον ενοφθαλμισμό του, το υπόστρωμα πρέπει να τοποθετηθεί στις βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες (Forbes et al., 2002).

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών πρέπει να υπάρχουν οπωσδήποτε για τον διαχωρισμό, τη μελέτη, την έρευνα και την ταυτοποίησή τους. Διακρίνονται σε υγρά, στερεά και μικτά.

α) Τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα είναι διαλύματα θρεπτικών ουσιών σε νερό και η ανάπτυξη των βακτηρίων υποδεικνύεται με αύξηση της θολερότητας του υγρού.

β) Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα δημιουργούνται με την προσθήκη στο νερό με τα θρεπτικά συστατικά, μιας ουσίας (συνήθως της αгарόζης), που δίνει στερεή σύσταση.

γ) Τα μικτά θρεπτικά υποστρώματα αποτελούνται τόσο από υγρή όσο και από στερεή φάση (Σαπρής et al., 2004; Forbes et al., 2002).

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Το εύρος της θερμοκρασίας ανάπτυξης των μικροοργανισμών κυμαίνεται μεταξύ -5°C και $+70^{\circ}\text{C}$. Το ανώτατο όριο ανάπτυξης των μικροοργανισμών καθορίζεται από την ευαισθησία των κυτταρικών πρωτεϊνών τους στη θερμοκρασία, ενώ το κατώτατο όριο εξαρτάται από το σημείο καταψύξεως του νερού που περιέχει το κυτταρόπλασμα. Το σημείο αμέσως μετά την ανώτερη θερμοκρασία επιβίωσης ενός μικροοργανισμού ονομάζεται σημείο θερμικού

θανάτου. Πέρα από το κατώτερο σημείο αναπτύξεως ενός μικροοργανισμού δεν επέρχεται ο θάνατός του αλλά η αναστολή των λειτουργιών του, π.χ. πάρα πολλά μικροβιακά στελέχη στα εργαστήρια συντηρούνται σε βαθιά κατάψυξη (-75°C) για να χρησιμοποιηθούν σε δεδομένη στιγμή.

Για κάθε είδος μικροοργανισμού υπάρχει η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, η μέγιστη και ανάμεσα σε αυτές η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Ανάλογα με το σημείο άριστης θερμοκρασίας υπάρχουν τρεις κατηγορίες μικροβίων, τα θερμόφιλα, τα μεσόφιλα και τα ψυχρόφιλα (Πίνακας 2).

Οι σπόροι των σπορογόνων βακτηρίων μπορεί να επιζήσουν σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες από το σημείο θερμικού θανάτου των μικροβίων. Το σημείο θερμικού θανάτου των παθογόνων βακτηρίων είναι μεταξύ 50-70°C ενώ για τους σπόρους πολλές φορές το σημείο θερμικού θανάτου τους είναι γύρω στους 120°C (Σαρρής et al., 2004).

Πίνακας 2: Θερμοκρασίες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Κατηγορία	Θερμοκρασία σε °C		
	Ελάχιστη	Άριστη	Μέγιστη
Θερμόφιλα	40 – 45	45 - 60	60 - 70
Μεσόφιλα	10 – 15	30 - 40	40 - 45
Ψυχρόφιλα αναγκαστικά	-5 - +5	15 - 18	19 - 22
Ψυχρόφιλα προαιρετικά	-5 - +5	25 - 30	30 - 35

ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

Το οξυγόνο είναι από τα σημαντικότερα στοιχεία του κυττάρου και το μεγαλύτερο μέρος το προμηθεύεται από το νερό. Οι μικροοργανισμοί, ανάλογα με τις απαιτήσεις σε οξυγόνο, διακρίνονται σε:

- α) Υποχρεωτικά αερόβιοι, όταν αντλούν τις ενεργειακές τους ανάγκες από την αερόβια αναπνοή στην οποία το μοριακό οξυγόνο λειτουργεί ως τελικός οξειδωτικός παράγοντας, δηλαδή ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων είναι το O₂.
- β) Υποχρεωτικά αναερόβιοι, όταν αναπτύσσονται μόνο απουσία ελεύθερου οξυγόνου και αντλούν την ενέργειά τους από αντιδράσεις που δεν χρησιμοποιούν O₂.

γ) Προαιρετικά αναερόβιοι, όταν μπορούν να αναπτυχθούν τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες.

δ) Μικροαερόφιλοι, όταν αναπτύσσονται καλύτερα παρουσία οξυγόνου μειωμένης τάσης και συνήθως απαιτούν ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO₂ (Σαρρής et al., 2004).

pH

Το pH είναι ένας δείκτης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου στο περιβάλλον ενός μικροοργανισμού. Τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε σχεδόν ουδέτερο pH, μεταξύ 6,5 και 7,5. Τα υποστρώματα που ανευρίσκονται στο εμπόριο συνήθως έχουν ήδη ρυθμισμένο το pH μέσα σε αυτά τα όρια, οπότε σπάνια απαιτείται έλεγχός του (Σαρρής, et al., 2004; Forbes et al., 2002).

ΥΓΡΑΣΙΑ

Το νερό είναι ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά, τόσο στα υγρά όσο και στα στερεά υποστρώματα. Παρόλα αυτά, όταν επωάζονται στις θερμοκρασίες που είναι απαραίτητες για τον καλλιέργεια των μικροοργανισμών, ένα σημαντικό μέρος του νερού χάνεται με την εξάτμιση. Αυτή η απώλεια νερού μπορεί να είναι επιβλαβής για την ανάπτυξη των βακτηρίων με δύο τρόπους: α) λιγότερο νερό είναι διαθέσιμο για το μεταβολισμό τους και β) με αυτήν την απώλεια νερού υπάρχει μια σχετική αύξηση στην συγκέντρωση των διαλυμένων συστατικών (Forbes et al., 2002).

1.2.4 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Τα μικροβιολογικά κριτήρια χρησιμοποιούνται για να αξιολογήσουν τα εξής: α) την ασφάλεια του τροφίμου, β) την εφαρμογή κανόνων ορθής πρακτικής κατά την παραγωγή, γ) τον χρόνο συντήρησης ορισμένων τροφίμων που αλλοιώνονται εύκολα.

Όταν εφαρμόζονται σωστά, τα μικροβιολογικά κριτήρια αποτελούν ένα χρήσιμο μέσο για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών. Επίσης, παρέχουν κατευθυντήριες γραμμές στη βιομηχανία τροφίμων και στις αρμόδιες αρχές και αποτελούν βασικό στοιχείο οποιουδήποτε κρίσιμου σημείου ελέγχου που ενέχει μικροβιολογικό κίνδυνο στα συστήματα HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points). Ακόμη, η θέσπιση κριτηρίων που είναι

παγκόσμια αποδεκτά μπορούν να προάγουν την ελεύθερη διακίνηση μέσω της τυποποίησης των απαιτήσεων για την ασφάλεια/ποιότητα των προϊόντων (Ιωάννου, 2012).

Τα μικροβιολογικά κριτήρια πρέπει να καθορίζονται και να εφαρμόζονται μόνο όταν υπάρχει ανάγκη και όταν αποδεικνύεται ότι είναι αποτελεσματικά και πρακτικά στην εφαρμογή τους. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για τη θέσπισή τους, όπως είναι:

- επιδημιολογικά στοιχεία ή ανάλυση επικινδυνότητας που να αποδεικνύουν την ύπαρξη κάποιου κινδύνου για τη δημόσια υγεία
- η φύση της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του τροφίμου και η ικανότητα του τροφίμου να υποστηρίξει την μικροβιακή ανάπτυξη
- η επίδραση της επεξεργασίας του τροφίμου στη μικροχλωρίδα του
- το ενδεχόμενο μικροβιακής επιμόλυνσης ή/και ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, των χειρισμών, της αποθήκευσης και της διανομής
- η ομάδα των καταναλωτών που βρίσκονται σε κίνδυνο
- η κατάσταση στην οποία βρίσκεται το τρόφιμο κατά τη διανομή του
- το ενδεχόμενο της κατάχρησης στο επίπεδο του καταναλωτή
- το ενδεχόμενο αλλοίωσης, η χρησιμότητα και οι κανόνες ορθής πρακτικής
- ο τρόπος με τον οποίο το τρόφιμο προετοιμάζεται για την τελική κατανάλωση
- η αξιοπιστία των μεθόδων που είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση ή/και την απαρίθμηση των σχετικών μικροοργανισμών και των τοξινών
- τα μειονεκτήματα/πλεονεκτήματα με την εφαρμογή των κριτηρίων

(Ιωάννου, 2012)

Επιπλέον, τα μικροβιολογικά κριτήρια πρέπει να περιλαμβάνουν όρια για τους μικροοργανισμούς. Τα μικροβιολογικά όρια αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα πάνω από τα οποία απαιτείται να γίνει κάποια ενέργεια.

Ο χρόνος συντήρησης ενός τροφίμου που αλλοιώνεται εύκολα συχνά καθορίζεται από τον αρχικό αριθμό των μικροοργανισμών. Ως γενικός κανόνας, ένα τρόφιμο που περιέχει μεγάλο πληθυσμό από αλλοιογόνα μικρόβια θα έχει μικρότερο χρόνο συντήρησης από ένα τρόφιμο που περιέχει μικρότερο αριθμό των ίδιων μικροβίων. Παρόλα αυτά, η σχέση μεταξύ του πληθυσμού των μικροοργανισμών και του χρόνου συντήρησης δεν είναι απόλυτη. Κάποια είδη μικροοργανισμών ασκούν μεγαλύτερη επίδραση από κάποια άλλα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων εξαιτίας της παρουσίας διαφορετικών ενζύμων που δρουν

στα συστατικά τους. Η μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, εκτός από τους μικροοργανισμούς, εξαρτάται και από το ίδιο το τρόφιμο καθώς και από τις συνθήκες αποθήκευσης, όπως είναι η θερμοκρασία και τα αέρια της ατμόσφαιρας που το περιβάλλουν. Όλες αυτές οι παράμετροι πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν καθορίζονται τα όρια για τα μικροβιολογικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν την ποιότητα των προϊόντων και τον χρόνο συντήρησης (Ιωάννου, 2012). Η καθιέρωση και η εφαρμογή μικροβιολογικών κριτηρίων στα τρόφιμα θα συνεχίσει να εξελίσσεται, καθώς αναδύονται νέοι παθογόνοι μικροοργανισμοί και αναπτύσσονται νέες τεχνολογίες παρασκευής για την παραγωγή προϊόντων. Τα κριτήρια παρέχουν ένα μέσο για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας των μέτρων ελέγχου που χρησιμοποιούνται για την εξάλειψη, τη μείωση ή τον έλεγχο της παρουσίας, της επιβίωσης και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Pierson et al., 2007; Ιωάννου, 2012).

1.2.5 ΑΥΤΟΛΥΣΗ

Λίγο μετά την αλίευση των ιχθύων, οι χημικές και βιολογικές μεταβολές λαμβάνουν χώρα λόγω της διάσπασης των κυρίων μορίων των ιχθύων από ένζυμα (FAO, 2005). Η αρχική απώλεια της ποιότητας οφείλεται κυρίως στις αλλαγές που προκαλούνται εξαιτίας της αυτόλυσης, όπως η αποδόμηση των νουκλεοτιδίων (ενώσεις που σχετίζονται με το ATP) από αυτολυτικά ένζυμα. Μια από τις σημαντικότερες αυτολυτικές διεργασίες είναι η διάσπαση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) αλλά και άλλων ενώσεων λόγω της δράσης διαφόρων ενζύμων. Συγκεκριμένα, η παραγωγή υποξανθίνης από τον καταβολισμό του ATP επιδρά άμεσα στην οσμή των αλλοιωμένων ψαριών. Επίσης η φορμαλδεΰδη που παράγεται με την ενζυμική διάσπαση του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε διμεθυλαμίνη (DMA) και φορμαλδεΰδη (FA) επιδρά στην ποιότητα της δομής των ψαριών (Λουλούδα, 2021).

Τα πεπτικά ένζυμα προκαλούν εκτεταμένη αλλοίωση με αποτέλεσμα το μαλάκωμα της σάρκας (FAO, 1986). Στους μυς και στα σπλάχνα των ψαριών υπάρχει ένας αριθμός πρωτεολυτικών ενζύμων (καθεψίνες, κολλαγονάσες), μετά την αλίευσή τους, που συμβάλλουν στην αποδόμηση των μυών των ψαριών και στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, προάγοντας τη μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της επεξεργασίας (Huss, 1995). Σύμφωνα με τους Fraser & Sumar (1998) μπορούν να παραχθούν πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα λόγω της αυτόλυσης των πρωτεϊνών των μυών των ψαριών

που οδηγούν στην αλλοίωση της σάρκας τους, εξαιτίας της μικροβιακής ανάπτυξης και της παραγωγής βιογενών αμινών.

Οι **Hansen et al. (1996)** ανέφεραν ότι τα αυτολυτικά ένζυμα υποβάθμισαν την υφή των ιχθύων κατά τα αρχικά στάδια της αλλοίωσης αλλά δεν προκάλεσαν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στην οσμή και το άρωμα. Αυτό υποδεικνύει ότι η αυτόλυση περιορίζει δυνητικά τη διάρκεια ζωής και την ποιότητα του προϊόντος ακόμη και με σχετικά χαμηλά επίπεδα αλλοιωγόνων οργανισμών.

1.2.6 ΧΗΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια σημαντική αιτία υποβάθμισης και αλλοίωσης των πελαγικών ειδών ψαριών, με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες (**Fraser & Sumar, 1998**). Η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί να γίνει είτε ενζυμικά, είτε μη ενζυμικά.

Η ενζυμική υδρόλυση των λιπών από τη δράση λιπασών ονομάζεται λιπόλυση. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι λιπάσες διασπούν τα γλυκερίδια σχηματίζοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, υπεύθυνα για: (α) την υποβάθμιση της γεύσης (τάγγισμα) και (β) την υποβάθμιση της ποιότητας των λιπιδίων (**Huis in't Veld, 1996, FAO 1986**). Τα λιπολυτικά ένζυμα θα μπορούσαν είτε να προέρχονται από το ίδιο το τρόφιμο είτε από τη δράση ψυχρότροφων μικροοργανισμών (**Huis in't Veld, 1996**). Τα εμπλεκόμενα ένζυμα είναι οι λιπάσες του δέρματος, του αίματος και του ιστού των ιχθύων. Τα κύρια ένζυμα που συμβάλλουν στην υδρόλυση των λιπιδίων των ψαριών είναι η τριακυλολιπάση και η φωσφολιπάση A2 και B (**Audley et al., 1978, Yorkowski & Brockerhoft, 1965**).

Η μη ενζυμική οξείδωση προκαλείται από ενώσεις αιματίνης (αιμογλοβίνη, μυογλοβίνη, κυτόχρωμα) που παράγουν υδροϋπεροξειδία (**Fraser & Sumar, 1998**). Τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης των λιπιδίων των ψαριών αλληλεπιδρούν με τις σαρκοπλασματικές και μυοϊνδιακές πρωτεΐνες προκαλώντας μετουσίωση. (**Σακελλαρίου, 2017**)

1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Η εκτίμηση της ποιότητας των ψαριών γίνεται με εξέταση με τις αισθήσεις και με εργαστηριακές μεθόδους. Εφόσον ο καταναλωτής είναι αυτός που εν τέλει κρίνει την ποιότητα, θα πρέπει να έχει προηγηθεί εκτίμηση της ποιότητας με τις αισθήσεις, προτού χρησιμοποιηθούν οι περισσότερες χημικές ή εργαστηριακές μέθοδοι. Παρόλα αυτά, η

εξέταση με τις αισθήσεις πρέπει να πραγματοποιηθεί επιστημονικά και κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιδράσεις του περιβάλλοντος, των προσωπικών προκαταλήψεων κ.λπ.

α) Η εξέταση με τις αισθήσεις χρησιμοποιείται για να προκαλέσει, να μετρήσει, να αναλύσει και να ερμηνεύσει μεταβολές σε χαρακτηριστικά των τροφίμων που γίνονται αντιληπτά μέσω της όρασης, της όσφρησης, της γεύσης, της αφής και της ακοής. Αν και τα περισσότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να μετρηθούν επαρκώς μόνο από τον άνθρωπο, γίνονται προσπάθειες για την κατασκευή οργάνων που να μπορούν να μετρήσουν ποιοτικές αλλαγές.

β) Οι βιοχημικές/χημικές μέθοδοι χρησιμεύουν στην εξέταση προϊόντων των οποίων η ποιότητα είναι αμφίβολη, δηλαδή δεν είναι εμφανής με γυμνό μάτι η καλή ή κακή ποιότητα του προϊόντος. Με τη χρήση των αισθήσεων, ανιχνεύονται συνήθως προϊόντα πολύ καλής ή πολύ κακής ποιότητας και όχι τα προϊόντα καλής/αποδεκτής και εξαιρετικής ποιότητας. (<https://www.fao.org/3/V7180E/v7180e09.htm>)

Επιπρόσθετα, οι βιοχημικές/χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να αντικαταστήσουν τις πιο χρονοβόρες μικροβιολογικές εξετάσεις. Είναι ωστόσο βασικό η συγκέντρωση των χημικών ενώσεων που μετρούνται να αυξάνεται ή να μειώνεται ανάλογα με τον βαθμό της μικροβιακής αλλοίωσης ή της αυτόλυσης. Οι ενώσεις που μετρούνται συνηθέστερα είναι: η τριμεθυλαμίνη, η διμεθυλαμίνη, η αμμωνία, λουπές βασικές πτητικές αζωτούχες ενώσεις που σχετίζονται με την αλλοίωση των αλιευμάτων και η αιθανόλη. Επίσης, μετρείται η οξειδωτική τάγγιση μέσω του προσδιορισμού των υδροπεροξειδικών ενώσεων των λιπαρών.

γ) Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μέτρηση των ηλεκτρικών ιδιοτήτων του δέρματος και των μεταβολών στους ιστούς μετά τον θάνατο, τη μέτρηση του pH, του δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh) και της υφής.

δ) Ο σκοπός των μικροβιολογικών εξετάσεων των αλιευμάτων είναι να γίνει μια εκτίμηση της πιθανής παρουσίας βακτηρίων ή μικροοργανισμών με σημασία για τη δημόσια υγεία και της υγιεινής κατάστασης των ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της θερμικής καταπόνησης και των συνθηκών που επικρατούν κατά τη διάρκεια των χειρισμών και της επεξεργασίας τους. Ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να συσχετιστεί με τον εναπομείναντα χρόνο συντήρησης (<https://www.fao.org/3/V7180E/v7180e09.htm>, Ιωάννου, 2012)

1.3.1 ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΙΧΘΥΩΝ

Οι δείκτες μικροβιακής ποιότητας ή διάρκειας ζωής είναι προϊόντα μεταβολισμού των ιχθύων. Η παρουσία τους σε συγκεκριμένα επίπεδα βοηθά στην αξιολόγηση της υφιστάμενης ποιότητας ενός προϊόντος (Jay, 2000).

Η δράση των μικροοργανισμών είναι σημαντικός παράγοντας της διάρκειας ζωής των νωπών ιχθύων. Οι αλιεύοντες ιχθύες διαφέρουν στον βακτηριακό τους πληθυσμό και ως εκ τούτου η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα κυμαίνεται από 2 έως 6 log cfu/g για ολόκληρους ιχθύες ή φιλέτα. Στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης η ΟΜΧ είναι συνήθως 7-9 log cfu/g (Ólafsdóttir et al., 1997, Mol et al., 2007). Οι αερόβιοι βακτηριακοί πληθυσμοί, επομένως, μπορούν να αποτελέσουν ένα μικροβιολογικό κριτήριο για την εκτίμηση της ποιότητας ενός προϊόντος, όταν αυτά τα κριτήρια χρησιμοποιούνται α) για τον έλεγχο τροφίμων ως προς τη συμμόρφωσή τους με κανονισμούς ή οδηγίες ορισμένες από διάφορες ρυθμιστικές υπηρεσίες, β) για τον έλεγχο τροφίμων ως προς τη συμμόρφωσή τους με τις προδιαγραφές αγοράς και γ) για τον έλεγχο της τήρησης της Ορθής Πρακτικής Παρασκευής και Επεξεργασίας (Good Manufacturing Practice, GMP) (Montville and Matthews, 2010).

Ως εκ τούτου, η καταμέτρηση των ΕΑΜ (ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών) που εμπλέκονται στην αλλοίωση των ιχθύων θα ήταν ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της υπολειπόμενης διάρκειας ζωής τους (Jørgensen et al., 1988). Έτσι, η ανίχνευση των ΕΑΜ, όπως *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Photobacterium phosphoreum*, κτλ, θεωρείται η πιο αξιόπιστη μέθοδος εκτός της ΟΜΧ για να αξιολογηθεί με ακρίβεια η νωπότητα ή το επίπεδο αλλοίωσης των αλιευμάτων (Ólafsdóttir et al., 2006). Παρεμπιπτόντως, το *Photobacterium phosphoreum* δεν έχει βρεθεί να αποτελεί αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στους ιχθύες από τα μεσογειακά ύδατα (Bozaris et al., 2011, Parlapani et al., 2013).

Σύμφωνα με τους Jay (2000) και Montville & Matthews (2010) η χρήση των μικροοργανισμών ως δείκτες ποιότητας, πρέπει να πληροί κάποιες προϋποθέσεις:

- Να υπάρχουν και να είναι ανιχνεύσιμοι στα τρόφιμα προς αξιολόγηση,
- Η ανάπτυξή τους και ο αριθμός τους θα πρέπει να επηρεάζουν άμεσα αρνητικά την ποιότητα του προϊόντος,
- Θα πρέπει να εντοπίζονται εύκολα και να διακρίνονται από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς,
- Θα πρέπει να καταμετρούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα,

- Η ανάπτυξή τους δεν θα πρέπει να επηρεάζεται δυσμενώς από τον υπόλοιπο βακτηριακό πληθυσμό του τροφίμου.

Επίσης, ο **Dainty (1996)** αναφέρει πως οι μικροβιολογικές μέθοδοι είναι χρονοβόρες, ενώ οι οργανοληπτικές έχουν υποκειμενικό χαρακτήρα, οπότε οι χημικές μέθοδοι και κυρίως ο προσδιορισμός των κατάλληλων χημικών δεικτών είναι ο πλέον αποτελεσματικός τρόπος για ταχύ και αξιόπιστο ποιοτικό έλεγχο.

Έτσι, εκτός από μικροβιολογικές δοκιμές, μια ποικιλία χημικών μεθόδων έχει χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση της διάρκειας ζωής των ιχθύων. Αυτές περιλαμβάνουν μέτρησεις pH, Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N), τριμεθυλαμίνης (TMA), θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) κ.α. (**Scherer et al., 2006, Mol et al., 2007**). Η περιεκτικότητα των ιχθύων σε TVB-N, TMA και μεμονωμένων νουκλεοτιδίων, καθώς και αναλογίες αυτών (K, Ki, H, G-values) προτάθηκαν ως δείκτες υποβάθμισης της ποιότητας των ιχθύων. Σύμφωνα με τους **Drosinos et al. (1997)** οι χημικές αλλαγές, ως πιθανό διαγνωστικό ή δείκτες ποιότητας, δεν έχουν μελετηθεί το ίδιο εκτεταμένα με τις μικροβιολογικές αλλαγές. Το TVB-N αναμένεται να έχει σχέση με διάφορες οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως η γεύση, ενώ έχει μεγαλύτερη αξιοπιστία από τα προαναφερόμενα. Περιλαμβάνει μετρήσεις NH₃, διμεθυλαμίνης (DMA) και TMA. Επομένως, είναι ένας καλός δείκτης, κατάλληλος και με εύκολη εφαρμογή (**Antoine et al., 2002**).

Ωστόσο, οι περισσότερες χημικές ενώσεις και οι μικροβιακοί μεταβολίτες αυξάνουν όταν η αλλοίωση είναι προχωρημένη, επομένως δεν έχουν προγνωστική αξία, επειδή οι ιχθύες δεν έχουν εναπομείναντα χρόνο ζωής (**Jørgensen et al., 1988**). Επιπλέον, η αξία του TVB-N περιορίζεται στο γεγονός ότι σημαντικές ποσότητες των ενώσεων αυτών παράγονται όταν οι ιχθύες βρίσκονται ήδη στο αρχικό στάδιο αλλοίωσης (**Lougovois et al., 2003**). Παρέχονται έτσι πληροφορίες μόνο του τελικού σταδίου αλλοίωσής τους (**Özogul et al., 2007**), ενώ συσχετίζεται θετικά με τη μικροβιακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλοίωσης στους μεσογειακούς ιχθύες κατά τη λήξη της περιόδου αποθήκευσης (**Boziaris et al., 2011**).

Τέλος, τα μεταβολικά προϊόντα που αναφέρονται παραπάνω μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση και πρόβλεψη της ποιότητας των προϊόντων. Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν είναι οι εξής (**Jay, 2000**):

- Να είναι προϊόντα μεταβολισμού ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού,

- Η αρχική τους συγκέντρωση, στο υπό εξέταση τρόφιμο, να είναι μηδενική ή ελάχιστη,
- Να παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια της συντήρησης,
- Να μην παρατηρείται αυξομείωση
- Συσχέτιση με κάποιο οργανοληπτικό χαρακτηριστικό,
- Ταχύς, εύκολος και ακριβής προσδιορισμός

Επομένως, η ανίχνευση των μικροβιακών μεταβολιτών θα ήταν χρήσιμο εργαλείο, ως εναλλακτική ή συμπληρωματική πληροφορία, στη μικροβιακή απαρίθμηση σε μοντέλα για την ταχεία αξιολόγηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής των προϊόντων αλιείας (**Dainty, 1996, Ólafsdóttir et al., 2006, Βέρδος, 2014**).

1.3.1.1. ΟΛΙΚΟ ΠΤΗΤΙΚΟ ΑΖΩΤΟ (TVBN)

Το ολικό πτητικό άζωτο είναι ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες ποιότητας των ιχθυηρών. Είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει: μέτρηση της τριμεθυλαμίνης, η οποία παράγεται από τα αλλοιογόνα βακτήρια, της διμεθυλαμίνης, που παράγεται από αυτολυτικά ένζυμα κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό κατάψυξη, της αμμωνίας, η οποία παράγεται από την απαμίνωση των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων και άλλων πτητικών βασικών αζωτούχων ενώσεων που συνδέονται με την αλλοίωση των ιχθυηρών. Οι τιμές του ολικού πτητικού αζώτου (TVBN) δεν αντικατοπτρίζουν τον τρόπο της αλλοίωσης (βακτηριακή ή αυτολυτική) και τα αποτελέσματα εξαρτώνται ως ένα μεγάλο βαθμό από τη μέθοδο ανάλυσης. Οι **Botta et al. (1984)** δεν βρήκαν καλή συμφωνία ανάμεσα σε 6 δημοσιευμένες μεθόδους προσδιορισμού του TVBN. Το όριο αλλοίωσης των ιχθυηρών καθορίζεται στα 30-35 mg N/100 g δείγματος από την ΕΥ (<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/91dc1ed4-6450-4a3c-8cab-45009644715c>). Η αμμωνία παράγεται στα αλλοιωμένα ψάρια με βακτηριακή διάσπαση ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως η ουρία. Είδη που περιλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες ουρίας, παράγουν περισσότερη αμμωνία από άλλα θαλασσινά ψάρια σε ένα πρώιμο στάδιο. Η αμμωνία μαζί με την TMA είναι υπεύθυνες για τη δυσοσμία των αλλοιωμένων ψαριών. Η τριμεθυλαμίνη και η διμεθυλαμίνη είναι τα προϊόντα διάσπασης

του ΤΜΑΟ εξαιτίας της βακτηριακής δράσης και όχι της ενζυμικής δράσης (**Λαζογεώργου & Μάκου, 1998**).

Αμινοξέα, όπως η γλυκίνη, η β-αλανίνη, η καρνιτίνη εμφανίζονται φυσιολογικά στα ψάρια και στα ασπόνδυλα. Η γλυκίνη εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με άλλα αμινοξέα (**Λαζογεώργου & Μάκου, 1998**).

Ένα εύρος μεθόδων χρησιμοποιείται για να μετρηθεί το TVB-N. Σε όλες αυτές τα ψάρια ή ένα μέρος από αυτά, αλκαλοποιούνται, οι βάσεις αποσπάζονται, συλλέγονται και μετρώνται μέσω τιτλοδότησης.

Ένα βασικό μειονέκτημα είναι ότι μερικοί από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για να αλκαλοποιηθούν τα ψάρια μετατρέπουν θεωρητικά άλλες ουσίες του ψαριού, σε αμμωνία κατά τη διάρκεια της απόσταξης, με αποτέλεσμα το ποσό του TVB-N να αυξάνεται καθώς η απόσταξη προχωράει. Οι **Connell και Howgate (1969)** υποστήριξαν ότι το TVB-N δεν ενδείκνυται ως δείκτης φρεσκότητας. Επίσης, η απώλεια πτητικών αμινών από διαφορετικά μέρη του σώματος μέσω του νερού που προέρχεται από το λιωμένο πάγο, μπορεί να προκαλέσει μεγάλες διαφορές στα αποτελέσματα. Επομένως τα διάφορα είδη αλιευμάτων δεν έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε ΟΤΜΑ, και επιπλέον μεγάλες διαφορές στην περιεκτικότητα σε ΟΤΜΑ έχουν τα άτομα του ίδιου είδους (**Λαζογεώργου & Μάκου, 1998**).

1.3.1.2. ΤΡΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΗ (ΤΜΑ)

Η τριμεθυλαμίνη είναι πτητική αμίνη δριμείας οσμής που συχνά συνδέεται με την χαρακτηριστική οσμή σήψης των αλλοιωμένων ιχθυηρών. Παρουσία της στα αλλοιωμένα ψάρια μειώνεται το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (ΤΜΑΟ) λόγω της βακτηριακής δράσης, το οποίο υπάρχει φυσικά στους ζωντανούς ιστούς πολλών ειδών θαλάσσιων ψαριών. Η μείωση του ΤΜΑΟ συνδέεται κυρίως με τα γένη των βακτηρίων που χαρακτηρίζουν το θαλάσσιο περιβάλλον (*Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* και *S. putrefaciens*) αλλά πραγματοποιείται επίσης και από κάποια είδη *Aeromonas* καθώς και *Enterobacteriaceae*.

Τα βακτήρια *Shewanella putrefaciens* σε αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιούν το ΤΜΑΟ σαν αποδέκτη ηλεκτρονίων για την αναερόβια αναπνοή. Η αναερόβια αναγωγή του ΤΜΑΟ από τα συγκεκριμένα βακτήρια πραγματοποιείται μέσω του κύκλου του Krebs (**Φράγκος, 2007**). Στα βακτήρια η μετατροπή του ΤΜΑΟ σε ΤΜΑ γίνεται σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (**Λαζογεώργου & Μάκου, 1998**):



όπου Α είναι μια πηγή υδρογόνου όπως το γαλακτικό οξύ και το πυροσταφυλικό οξύ.

Η περιεκτικότητα σε ΤΜΑΟ στους ιστούς των θαλασσινών αλιευμάτων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλότητα. Οι χονδριχθύες παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες τιμές σε ΤΜΑΟ και ακολουθούν τα καλαμάρια και οι μπακαλιάροι, ενώ χαμηλότερες τιμές εμφανίζονται στα πλατύψαρα και ενδιάμεσες στα πελαγικά ψάρια. Τα ψάρια με λευκή σάρκα, γενικώς, περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες ΤΜΑΟ από τα ψάρια με κόκκινη σάρκα.

Στα ψάρια του γλυκού νερού, το ΤΜΑΟ εμφανίζεται σε ίχνη με εξαίρεση το λούτσο, ο οποίος περιέχει σημαντικό ποσοστό ΤΜΑΟ (50mg/100g). Έτσι μια διακύμανση στην ποσότητα του ΟΤΜΑ είναι εμφανή λόγω της διαφοροποίησης των ειδών. Ωστόσο, μπορεί να εμφανιστεί μια μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδά του, μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Παράγοντες όπως η εποχή, το μέγεθος, η ηλικία και οι περιβαλλοντικές συνθήκες που ζουν τα αλιεύματα επηρεάζουν την ποσότητα του ΤΜΑΟ.

Επιπλέον η κατανομή του στο σώμα του ψαριού είναι άνιση. Στο αίμα των χονδριχθύν παρουσιάζονται σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Γενικότερα στα θαλασσινά είδη όπως η τσιπούρα και το λαβράκι, η συγκέντρωση του ΤΜΑΟ είναι χαμηλότερη στα εσωτερικά όργανα παρά στους μυς. Επομένως θα πρέπει να γίνεται μια αναφορά για το μέρος του μυός του ψαριού που αναλύθηκε για την περιεκτικότητά του σε ΤΜΑΟ καθώς και των προϊόντων διάσπασής του (Λαζογεώργου & Μάκου, 1998, Φράγκος, 2007).

1.3.1.3. TBA

Η μέτρηση του TBA χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του βαθμού οξειδωτικής τάγγισης. Η οξειδωτική τάγγιση, όπως ιδιαίτερα συμβαίνει στα λιπαρά ψάρια είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, όπου το οξυγόνο πρώτα αντιδρά με τα πολυακόρεστα λιπίδια για να σχηματίσουν υπεροξείδια τα οποία ακολούθως διασπώνται σε ενώσεις που προσδίδουν την ταγγή γεύση. Τα υπεροξείδια αποτελούν μέτρο του 1ου σταδίου τάγγισης και το TBA του τελικού σταδίου διάσπασης, αλλά κανένα από τα δύο δεν συσχετίζεται απόλυτα και σε όλες τις περιπτώσεις με τον οργανοληπτικό έλεγχο της οξείδωσης. Τιμές TBA πάνω από 3mg/kg, πιθανά συνδέονται με ταγγισμένη γεύση και οσμή (Λαζογεώργου & Μάκου, 1998, Φράγκος, 2007)

Η μέθοδος του θειοβαρβιτουρικού οξέος βασίζεται στον σχηματισμό χρώματος από τα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης με τη χρήση του αντιδραστηρίου «θειοβαρβιτουρικό οξύ». Το σχηματιζόμενο χρώμα εμφανίζει ένα μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 532 nm , όπου λαμβάνεται και η μέτρηση. Όσο πιο έντονο είναι το σχηματιζόμενο χρώμα, τόσο πιο οξειδωμένο είναι το εξεταζόμενο δείγμα ψαριού. Ο αριθμός TBA εκφράζεται σε mg/kg μηλονικής διαλδεΰδης (Λαζογεώργου & Μάκου, 1998, Φράγκος, 2007).

Τιμές TBA μικρότερες ή και ίσες από 3mg/kg αντιστοιχούν σε υψηλή ποιότητα κατεψυγμένου ή κονσερβοποιημένου ψαριού (Λαζογεώργου & Μάκου, 1998, Φράγκος, 2007).

1.4 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΙΧΘΥΩΝ ΥΠΟ ΨΥΞΗ

Συντήρηση τροφίμων (food preservation) είναι η λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση των αιτιών που προκαλούν ποιοτική υποβάθμιση ή αλλοίωση των τροφίμων, έτσι ώστε να τα αποδέχεται ο καταναλωτής και να είναι ασφαλή για την υγεία του για καθορισμένο χρονικό διάστημα, κάτω από τη διατήρησή τους συγκεκριμένες συνθήκες (Μπλούκας, 2004).

Ως ψύξη (cold storage) εννοούμε τη διατήρηση των τροφίμων σε περιβάλλον θερμοκρασίας από ~ 16 °C έως - 2°C (Montville and Matthews, 2010). Για ευαλλοίωτα προϊόντα, όπως οι ιχθύες, η διατήρηση σε ψύξη κυμαίνεται από 0 έως 7°C το μέγιστο (Μποζιάρης et al., 2010). Η ψύξη συμβάλλει στη διατήρηση των ιχθύων πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση. Κατά την αποθήκευση του ψαριού σε χαμηλές θερμοκρασίες, τόσο οι ενζυμικές όσο και οι χημικές αντιδράσεις (Chomnawang et al., 2007; Erkan and Özden et al., 2008), καθώς και η μικροβιακή ανάπτυξη, επιβραδύνονται (Μπλούκας, 2004).

Επίσης, διάρκεια ζωής είναι το χρονικό διάστημα κάτω από καθορισμένες συνθήκες αποθήκευσης για το οποίο ένα διατροφικό προϊόν παραμένει ασφαλές και κατάλληλο προς χρήση (Sallam, 2007). Αποθηκεύοντας τους ιχθύες σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατείνεται ο χρόνος διάρκειας ζωής τους (Lambert et al., 1991; Gökodlu et al., 1998). Το ποσοστό υποβάθμισης, κατά την αποθήκευση υπό ψύξη, διαφέρει ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του υποστρώματος και μεταβολιτών του ιστού, τη μικροβιακή μόλυνση και τις συνθήκες αποθήκευσης μετά την αλίευση (Özyurt et al., 2009), ενώ η ποιότητα των ιχθύων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις θερμοκρασίες αποθήκευσης (Gökoğlu et al., 2004).

Εν κατακλείδι, η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι μια μέθοδος συντήρησης με στόχο την επιβράδυνση της μικροβιακής αλλοίωσης από τα μέσα του 19ου αιώνα. Έχει το πλεονέκτημα να διατηρεί τη νωπότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όμως

αδυνατεί να θανατώσει πλήρως τους μικροοργανισμούς, εγκυμονώντας κινδύνους για την υγεία (Ashie et al., 1996). Έτσι, οι χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνουν τη βακτηριακή ανάπτυξη παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Lambert et al., 1991; Βέρδος, 2014).

1.5 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

1.5.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ)

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.) αποτελεί δείκτη της μικροβιολογικής κατάστασης ενός τροφίμου. Η Ο.Μ.Χ. δεν αποτελεί μια μέτρηση του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού, αλλά μια μέτρηση του κλάσματος της μικροχλωρίδας, ικανής να παράγει αποικίες στο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται κατά την επώαση. Η θερμοκρασία που υπάρχει κατά την επώαση επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των αποικιών που θα αναπτυχθούν από το ίδιο δείγμα. Για παράδειγμα, η Ο.Μ.Χ. μπορεί να ποικίλει κατά έναν παράγοντα από 10-100 όταν εξετάζονται κατεψυγμένα ψάρια και τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C και στους 37°C αντίστοιχα (<http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768E/T1768E04.htm>). Μεταβάλλοντας το περιβάλλον της επώασης ή το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα, μπορούν να ανιχνευτούν διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, όπως αναερόβιοι, μεσόφιλοι, ψυχρόφιλοι, θερμόφιλοι, πρωτεολυτικοί, λιπολυτικοί, κ.λ.π (Pierson et al, 2007).

Επίσης, η Ο.Μ.Χ. δεν μπορεί να διαχωρίσει μεταξύ των ειδών των βακτηρίων και μπορεί να βρεθούν παρόμοια επίπεδα Ο.Μ.Χ., παρόλο που η βιοχημική δραστηριότητα των βακτηρίων μπορεί να ποικίλει σημαντικά στο τρόφιμο. Ακόμη, υψηλοί πληθυσμοί ως αποτέλεσμα μικροβιακής ανάπτυξης είναι πολύ πιθανότερο να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα τρόφιμα, από παρόμοια επίπεδα που προέρχονται από πρόσφατες επιμολύνσεις.

Η Ο.Μ.Χ. δεν έχει νόημα ως δείκτης α) σε αλιεύματα που έχουν επεξεργαστεί (π.χ. NaCl < 6% w/w σε υγρή φάση, pH > 5.0), όπως είναι τα αλατισμένα, τα μαριναρισμένα και τα καπνιστά ψάρια, β) σε ημισυντηρημένα αλιεύματα (π.χ. NaCl > 6% w/w σε υγρή φάση ή pH < 5.0, γ) σε αλιεύματα που έχουν προστεθεί συντηρητικά όπως σορβικό, βενζοϊκό, NO₂, δ) τα αλατισμένα ή/και μαριναρισμένα ψάρια και το χαβιάρι, τα οποία καταναλώνονται χωρίς μαγείρεμα. Αυτό συμβαίνει γιατί στα προϊόντα αυτά μπορεί να αναπτυχθεί φυσιολογικά ένας μεγάλος αριθμός μη αλλοιογόνων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επίσης, η Ο.Μ.Χ. έχει

αμφίβολη αξία σε κατεψυγμένα ψάρια, καθώς μπορεί να έχουν θανατωθεί βακτήρια κατά τη διάρκεια της κατάψυξης.

Ένας πολύ χαμηλός αριθμός μπορεί συνεπώς να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με την υγιεινή του προϊόντος.

Η απαρίθμηση της Ο.Μ.Χ. μπορεί να χρησιμεύσει στην εκτίμηση της κατάστασης του ωμού προϊόντος, της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών (π.χ. θερμική επεξεργασία) και της κατάστασης υγιεινής κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, του εξοπλισμού και των παραμέτρων του χρόνου σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία κατά τη συντήρηση και τη διανομή. Παρόλα αυτά, για να είναι χρήσιμα τα αποτελέσματα και να γίνει σωστή ερμηνεία τους πρέπει να υπάρχει επαρκής γνώση των χειρισμών και των συνθηκών επεξεργασίας πριν τη δειγματοληψία (<http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768E/T1768E04.htm>).

Η κυρίαρχη μικροχλωρίδα στα νωπά ψάρια περιλαμβάνει τα γένη *Acinetobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Altermonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* (Πανέτσος 1978, Αρβανιτογιάννης et al., 2001, Ιωάννου et al. 2012)

1.5.2 Ψυχρόφιλοι Μικροοργανισμοί

Οι μορφές ζωής που ζουν συνεχώς σε κρύο περιβάλλον έχουν αναπτύξει φυσιολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς ώστε να βελτιστοποιήσουν τη δραστηριότητά τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στους οργανισμούς που έχουν προσαρμοστεί στο ψυχρό περιβάλλον περιλαμβάνονται βακτήρια, απλοί ή σύνθετοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί (από άλγη έως ψάρια) (Bowman, 2001).

Απαντώνται σε εύκρατες έως και πολικές περιοχές, στην ξηρά και στο νερό, πάνω ή μέσα σε διάφορα φυτά ή ζώα και σε τρόφιμα. Τα ψυχρόφιλα βακτήρια μπορεί να είναι βάκιλλοι, κόκκοι ή δονάκια, gram-θετικά ή gram-αρνητικά, σπορογόνα ή μη σπορογόνα, και αερόβια, προαιρετικά αερόβια ή αναερόβια. Κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι η ανάπτυξή τους σε θερμοκρασίες από 0°C και μικρότερες, σε αντίθεση με την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των μεσόφιλων που είναι οι 10°C (Stokes & Redmond, 1966).

Πρόκειται για μεγάλη ομάδα μικροοργανισμών (*Listeria*, *Pseudomonas*, *Shewanella* κ.ά.) πολύ σημαντικών στη μικροβιολογία και στην ασφάλεια των τροφίμων, αφού οι περισσότεροι από αυτούς μπορούν να αλλοιώσουν τα τρόφιμα, ενώ κάποιοι είναι παθογόνοι

για τη δημόσια υγεία. Όταν προσβάλλουν τον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσουν από ήπιες έως πολύ σοβαρές λοιμώξεις, ενώ χρησιμοποιούνται από πολλούς ερευνητές ως μικροβιακός δείκτης (Βασιλειάδου, 2003).

1.5.3 *Pseudomonas* spp.

Κοινά χαρακτηριστικά του γένους *Pseudomonas* είναι τα εξής:

- Gram-αρνητικός βάκιλλος (ευθύς, ασπορογόνος, 0,5-1,0 x 1,5-4,0 μm)
- κινητός λόγω πολικού μαστιγίου
- οξειδάση-θετικός (εκτός του είδους *P. syringae*)
- καταλάση-θετικός

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο, προσβάλλοντας συχνότερα ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, όπως ασθενείς με κυστική ίνωση ή AIDS. Σπάνια, ακόμα και μη παθογόνα είδη μπορεί να αποτελέσουν πρόβλημα ενδονοσοκομειακά, λόγω της αιμολυτικής τους δράσης.

Οι *Pseudomonas* προκαλούν αλλοίωση των ψαριών κατά τη συντήρησή τους σε άσχημες συνθήκες. Από τις ψευδομονάδες μόνο η *P. putrefaciens* αλλοιώνει τα ψάρια κρύου θαλασσινού νερού που συντηρούνται στον πάγο, ενώ η *P. phosphoreum* αλλοιώνει τα ψάρια που συντηρούνται σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Έγινε ανίχνευση του μικροοργανισμού στο 62% των δειγμάτων από ψάρια θαλασσινού νερού, ενώ υπήρξαν και διακυμάνσεις ανάλογα με την εποχή του έτους (υψηλότερη συγκέντρωση το φθινόπωρο και μικρότερη το καλοκαίρι) (Aberoumand, 2010).

Σύμφωνα με έρευνα των Tryfinopoulou et al. (2002) στην τσιπούρα ανιχνεύονται 106 στελέχη. Το κυρίαρχο είδος είναι η *Pseudomonas lundensis*, ακολουθούμενο από την *Pseudomonas fluorescens*, ενώ η *Pseudomonas fragi* και η *Pseudomonas putida* ανιχνεύονται λιγότερο συχνά.

1.5.4 Υδροθειούχα βακτήρια ή βακτήρια που παράγουν H₂S

Τα είδη *Shewanella* είναι gram-αρνητικές, κινητές ράβδοι, οι οποίες γενικά είναι μη ζυμωτικές. Τα είδη *Shewanella* παράγουν H₂S τόσο από οργανικές όσο και από ανόργανες πηγές. Είναι ικανά για αναερόβια αναπνοή χρησιμοποιώντας αρκετούς δέκτες ηλεκτρονίων και τα περισσότερα στελέχη μειώνουν το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) (Brettar et al.,

2002, Venkateswaran et al., 1999). Τα είδη *Shewanella* μπορούν να απομονωθούν από ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων.

Τα είδη μπορεί να είναι μεσόφιλα (*S. algae*, *S. amazonensis*, *S. colwelliana*, *S. oneidensis* και *S. putrefaciens*), ψυχροτροφικά ή ψυχρόφιλα (*S. putrefaciens*, *S. baltica*, *S. frigidimarina*, *S. woodyi* και *S. dinitrificans*), ψυχρόφιλα (*S. gelidimarina* και *S. hanedai*), καθώς και βαρόφιλα (βακτήρια που έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με υψηλή πίεση, ειδικότερα σε συνθήκες αυξημένης υδροστατικής πίεσης, όπως στα βαθιά θαλάσσια οικοσυστήματα) (*S. benthica*) (**Bozal et al., 2002, Ivanova et al., 2003, Nogi et al., 1998, Venkateswaran et al. 1999**). Το είδος *S. putrefaciens* διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο ως οργανισμός αλλοίωσης των ψαριών και άλλων προϊόντων διατροφής (**Gram et al., 2002, Vogel et al., 2005**).

Η ψυχροτροφική φύση και η ικανότητα του *S. putrefaciens* να ανάγει το ΤΜΑΟ σε τριμεθυλαμίνη (TMA) εξηγεί τη σημασία του στην αλλοίωση των ψαριών που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου η «ψαρώδης» οσμή των αλλοιωμένων ψαριών προκαλείται από την παραγωγή TMA. Το βακτήριο αποικοδομεί επίσης αμινοξέα που περιέχουν θείο και παράγει πτητικά σουλφίδια, συμπεριλαμβανομένου του H₂S (**Gram et al., 1996, Herbert et al., 1971**).

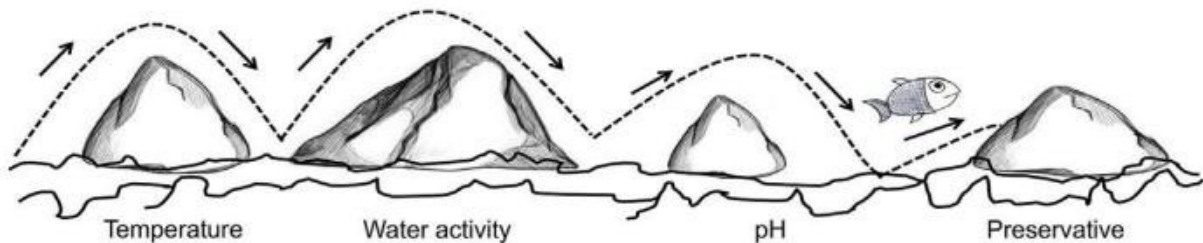
1.5.5 Γαλακτικά βακτήρια (LAB)

Τα «βακτήρια γαλακτικού οξέος» χαρακτηρίζονται ως Gram-θετικά, συνήθως μη κινητά, μη σποριώδη βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο ή μοναδικό προϊόν του ζυμωτικού μεταβολισμού. Τα μέλη αυτής της ομάδας που περιέχουν και τις δύο ράβδους (γαλακτοβάκιλλοι και καρνοβακτήρια) και στρεπτόκοκκους, είναι γενικά αρνητικά στην καταλάση και συνήθως στερούνται κυτοχρωμάτων. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι διατροφικά επιδέξια, απαιτώντας υδατάνθρακες, αμινοξέα, πεπτίδια, παράγωγα νουκλεϊνικών οξέων και βιταμίνες.

Διαφορετικά είδη βακτηρίων γαλακτικού οξέος έχουν προσαρμοστεί για να αναπτυχθούν κάτω από πολύ διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος βρίσκονται συνήθως στο γαστρεντερικό σωλήνα διαφόρων ενδόθερμων ζώων, ποντικών, αρουραίων, χοίρων, πτηνών και ανθρώπων, στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα στα θαλασσινά προϊόντα και σε κάποια επιφάνεια φυτών (**Ringø & Gatesoupe, 1998**).

1.6 ΘΕΩΡΙΑ ΤΩΝ ΕΜΠΟΔΙΩΝ (HURDLE TECHNOLOGY)

Η σύγχρονη τάση των καταναλωτών για ασφαλή και ποιοτικά προϊόντα ελάχιστα επεξεργασμένα, με καθόλου ή ελάχιστη προσθήκη συντηρητικών, θρεπτικά και υγιεινά, ενώ παράλληλα να έχουν και μεγάλη διάρκεια ζωής, έχει οδηγήσει στην ανάγκη υιοθέτησης νέων ή βελτιωμένων ήπιων μεθόδων συντήρησης που επιτρέπουν την παραγωγή φρέσκων αλλά σταθερών και ασφαλών τροφίμων. Η ανάγκη αυτή καλύπτεται από τη θεωρία των εμποδίων. Υποστηρίζει τον προσεκτικό σχεδιασμό υφιστάμενων ή νέων τεχνικών συντήρησης, στοχεύοντας στον καθορισμό μιας σειράς παραγόντων συντήρησης (εμπόδια- hurdles) τους οποίους οι μικροοργανισμοί δεν είναι σε θέση να υπερνικήσουν (Tsironi et al., 2020).



Εικόνα 2: Παράδειγμα της τεχνολογίας των εμποδίων στα ψάρια (Tsironi et al., 2020)

Τα σημαντικότερα εμπόδια που χρησιμοποιούνται στη συντήρηση των τροφίμων είναι η θερμοκρασία (υψηλή ή χαμηλή), ενεργότητα νερού (a_w), οξύτητα (pH), δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh), τα συντηρητικά (όπως νιτρικά, σορβικό) και ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί (όπως γαλακτικά βακτήρια). Μπορεί να υπάρξει ταυτόχρονη ή διαδοχική εφαρμογή των εμποδίων, ανάλογα με τον τύπο του εμποδίου και τη συνολική επεξεργασία (Leistner & Gorris, 1995). Ο έξυπνος συνδυασμός των εμποδίων διασφαλίζει τη μικροβιακή ασφάλεια και σταθερότητα, καθώς και τις οργανοληπτικές, θρεπτικές και οικονομικές ιδιότητες του προϊόντος.

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

Συνεπώς, ο συνδυασμός της ψύξης με άλλα εμπόδια, όπως η συσκευασία, η συσκευασία με αντιμικροβιακές μεμβράνες και η προσθήκη αιθέριων ελαίων μπορεί να είναι καθοριστικός στη μεγαλύτερη διατηρησιμότητα του προϊόντος (Λουλούδα, 2021).

1.6.1 ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ-ΠΟΛΥΑΜΙΔΙΟΥ (PA-PE)

Το PA-PE είναι ένα υλικό φραγμού το οποίο παρασκευάζεται με τις τεχνικές συμβατικού λαμιναρίσματος, συνεξώθησης, επιστρώσης η και συνδυασμού αυτών, συνδυάζοντας τα επιμέρους υλικά PA (nylon) και PE.

Το υλικό λοιπόν αυτό συνδυάζει τα χαρακτηριστικά των δύο επιμέρους υλικών του. Το LDPE εμφανίζει πολύ καλό φράγμα στο H₂O, φτωχό φράγμα σε σταθερά αέρια και αρώματα με εξαιρετική στεγανότητα και χαμηλή διαφάνεια. Τα πολυαμίδια (nylon) είναι προϊόντα συμπίκνωσης διαμίνης και δικαρβοξυλικών οξέων. Τα πολυαμίδια έχουν ανώτερες μηχανικές ιδιότητες, καλό φράγμα στα αέρια, φτωχό φράγμα στην υγρασία, αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες (140°C) (Μπαδέκα, 2022).

1.6.2. MEMBRANE PLA

Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων έχει εγκρίνει το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) για χρήση ως υλικό συσκευασίας για ασφαλή χρήση του σε επαφή με τα τρόφιμα.

Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές που προέρχεται από τα μονομερή γαλακτικού οξέος ανανεώσιμων πηγών, όπως άμυλο καλαμποκιού, ρίζες ταπιόκας, άμυλο, ζαχαροκάλαμο, όξινος ορός γάλακτος (Chu et al., 2017, Süfer, 2017, Zhong et al., 2020). Το PLA παράγεται με χημική μετατροπή (Tsang et al., 2019) του καλαμποκιού και των πηγών υδατανθράκων του σε δεξτρόζη, η οποία στη συνέχεια ζυμώνεται περαιτέρω σε γαλακτικό οξύ και ακολουθείται από πολυσυμπύκνωση. Το PLA θα μπορούσε να ληφθεί με πολυμερισμό ανοίγματος δακτυλίου (Süfer, 2017, Zhong et al., 2020), η οποία είναι η διαδικασία θραύσης της κυκλικής λακτιδικής αλυσίδας για την ανάπτυξη μιας μακράς και συνεχούς αλυσίδας PLA. Με την ταξινόμησή του να αναγνωρίζεται γενικά ως ασφαλές (GRAS) από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) (Süfer, 2017, Tawakkal et al., 2014, Jamshidian et al., 2010), η χρήση του PLA έχει εγκριθεί ως ασφαλής για χρήση σε συσκευασίες τροφίμων.

Η βιοαποικοδόμηση του πολυμερούς μπορεί να οριστεί ως η ικανότητα των πολυμερών να αποσυνθέτουν το σώμα του λόγω των φυσικών περιβαλλοντικών παραγόντων που οδηγούν

στην απώλεια των κύριων ιδιοτήτων του όπως η μηχανική και η χημική διαμόρφωση, και τα τελευταία προϊόντα της διαδικασίας θα μπορούσαν να είναι ο συνδυασμός νερού, διοξειδίου του άνθρακα, ορυκτών και άλλων υποπροϊόντων όπως η βιομάζα και οι οργανικές ενώσεις (Jamshidian et al., 2010).

Το πολυγαλακτικό (PLA) είναι ένας από τους πιο ελπιδοφόρους πολυεστέρες βιολογικής προέλευσης (Su et al., 2019) που μελετάται εκτενώς για τις βιοδιασπώμενες ιδιότητές του για συσκευασίες τροφίμων (Ogunsona et al., 2020). Ταξινομείται στα βιοδιασπώμενα πολυμερή που μπορούν να αποσυντεθούν (Parth et al., 2011) και να υποστούν αλλοίωση όταν έρχονται σε επαφή με την υγρασία ή το περιβάλλον (Singh et al., 2018). Η αποδόμηση του PLA επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες και δύο κοινούς μηχανισμούς αποδόμησης που αφορούν τη δομή και τα μέσα υδρόλυσης (Scaffaro et al., 2019, Guzman et al., 2011, Farah et al., 2016). Οι Guzman et al. (2011) ανέφεραν ότι η αποικοδόμηση του PLA οφείλεται αρχικά στην υδρόλυση της δομής του PLA σε μια ένωση που διαλύεται στο νερό ακολουθούμενη από τη βακτηριακή επίθεση (Farah et al., 2016) στα υπολείμματα όπως η υγρασία, το διοξείδιο του άνθρακα και οι άλλες οργανικές ενώσεις (Guzman et al., 2011). Η υδρολυτική αποδόμηση στο PLA μπορεί να λάβει χώρα κατά την επεξεργασία τήγματος (Scaffaro et al., 2019) η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί από την παρουσία υγρασίας σε υψηλές θερμοκρασίες και οι υδρολυτικές αντιδράσεις είναι ιδιαίτερα ταχύτερες υπό αλκαλικές συνθήκες.

Το PLA έχει καλή μηχανική αντοχή και θερμική πλαστικότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές εφαρμογές. Έχει χαμηλή σκληρότητα με μόνο το 10% της επιμήκυνσης στο σημείο θραύσης (Arrieta et al., 2014), με άλλα λόγια, είναι σχετικά εύθραυστο πολυμερές υλικό. Η κρυσταλλική δομή του PLA μπορεί να είναι άμορφη ή ημικρυσταλλική σε στερεά κατάσταση (Arrieta et al., 2014), ανάλογα με τη στερεοχημεία και τη θερμική ιστορία του. Δηλώνεται ότι έχει σημείο τήξης περίπου 151°C με την τιμή της θερμότητας σύντηξης περίπου 21,5 J / g (Malek et al., 2021).

Ωστόσο, αυτό το πολυμερές έχει επίσης ορισμένα μειονεκτήματα που περιορίζουν τη χρήση του ως υποκατάστατο των συνθετικών πολυμερών στη βιομηχανία συσκευασίας τροφίμων. Η χαμηλή θερμική σταθερότητα, η υψηλή ευθραυστότητα και τα φτωχά ανασταλτικά χαρακτηριστικά κατά της υγρασίας και της μετάδοσης οξυγόνου είναι μεταξύ αυτών των μειονεκτημάτων (Shakour et al., 2020).

Το πολυγαλακτικό (PLA) έχει διακριθεί ως μια ενδιαφέρουσα επιλογή για ενεργή συσκευασία τροφίμων λόγω της βιοδιασπασιμότητάς του και των αποδεκτών φυσικών και μηχανικών ιδιοτήτων του. Είναι ένας θερμοπλαστικός πολυεστέρας γραμμικής αλυσίδας που έχει τη δυνατότητα να αντικαταστήσει συμβατικά πολυμερή όπως πολυαμίδιο, πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο και πολυτερεφθαλικό αιθυλεστέρα (Malek et al., 2021).

1.6.3. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Πρόσφατα, οι επιβλαβείς επιδράσεις που σχετίζονται με τα συνθετικά συντηρητικά οδήγησαν στην αναζήτηση νέων εναλλακτικών λύσεων σε φυσικά προϊόντα (Alirezalu et al., 2020, Aminzare et al., 2016). Μια μεγάλη ποικιλία πολύτιμων ενώσεων μπορεί να ληφθεί από φυτά (Munekata et al., 2020, Pateiro et al., 2021).

Τα αιθέρια έλαια (EOs) είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που λαμβάνονται από φυτά των οικογενειών Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Umbelliferae, Zingiberaceae, μεταξύ άλλων (Wińska et al., 2019), τα οποία αποτελούνται από σύνθετα μείγματα πτητικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους. Αυτές οι πολύτιμες ουσίες μπορούν να ληφθούν από διάφορα μέρη των φυτών όπως φλοιός, λουλούδια και φρούτα, φύλλα, ρίζες και μίσχοι (Nikmaram et al., 2018). Τα περισσότερα χαρακτηρίζονται από το ότι είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ μερικά θα μπορούσαν να έχουν στερεή ή ρητινώδη εμφάνιση. Όσον αφορά το χρώμα τους, αυτό ποικίλλει σημαντικά, από ανοιχτό κίτρινο έως σμαραγδένιο πράσινο και από μπλε έως σκούρο καφετί κόκκινο (Saranraj and Devi, 2018).

Τα ευεργετικά τους αποτελέσματα αποδίδονται κυρίως στην παρουσία βιοδραστικών ενώσεων (BAC), οι οποίες ευθύνονται για τις αντικαρκινογόνες, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμεταλλαξιογόνες, αντιοξειδωτικές και αντιπολλαπλασιαστικές τους ιδιότητες (Giacometti et al., 2018, Leyva-López κ.ά., 2017). Υπάρχουν πολλές πολύτιμες ενώσεις που αποτελούν μέρος της σύνθεσής τους, τα τερπενοειδή και τα φαινυλοπροπανοειδή, είναι τα κύρια (π.χ καρβακρόλη, θυμόλη), αλλά τα λιπαρά οξέα, τα οξείδια και τα παράγωγα θείου αποτελούν επίσης μέρος της σύνθεσής τους. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των ΕΟ που προέρχονται από πολλά φυτά έχουν αναγνωριστεί και αρχίζει να εφαρμόζεται τελευταία μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για την παράταση της διάρκειας ζωής του κρέατος και των προϊόντων κρέατος. Η εφαρμογή των ΕΟ επιτρέπει την αναστολή της ανάπτυξης αρκετών παθογόνων βακτηρίων και μικροοργανισμών αλλοίωσης που οι συνθετικές ενώσεις μερικές φορές δεν μπορούν να εξαλείψουν. Επιπλέον,

προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες με λιγότερες παρενέργειες και λειτουργικές ιδιότητες (Pateiro et al., 2020).

Αν και τα ΕΟ χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα, η φυσική τους προέλευση δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η χρήση τους είναι ασφαλής. Για να διασφαλιστεί αυτό, είναι απαραίτητο να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια, η τοξικότητα και ο μηχανισμός δράσης τους (Zuntar et al., 2018). Τα αποτελέσματα αυτών των αυστηρών ποιοτικών ελέγχων τα έχουν αναγνωρίσει ως Γενικά Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή (GRAS), επιτρέποντας τη χρήση τους σε τρόφιμα ως ασφαλή πρόσθετα (FDA, 2020). Ωστόσο, μερικές φορές είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα με τα πρόσθετα του εμπορίου, τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα στο προϊόν ή ακόμη και προβλήματα τοξικότητας (Ju et al., 2019). Αυτό καθιστά απαραίτητο να εξεταστεί η χρήση τους σε συνδυασμό με άλλα συντηρητικά, αναζητώντας ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα που επιτρέπει την επίτευξη καλύτερης δραστηριότητας σε χαμηλότερη συγκέντρωση, αλλά επαρκή για την αποφυγή εμφάνισης ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων (Pateiro et al., 2018, Pateiro et al. 2020).

Ο κύριος μηχανισμός καταστροφής των βακτηρίων είναι η διατάραξη της δομής της μεμβράνης τους. Η υδρόφοβη φύση των ΕΟs προκαλεί τη συσσώρευσή τους στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απώλεια δομής, στεγανότητας, κυτταρικών συστατικών και λειτουργιών της μεμβράνης (Jayasena and Jo, 2013, Liolios, 2009, Pateiro et al., 2020). Διαταράσσεται η ισορροπία της ωσμωτικής πίεσης και η δομή των πρωτεϊνών που συγκρατούν μαζί το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου. Μόλις διαταραχθεί η διαπερατότητα των κυττάρων, η απώλεια νερού λόγω της παρουσίας των κατιόντων H^+ και K^+ μέσα στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο του κυττάρου (Heipieper et al., 1991, Kocatepe et al., 2019). Στην περίπτωση των gram-αρνητικών, είναι σε θέση να απελευθερώσουν συστατικά λιποπολυσακχαριτών που αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε ATP (Guarda et al., 2011). Πιθανώς, οι φαινολικές ενώσεις είναι ο κύριος υπεύθυνος για τη μικροβιακή τους δραστηριότητα που συνδέεται με τη θέση της υδροξυλομάδας τους (Jayasena and Jo et al. 2013). Επομένως, γενικά, όσο περισσότερες φαινολικές ενώσεις τόσο περισσότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι τροφιμογενών παθογόνων (Alirezalu et al., 2020, Silva et al., 2010, Pateiro et al., 2020)

1.6.3.1. Αιθέριο Έλαιο Κόλιανδρου

Ο κορίανδρος (*Coriandrum sativum* L.) είναι ένα γνωστό βότανο που χρησιμοποιείται ευρέως ως μπαχαρικό, στη λαϊκή ιατρική, στη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων. Το έλαιο από σπόρους κορίανδρου είναι ένα από τα 20 βασικά αιθέρια έλαια στην παγκόσμια αγορά και είναι γνωστό ότι έχει αντιμικροβιακή δράση, παρ' όλα αυτά ο μηχανισμός δράσης του είναι ακόμη ασαφής (Raal et al., 2004).

Το αιθέριο έλαιο (ΕΟ) μπορεί να εξαχθεί από διάφορα μέρη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των λουλουδιών, του στελέχους, των σπόρων, των ριζών και του φλοιού. Ωστόσο, η σύνθεση του ΕΟ μπορεί να ποικίλει μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του ίδιου φυτού, όπως, το ΕΟ που λαμβάνεται από τον σπόρο *C. sativum* έχει διαφορετική σύνθεση από το ΕΟ του άνθους *C. sativum* καθώς και το κόλιαντρο (ανώριμα φύλλα). Το έλαιο *C. sativum* από πλήρως ώριμους και αποξηραμένους σπόρους είναι ένα άχρωμο ή υποκίτρινο υγρό με χαρακτηριστική οσμή και ήπια, γλυκιά, ζεστή και αρωματική γεύση, και η λιναλοόλη είναι το κύριο συστατικό του (Burdock et al., 2009). Ενώ οι αλειφατικές αλδεΐδες (κυρίως οι C10-C16 αλδεΐδες), με τη δυσάρεστη οσμή τους, είναι τα κύρια συστατικά του πτητικού ελαίου από το φρέσκο βότανο (Potter et al., 1990), η λιναλοόλη και άλλα οξειδωμένα μονοτερπένια καθώς και οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες κυριαρχούν στο έλαιο που αποστάζεται από τον καρπό (Bhuiyah et al., 2009, Mandal et al., 2015).

Αντιβακτηριακή Δραστικότητα

Οι Delaquis et al. (2002) εξέτασαν την αντιβακτηριακή δράση των αποσταγμένων κλασμάτων COL (σπόροι του *C. sativum* L.) και κόλιαντρο (φύλλα μη ώριμου *C. sativum*) έναντι ορισμένων θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αλλοίωσης τροφίμων (*Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia grimesii*, *Enterobacter agglomerans*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*). Έχει αναφερθεί η ανασταλτική δράση του *C. sativum* σε πιθανά βακτήρια αλλοίωσης, όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Escherichia cloaca*, *Enterococcus faecalis* (Keskin et al., 2011). Η λιναλοόλη, το κύριο συστατικό του ελαίου, το οποίο αναφέρθηκε ότι έχει αντιβακτηριακή δράση έναντι πολλών βακτηριακών στελεχών (Ates et al., 2003), θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την αντιβακτηριακή δράση του κορίανδρου.

Σε έρευνα που έγινε από τους (Raal et al. 2004) η δραστικότητα του αιθέριου ελαίου κορίανδρου ήταν υψηλότερη από τη δραστικότητα του κύριου συστατικού του, της λιναλοόλης. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιήθηκαν κλάσματα που ελήφθηκαν με κλασματική απόσταξη αιθέριου ελαίου κορίανδρου, το κλάσμα που ήταν λιγότερο ισχυρό αλλά αποτελεσματικό έναντι των ελεγχόμενων μικροοργανισμών ήταν αυτό που περιείχε περισσότερη συγκέντρωση λιναλοόλης. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιμέρους συστατικών του ελαίου που οδηγούν σε μία καθολική δραστηριότητα και όχι μόνο στη δράση της λιναλοόλης, όπως θα μπορούσε να αναμένεται. Τα στελέχη *S. aureus* που παρεμποδίστηκαν από το έλαιο κορίανδρου δεν βρέθηκαν να είναι σε θέση να αναπαραχθούν σε νέο μέσο καλλιέργειας, υποδεικνύοντας ότι το έλαιο διαθέτει βακτηριοκτόνο δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, γενικά, τα Gram-θετικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα από τα Gram-αρνητικά βακτήρια παρουσία του έλαιου του κορίανδρου. Η πλανταρικήνη *C. sativum*, ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο που περιέχει 26 αμινοξέα, απομονωμένο από εκχύλισμα φύλλων COL άσκησε αντιμικροβιακή δράση έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που εμφανίζουν τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) 71,55 και 86,4 mg/mL, αντίστοιχα για τα βακτήρια *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa*, καθώς και για Gram θετικά (MIC 35,2 mg/mL για το *S. aureus*) βακτήρια (Zare-Shehneh et al., 2004). Οι Nanasombat et al. (2005) κατέδειξαν την ανασταλτική δράση του ΕΟ *C. sativum* έναντι 25 βακτηριακών στελεχών (20 ορότυποι σαλμονέλας και 5 είδη άλλων εντεροβακτηρίων: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* και *Serratia marcescens* παρουσιάζοντας MIC 4,2 µL/mL στα περισσότερα βακτηριακά στελέχη. Στα ιχθυηρά όπως και στα προϊόντα με βάση το κρέας, η υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά μειώνει την αποτελεσματικότητα των αιθερίων ελαίων. Η χρήση των αιθερίων ελαίων που προστέθηκαν σε εδώδιμη μεμβράνη, σε συσκευασίες MAP ή κενού προτάθηκαν για τη βελτίωση της διάρκειας ζωής των ιχθυηρών. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σαρδέλες αποδείχτηκε ότι η προσθήκη αλατιού όπως επίσης και αιθέριου ελαίου λεμονιού μείωσε τις συγκεντρώσεις σχεδόν όλων των μικροβιακών ομάδων. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου προκάλεσε τη μείωση των εντεροβακτηρίων όπως επίσης και του σταφυλόκοκκου σε μία μεγάλη τάξη μεγέθους (Romeilah et al., 2010).

Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Το αντιοξειδωτικό προφίλ του εκχυλίσματος σπόρων *C. sativum* (mg/g ξηρού βάρους), σύμφωνα με τη μελέτη των **Anita et al. (2014)**, περιλαμβάνει: οξειδωμένο ασκορβικό (0,15 mg/g ξηρού βάρους), ανηγμένο ασκορβικό (0,136 mg/g ξηρού βάρους), ολικό ασκορβικό (0,287 mg/g ξηρού βάρους), ριβοφλαβίνη (0,0046 mg/g ξηρού βάρους), τοκοφερόλη (0,181 mg/g ξηρού βάρους), ολική πολυφαινόλη (18,7 mg/g ξηρού βάρους), γαλλικό οξύ (0,173 mg/g ξηρού βάρους), καφεϊκό οξύ (0,08 mg/g ξηρού βάρους), ελλαγικό οξύ (0,162 mg/g ξηρού βάρους), κουερσετίνη (0,608 mg/g ξηρού βάρους), καμφερόλη (0,233 mg/g ξηρού βάρους).

Τα φύλλα του *C. sativum* είναι επίσης πλούσια σε πολυφαινόλες, καροτενοειδή και ΕΟ όπως η λιναλοόλη. Ο φρέσκος χυμός φύλλων *C. sativum* που περιέχει φλαβονοειδή (μια σημαντική κατηγορία φαινολικών ενώσεων με χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό) έχει υψηλές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες λόγω της ικανότητάς του να δεσμεύει ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου, υψηλή αναγωγική δύναμη και προστασία από βιολογικές μακρομοριακές οξειδωτικές βλάβες με αύξηση του επιπέδου της γλουταθειόνης (**Panjwani et al., 2010, Mandal et al., 2015**).

1.6.3.2 Αιθέριο Έλαιο Δυόσμου

Η μέντα είναι ένα από τα σημαντικότερα εμπορικά βότανα που καλλιεργούνται στην Ευρώπη και τη Δυτική Ασία (**Brahmi et al., 2017**). Οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τις ιδιότητές της είναι κυρίως τερπενοειδή όπως μενθόλη και μενθόνη, ακολουθούμενες από 1,8-κινεόλη, καρβόνη, οξικό λιναλύλιο και λιναλοόλη (**Prakash et al., 2016**). Μέσα σε αυτό το γένος, αξίζει να σημειωθεί το *Mentha suaveolens*, το οποίο συνδέεται με την ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων (**Oumzil et al., 2002**). Οι **Ed-Dra et al. (2018)** αποδεικνύουν την αντιμικροβιακή του δράση κατά τη διάρκεια ζωής των φρέσκων λουκάνικων γαλοπούλας. Δοκιμή *in vitro* επιβεβαίωσε αναλογική επίδραση αυτού του ΕΟ στη ζώνη διαμέτρου των *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus faecalis*. Επιπλέον, καθώς η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση αυξάνεται, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα αναστολής, έως και 26,5% και 42,4% για το *Escherichia coli* και τον *Staphylococcus aureus*, αντίστοιχα (**Pateiro et al., 2021**).

1.7. ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ - ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΡΕΣΚΟΤΗΤΑΣ/ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ

Τα ψάρια είναι από τα πλέον ευπαθή τρόφιμα. Οι πτητικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές ιδιότητες των ιχθύων επηρεάζουν την εκτίμηση της ποιότητας τους και γίνονται άμεσα αντιληπτές από τους καταναλωτές, επηρεάζοντας την προτίμησή τους.

Κύρια πηγή ενώσεων αρώματος είναι η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs). Συγκεκριμένα, το άρωμα του φρέσκου ψαριού αποτελείται από πτητικές ενώσεις που οφείλονται στην ενζυμική οξείδωση των PUFAs, ενώ κατά τις συνθήκες συντήρησης σε ψύξη ο σχηματισμός πτητικών ενώσεων γίνεται με χημική και ενζυμική οξείδωση (**Serot et al., 2002**). Πολλά πτητικά προϊόντα οξείδωσης, παράγονται από την οξείδωση των ω-3 λιπαρών οξέων τα οποία αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις γίνονται αντιληπτά από τα ανθρώπινα αισθητήρια όργανα και θεωρούνται επιζήμια για την υγεία.

Τα πιο ευπαθή αμινοξέα είναι η τρυπτοφάνη, η ιστιδίνη, η λυσίνη, η κυστεΐνη, η βαλίνη, η σερίνη και η προλίνη, λόγω των δραστικών πλευρικών τους αλυσίδων.

Τα πρόσφατα αλιευμένα θαλάσσια ψάρια περιέχουν χαμηλά επίπεδα πτητικών ενώσεων και είναι σχεδόν άοσμα. Λίγο μετά την αλίευση, η δραστηριότητα της λιποξυγενάσης στο δέρμα και τα βράγχια τόσο των ειδών γλυκού νερού όσο και των θαλάσσιων ειδών (ιριδίζουσα πέστροφα, πέστροφα ποταμού και σαρδέλες) παίζει ρόλο στον σχηματισμό οσμηρών πτητικών ενώσεων, συμβάλλοντας σε πράσινα, ευχάριστα αρώματα ψαριών (**Olafsdottir & Jonsdottir, 2009**). Οι ενώσεις που συμβάλλουν στις χαρακτηριστικές οσμές φυτών, αγγουριών, πεπονιών και μανιταριών είναι ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις και αλκοόλες με έξι, οκτώ ή εννέα άτομα άνθρακα. Οι **Josephson et al. (1984)** συνόψισαν την εμφάνιση πτητικών ενώσεων σε είδη γλυκού και αλμυρού νερού και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι τέσσερις κοινές ενώσεις που βρέθηκαν σε είδη αλμυρού νερού, εξανάλη, 1-οκτεν-3-όλη, 1,5-οκταδιεν-3-όλη και 2,5-οκταδιεν-1-όλη, ήταν υπεύθυνες για τη μέτρια, αμυδρή οσμή των ειδών αλμυρού νερού. Από την άλλη, οι ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις με 9 άτομα C όπως η 2,6-εννεαδιενάλη, οι οποίες έχουν ισχυρές οσμές πράσινου, φυτικού, αγγουριού και πεπονιού, ήταν χαρακτηριστικές για τα ψάρια γλυκού νερού.

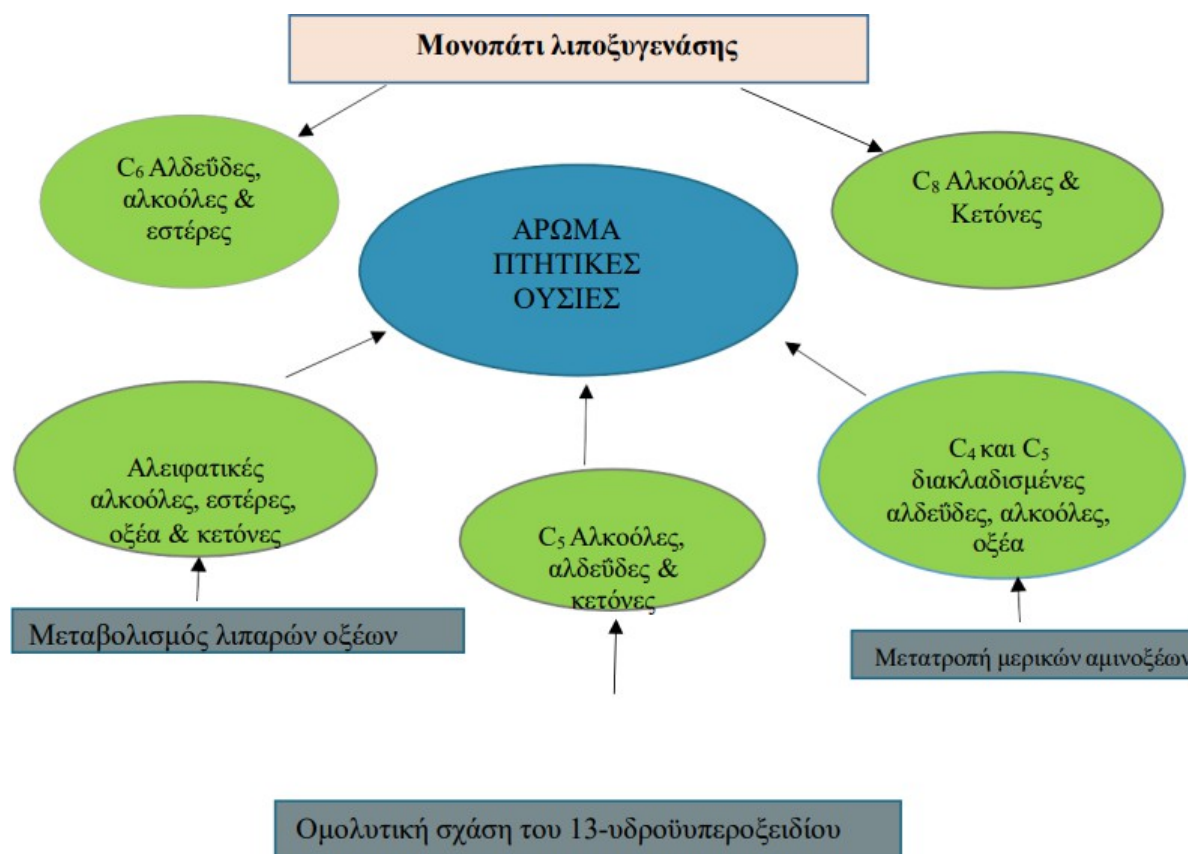
Οι κυριότερες ενώσεις που σχετίζονται με οσμή φρέσκου ψαριού παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Πτητικές ενώσεις που συνεισφέρουν στην οσμή των φρέσκων ψαριών (Olafsdottir & Fleurence et al., 1998)

Κατηγορίες Χημικών Ενώσεων	Χαρακτηριστικές Ενώσεις	Περιγραφή Αρώματος	Κατώφλι Αντίληψης σε υδατικό διάλυμα (μg/kg)
C ₆ -C ₉ αλκοόλες & καρβονυλικές ενώσεις	Εξανάλη/ trans-2-εξανάλη, /1-οκτεν-3-όλη, / 1-οκτεν-3-όνη, 1,5-οκταδιεν-3-όλη, 1,5-οκταδιεν-3-όνη, 2,6-εννεαδιενάλη, 3,6-εννεαδιενάλη	Γρασίδι, σαν αλδεΐδη, Μανιτάρι, Γήινο, μανιτάρι, Γεράνι, Αγγούρι, Αγγούρι, πεπόνι	4,5 – 1,7 10 10 0,001 0,001 10
Βρωμοφαινόλες	2,6-διβρωμοφαινόλη 2,4,6-τριβρωμοφαινόλη 2-βρωμοφαινόλη	Ιώδιο, γαρίδες Θαλασσινά ψάρια, αλμύρα Θάλασσα	 0,0005 0,6
Αζωτούχες κυκλικές ενώσεις	Πυρρολιδίνη, πιπεριδίνη	Γήινα αρώματα	

Κυριότερη αιτία των οσμηρών προϊόντων αποτελούν τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης που προέρχονται από τα υπεροξειδία και είναι αλδεΐδες, κετόνες και αλκοόλες, καθώς επίσης αλκάνια, οξέα, αλκένια και εστέρες (Serfert et al., 2010, Schindler et al., 2010, Veberg et al., 2006).

Οι κύριες αντιδράσεις σχηματισμού πτητικών ενώσεων φαίνονται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Κύριες αντιδράσεις σχηματισμού πτητικών ενώσεων στα ψάρια (Olafsdottir & Fleurence et al., 1998)

Η συνολική αντιληπτή οσμή εξαρτάται από το επίπεδο των σημαντικών ενώσεων και τα όρια οσμής τους μαζί με πιθανά συνεργιστικά αποτελέσματα. Ορισμένα συστατικά είναι επιθυμητά σε χαμηλά επίπεδα, αλλά εάν η συγκέντρωσή τους αυξηθεί, μπορεί να συμβάλουν σε δυσάρεστες οσμές (Olafsdottir & Jonsdottir, 2009). Ένα παράδειγμα είναι οι ενζυμικά παραγόμενες αλκοόλες μακράς αλυσίδας και καρβονύλια που παρουσιάζουν χαρακτηριστικές φρέσκες, φυτικές νότες στα φρέσκα ψάρια, αλλά όταν συσσωρεύονται σε υψηλότερα επίπεδα λόγω της αυτοοξειδωσης, συμβάλλουν στις οξειδωμένες και ψαρώδεις οσμές στα μπαγιάτικα ψάρια (Olafsdottir & Jonsdottir, 2009).

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι εποχιακές επιπτώσεις όπως η ωτοκία μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα οσμής των ψαριών. Για παράδειγμα, το πτητικό μοτίβο μεταβάλλεται στον ώριμο σολομό όταν μεταναστεύει από τη θάλασσα για αναπαραγωγή (Olafsdottir & Jonsdottir, 2009).

Διαφορετικές χαρακτηριστικές οσμές αναπτύσσονται σε διάφορα είδη ψαριών κατά την αποθήκευση. Τα λιπαρά είδη (όπως είναι το λαβράκι της παρούσας έρευνας) αναπτύσσουν ταγγισμένη οσμή και γεύση. Πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται από τον μικροβιακό μεταβολισμό και την οξείδωση που συμβάλλουν σε αυτές τις οσμές έχουν αναγνωριστεί με μεθόδους αέριας χρωματογραφίας και προτείνονται ως δείκτες ποιότητας. Μερικές από τις σημαντικές ενώσεις οσμής που έχουν πολύ χαμηλά όρια οσμής είναι συχνά παρούσες σε χαμηλά επίπεδα και αυτά είναι δύσκολο να ανιχνευθούν με αναλυτικές τεχνικές. Ως εκ τούτου, είναι χρήσιμο να παρακολουθείται το συνολικό πρότυπο των πτητικών ενώσεων και να επιλέγονται ενώσεις-δείκτες, οι οποίες υπάρχουν σε υψηλότερα επίπεδα και μπορούν να ποσοτικοποιηθούν (**Olafsdottir & Jonsdottir, 2009**).

Οι οσμές αλλοίωσης στα διατηρημένα με απλή ψύξη ψάρια ποικίλλουν ανάλογα με την κυρίαρχη μικροχλωρίδα στα προϊόντα, η οποία επηρεάζεται κυρίως από τον χειρισμό, την ψύξη, τη συσκευασία και τις συνθήκες θερμοκρασίας κατά την αποθήκευση.

Ένα παράδειγμα του μοτίβου αλλοίωσης των πτητικών ενώσεων σε ψάρια διατηρημένα με απλή ψύξη προέρχεται από μελέτη αποθήκευσης φιλέτων μπακαλιάρου συσκευασμένων σε κουτιά πολυστυρολίου κατά την αποθήκευση με απλή ψύξη (0,5°C) (**Olafsdottir & Jonsdottir, 2009**). Η απώλεια φρεσκάδας των φιλέτων μπακαλιάρου και οι πρώιμες αλλαγές αλλοίωσης σχετίζονταν με τον σχηματισμό κετονών, αλκοολών και αλδεϋδών, συμβάλλοντας στις οσμές γλυκού, ξινού και βύνης. Οι αλλαγές λόγω προχωρημένης αλλοίωσης, η ανάπτυξη οσμών αλλοίωσης και το τέλος της διάρκειας ζωής των φιλέτων μπακαλιάρου την 12η ημέρα αποθήκευσης εξηγούνται από την παρουσία TMA, εστέρων, οξέων και ενώσεων θείου που παράγονται από μικροβιακή αποικοδόμηση συστατικών ψαριών, κυρίως αμινοξέων (**Olafsdottir & Jonsdottir, 2009**). Στον πίνακα 4, παρουσιάζονται οι κύριες πτητικές ενώσεις που παράγονται λόγω βακτηριακής αλλοίωσης και προσδίδουν δυσάρεστη οσμή.

Τέλος στον Πίνακα 5, παρουσιάζονται ορισμένες οσμηρές πτητικές ουσίες που παράγονται κατά την αλλοίωση των ψαριών και δεν υπάγονται στις παραπάνω κατηγορίες.

Πίνακας 4: Πτητικές ενώσεις που παράγονται και προσδίδουν δυσάρεστη οσμή «ψαρίλας», λόγω βακτηριακής αλλοίωσης, με τα αντίστοιχα υποστρώματα (Huss et al., 1995)

Υπόστρωμα	Ενώσεις που παράγονται από βακτηριακή δράση
TMAO	Τριμεθυλαμίνη (TMA)
Κυστεΐνη	Υδρόθειο (H ₂ S)
Μεθειονίνη	Μεθυλο μερκαπτάνη (CH ₃ SH), Διμεθυλοσουλφίδιο (CH ₃) ₂ S
Υδατάνθρακες, γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ, CO ₂ , H ₂ O
Ινοσίνη, μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP)	Υποξανθίνη
Αμινοξέα (Γλυκίνη, σερίνη, λευκίνη)	Εστέρες, κετόνες, αλδεΐδες
Αμινοξέα, Ουρία	Αμμωνία (NH ₃)

Πίνακας 5: Παραδείγματα άλλων πτητικών συστατικών και οσμών που παράγονται κατά την αλλοίωση των ψαριών (Olafsdottir & Fleurence, 1998).

Κατηγορίες Χημικών Ενώσεων	Χαρακτηριστικές Ενώσεις	Περιγραφή Αρώματος	Κατώφλι Αντίληψης σε υδατικό διάλυμα (μg/kg)
Αρωματικές	Φαιναιθυλική αλκοόλη Φαινόλη π-κρεσόλη	Ξερά τριαντάφυλλα Σαν φαινόλη Οσμή στάβλου	2 300
Αζωτούχες κυκλικές ενώσεις	Ινδόλη σκατόλη	Οσμή κοπράνων	
Οξέα	Οξικό οξύ Βουτυρικό οξύ Ισοβουτυρικό οξύ	Ξινό, σάπιο, Φορεμένες κάλτσες	34,2 32,8
Κορεσμένες αλδεΐδες	εξανάλη	Γρασίδι, φυτικό	4,5
Ακόρεστες αλδεΐδες	4-επτενάλη 2,4-επταδιενάλη 2,4,7-δεκατριενάλη	Πατάτα, χαρτόνι Οξειδωμένες οσμές Ψαρίλα Καμμένο, ψαρίλα, μυρουρέλειαο	0,04

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας μεμβρανών πολυγαλακτικού (PLA) ενισχυμένων με αιθέρια έλαια SPR και COL στον χρόνο ζωής φιλέτων λαβρακιού.

Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις, καθώς και προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων των δειγμάτων συναρτήσει του χρόνου συντήρησης.

Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση ANOVA.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Για την παρασκευή των μεμβρανών PLA, 10 g στερεού PLA (αναμείχθηκαν με 100 mL χλωροφορμίου (**Merck 102445, Chloroform for analysis, EMSURE®**) και αφέθηκαν υπό ανάδευση για μία μέρα. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα εγχύθηκε σε γυάλινα τρυβλία Petrie, 12,5 mL στο καθένα και αφέθηκε προς στερεοποίηση στον απαγωγό μία ημέρα. Για την παρασκευή των μεμβρανών PLA με ποσοστό 2% αιθέριων ελαίων SPR και COL, μετά την ανάδευση μίας ημέρας, προστέθηκαν στα εκάστοτε διαλύματα PLA 2 mL του αντίστοιχου αιθέριου ελαίου, αφέθηκαν υπό ανάδευση επιπλέον 2 ώρες και ακολούθησε η ίδια διαδικασία έγχυσης σε γυάλινα τρυβλία Petrie.

2.2. Προετοιμασία Δειγμάτων Λαβρακιού

Τρία κιλά φρέσκο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) προμηθεύθηκαν από ιχθυοπωλείο στην πόλη των Ιωαννίνων. Από τα ψάρια αφαιρέθηκε το κεφάλι και στη συνέχεια φιλεταρίστηκαν με ειδικό νυστέρι κατάλληλο για τρόφιμα το οποίο προηγουμένως αποστειρώθηκε με αιθανόλη. Αμέσως μετά την παραλαβή των ψαριών και πριν τη συσκευασία, δείγμα λαβρακιού λήφθηκε για μικροβιολογική και χημική ανάλυση και για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων (ημέρα 0).

2.3. ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα λαβρακιού χωρίστηκαν σε δείγματα (βάρους περίπου 100g κάθε δείγμα) 4 ομάδων και κάθε ομάδα συσκευάστηκε ως εξής:

1. Το δείγμα λαβρακιού ως είχε σε σακούλα PA-PE (μάρτυρας).
2. Το δείγμα λαβρακιού τοποθετήθηκε ανάμεσα σε 2 μεμβράνες PLA και στη συνέχεια σε σακούλα PA-PE.
3. Το δείγμα λαβρακιού τοποθετήθηκε ανάμεσα σε 2 μεμβράνες PLA με 2% v/v αιθέριου ελαίου SPR και στη συνέχεια σε σακούλα PA-PE.
4. Το δείγμα λαβρακιού τοποθετήθηκε ανάμεσα σε 2 μεμβράνες PLA με 2% v/v αιθέριου ελαίου COL και στη συνέχεια σε σακούλα PA-PE.

Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη (4°C) και οι ημέρες δειγματοληψίας ήταν η 3η, 5η, 6η και 7η. Οι αναλύσεις που έγιναν ήταν μικροβιολογικές, χημικές και προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων.



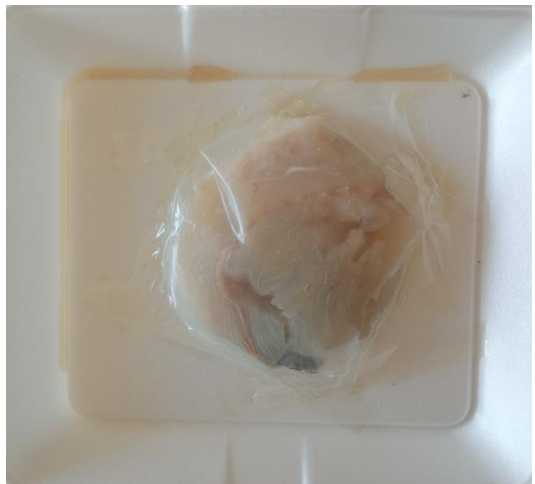
CONTROL



PLA



PLA + 2% SPR



PLA + 2% COL

2.4. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.4.1. Θρεπτικά Υλικά

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ)

Διαδικασία παρασκευής: Σε φιάλη των 1000 mL ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού (**Tryptic Soy Agar, 1.05458.0500, Merck**) και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά και στη συνέχεια μικρή ποσότητα του θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.

Διαδικασία παρασκευής: Σε μια φιάλη των 1000 mL ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 44 g θρεπτικού υλικού (**Thermo Fisher Scientific (Oxoid™) Pseudomonas CFC Agar Base (CM0559)**) και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό κατάλληλο συμπλήρωμα (**Thermo Fisher Scientific (Oxoid™) – CFC Selective Supplement (SR0103)**) ώστε το μέσο να γίνεται επιλεκτικό για *Pseudomonas* spp. Στη συνέχεια μικρή ποσότητα του θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Διαδικασία παρασκευής: Σε μια φιάλη των 1000 mL ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 70 g θρεπτικού υλικού (**Neogen – MRS Agar (NCM0175A)**) και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά και στη συνέχεια μικρή ποσότητα του θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (*H₂S* producing bacteria)

Διαδικασία παρασκευής: Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού για τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο, γίνεται από την αρχή με τα επιμέρους συστατικά του. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν: 1) 20 g πεπτόνης (**Thermo Fisher Scientific (Oxoid™) – Oxoid™ Peptone Bacteriological (LP0037)**) 2) 3 g εκχυλίσματος βόειου κρέατος (**Thermo Fisher Scientific (Oxoid) – Oxoid™ Beef Extract (LP0037)**) 3) 3 g εκχυλίσματος μαγιάς (**Thermo Fisher Scientific (Oxoid™) – Oxoid™ Yeast Extract (LP0021)**) 4) 0,4 g κιτρικού σιδήρου (**Sigma-Aldrich (Millipore Sigma) – Ferric Citrate (F3388)**) 5) 0,3 g θειοθειικού νατρίου (**Merck (Millipore) – Sodium Thiosulfate Pentahydrate (106516)**) 6) 5 g χλωριούχου νατρίου (**Sigma-**

Aldrich (Millipore Sigma) – Sodium Chloride (S7653)) 7) 0,6 g L-κυστεΐνης (**Sigma-Aldrich (Millipore Sigma) – L- cysteine(168149))** 8) 0 g Άγαρ Νο1 (**Neogen – Agar No. 1 (NCM0224)**) 9) στάγδην NaOH 1M μέχρι pH=7,4 σε 1000 mL H₂O. Ανάδευση και θέρμανση μέχρι διαλυτοποίησης όλων. Αποστείρωση στους 121°C για 15 min. Υδατόλουτρο για μισή ώρα στους 50°C.

2.4.2. Δειγματοληψία

Από κάθε δείγμα λαβρακιού, ελήφθη μερίδα 10 g, η οποία μεταφέρθηκε υπό άσηπτες συνθήκες σε σακούλα Stomacher (**Neogen Stomacher® 400 Classic Bags (NCM0020)**) που περιείχε 90 mL αποστειρωμένου buffer νερού πεπτόνης 1 g/L (**Neogen – Buffered Peptone Water (NCM0066A)**) και ακολούθησε ανάδευση- ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε Stomacher 400 σε θερμοκρασία δωματίου.

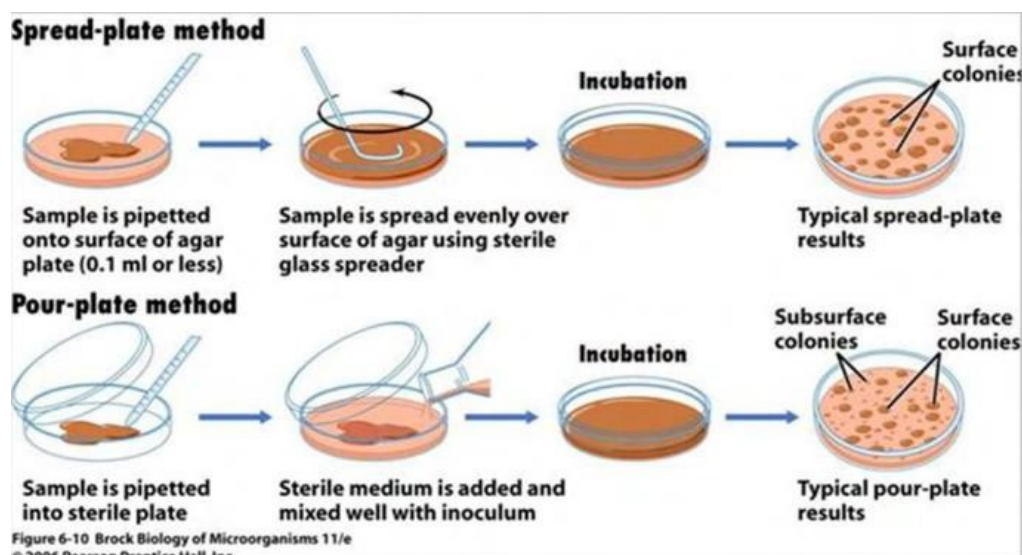
Στη συνέχεια, ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων, με μεταφορά 1 mL από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου (buffer peptone water).

Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος ακολούθησε ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος από κάθε αραιώση στα διαφορετικά μελετώμενα θρεπτικά υποστρώματα (Tryptic Soy Agar, CFC Agar, MRS Agar, Iron Agar) χρησιμοποιώντας 2 διαφορετικές τεχνικές ενοφθαλμισμού, αυτών της επίστρωσης και της ενσωμάτωσης, ανάλογα με το είδος του θρεπτικού υποστρώματος.

Η πρώτη τεχνική, αυτή της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) ακολουθήθηκε για τα θρεπτικά υλικά TSA, και CFC Agar. Εφαρμόζεται, γενικά, στους αερόβιους μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, ποσότητα 0,1 mL από το βακτηριακό εναιώρημα επιστρώνεται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού που έχει τοποθετηθεί σε τρυβλία Petri με την βοήθεια ειδικής ράβδου επίστρωσης. Έπειτα από επώαση αυτών στην κατάλληλη θερμοκρασία και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, οι αποικίες που εμφανίζονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μετρούνται.

Η δεύτερη τεχνική, αυτής της ενσωμάτωσης (pour plate technique) ακολουθήθηκε για τα θρεπτικά υλικά Iron Agar και LAB. Αρχικά, εμβολιάζεται στο τρυβλίο 1 mL από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος και κατόπιν προστίθεται το τηγμένο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια ακολουθεί προσεκτική ανάδευση με κυκλική κίνηση για ανάμιξη του βακτηριακού

εναιωρήματος με το θρεπτικό υλικό και αφού το θρεπτικό υλικό έχει πλέον στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς. Έπειτα από επώαση αυτών στην κατάλληλη θερμοκρασία και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, οι αποικίες που εμφανίζονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μετρούνται.



Εικόνα 7: Διαδικασίες επίστρωσης και ενσωμάτωσης των βακτηριακών αιωρημάτων στα θρεπτικά υλικά

Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών

Αφού προηγήθηκε η επώαση των δειγμάτων στα διάφορα θρεπτικά υλικά που στοχεύουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς βακτηρίων το καθένα, ακολούθησε η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών.

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- α) η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ) σε θρεπτικό υλικό TSA (Tryptone Soy Agar) ύστερα από επώαση των τρυβλίων σε θερμοκρασία των 30 °C για χρονικό διάστημα 48 έως 72 h,
- β) τα βακτήρια που παράγουν H₂S στο θρεπτικό μέσο IA (Iron Agar), με απαρίθμηση μόνο των μαύρων αποικιών, έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 48 έως 72 h,
- γ) τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. σε θρεπτικό υλικό CFC (Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine agar) με καταμέτρηση των αποικιών, ύστερα από επώαση στους 30 °C για 48 h και

δ) Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) σε θρεπτικό μέσο με καταμέτρηση των αποικιών κίτρινου χρώματος, μετά από επώαση στους 30 °C για 48 έως 72 h.

2.5. Φυσικοχημικές Αναλύσεις

2.5.1. Μέτρηση pH

Δείγμα 10 g σάρκας ψαριού ομογενοποιήθηκε με 100 mL απεσταγμένου νερού και το μείγμα διηθήθηκε. Το pH του διηθήματος μετρήθηκε χρησιμοποιώντας pH-μετρο (μοντέλο **CRISON 507**, **CRISON INSTRUMENTS**, Βαρκελώνη, Ισπανία).

2.5.2. Προσδιορισμός Πτητικού Αζώτου (TVBN)

Αντιδραστήρια:

1. Διάλυμα υδροχλωρίου (HCl 0,1 N). Παρασκευάστηκε με αρραίωση του πυκνού δ/τος 37% HCl (**Merck 100314**, **Hydrochloric acid 37%**)
2. Διάλυμα βορικού οξέος (**Merck 100162**, H_3BO_3), 3%. Διαλύθηκαν 3 gr βορικού οξέος σε 100 mL απεσταγμένου νερού.
3. Δείκτης. Παρασκευάστηκαν αλκοολικά διαλύματα 0,2% ερυθρού του μεθυλίου (**Merck 106076**, **Methyl red**) και 0,2% μπλε του μεθυλενίου (**Merck 159270**, **Methylene blue**) με διάλυση 0,2 g της κάθε ουσίας σε 100 mL απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης (**Merck 100983**, **Absolute Ethanol**). Στη συνέχεια αναμίχθηκαν 1/1 μέρη των δύο δεικτών ώστε να ληφθεί το τελικό διάλυμα του δείκτη.
4. Αντιαφριστικό διάλυμα silicon oil.

Πειραματική Πορεία

10 g ψιλοκομμένου δείγματος λαβρακιού αναμινύονται με 50 mL απεσταγμένου νερού.

Το μίγμα μεταφέρθηκε με 200mL απεσταγμένου H_2O σε μία σφαιρική φιάλη των 500mL και ακολούθησε απόσταξη μετά την προσθήκη 2g MgO και μίας σταγόνας σιλικόνης για να αποφευχθεί το άφρισμα.

Μία κωνική φιάλη/ ογκομετρικός κύλινδρος που περιείχε 25 mL 3% H_3BO_3 και 0,04 mL του μίγματος των δεικτών για την τιτλοδότηση της NH_3 χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη του αποστάγματος.

Η απόσταξη συνεχίστηκε μέχρι τελικό όγκο αποστάγματος ίσο με 125 mL. Το διάλυμα βορικού οξέος έγινε πράσινο όταν έγινε αλκαλικό από το απεσταγμένο ολικό βασικό πτητικό άζωτο (TVBN).

Αυτό τιτλοδοτήθηκε με ένα διάλυμα 0,1 N HCl. Πλήρης εξουδετέρωση έγινε όταν το χρώμα του αποστάγματος έγινε ρόζ με την προσθήκη μιας σταγόνας HCl.

Η ποσότητα του TVBN σε mg/ 100 gr ψαριού υπολογίζεται από τον όγκο (V) σε mL του HCl 0,1 N που προστέθηκε και από τη συγκέντρωσή του βάσει του τύπου:

$$\% \text{mg TVBN} = C \times V \times 14 \times 100 / 10$$

όπου C=συγκέντρωση HCl=0,1N, V=όγκος HCl σε mL, Ar N=14, 100=g ψαριού, 10= g δείγματος λαβρακιού

2.5.3. Προσδιορισμός Τριμεθυλαμίνης (TMA)

Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα HCl 0,05 N. Παρασκευάστηκε με αραιώση του πυκνού διαλύματος HCl 37% (**Merck 100314 ,Hydrochloric acid 37%**)
2. Διάλυμα βορικού οξέος (**Merck 100162,H₃BO₃**), 3%. Διαλύθηκαν 3 g βορικού οξέος σε 100 mL απεσταγμένου νερού.
3. Δείκτης. Παρασκευάστηκαν αλκοολικά διαλύματα 0,2% ερυθρού του μεθυλίου (**Merck 106076, Methyl red**) και 0,2% μπλέ του μεθυλενίου (**Merck 159270, Methylene blue**) με διάλυση 0,2 g της κάθε ουσίας σε 100 mL απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν 1/1 μέρη των 2 δεικτών για να ληφθεί το τελικό διάλυμα δείκτη.
4. Αντιαφριστικό διάλυμα silicon oil.
5. Διάλυμα φορμαλδεΰδης 20%. Παρασκευάστηκε με αραιώση του πυκνού διαλύματος φορμαλδεΰδης 37% (**Merck 100496, formaldehyde 37%**)

Πειραματική πορεία

50 g ψιλοκομμένου δείγματος λαβρακιού αναμιγνύονται με 50 mL απεσταγμένου νερού.

Το μίγμα μεταφέρθηκε με 15 mL απεσταγμένου σε μία σφαιρική φιάλη και ακολούθησε απόσταξη μετά την προσθήκη 10 g MgO (**Merck 105865, Magnesium Oxide**), 50 mL 20% φορμαλδεΰδης και 5 σταγόνων σιλικόνης για να αποφευχθεί το άφρισμα. Η προσθήκη της φορμαλδεΰδης στην φιάλη απόσταξης χρησιμοποιείται για να παρεμποδίσει τις πρωτογενείς και δευτερογενείς αμίνες από το να αντιδράσουν με το βορικό οξύ 3% που

περιέχεται στην κωνική φιάλη συλλογής του αποστάγματος , ενώ αντιδρούν μόνο οι τριτοταγείς αμίνες.

Μία κωνική φιάλη/ ογκομετρικός κύλινδρος που περιείχε 12,5 mL 3% H_3BO_3 και 0,02 mL του μίγματος των δεικτών για την τιτλοδότηση της NH_3 χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη του αποστάγματος.

Η απόσταξη συνεχίστηκε μέχρι τελικό όγκο αποστάγματος ίσο με 75 mL. Το διάλυμα βορικού οξέος έγινε μπλε-πράσινο όταν έγινε αλκαλικό από την απεσταγμένη Τριμεθυλαμίνη (TMA). Το απόσταγμα (TMA) ογκομετρήθηκε με διάλυμα HCl 0,05 N. Το ισοδύναμο σημείο (πλήρης εξουδετέρωση) προσδιορίστηκε όταν προσθήκη μιας σταγόνας HCl οδήγησε σε ροζ χρωματισμό του διαλύματος.

Η ποσότητα του TMAN σε mg/ 100 g ψαριού υπολογίστηκε από τον όγκο (V) σε mL του HCl 0,05 N που προστέθηκε και από τη συγκέντρωσή του βάσει του τύπου:

$$\% \text{mg TMAN} = C \times V \times 14 \times 100 / 50$$

όπου C=συγκέντρωση HCl =0,05N, V=όγκος HCl σε mL, Ar N=14, 100=ποσοστό %, 50=g δείγματος λαβρακιού.

2.5.4. Προσδιορισμός Θειοβαρβιτουρικού Οξέος (TBA)

Αντιδραστήρια

1. Θειοβαρβιτουρικό οξύ (**Merck 108180, Theiobarbituric Acid**). Διάλυση 0,67 g TBA σε ποτήρι ζέσεως των 100mL προσθέτοντας 90mL H_2O και τοποθετώντας το σε υδατόλουτρο των 80°C . Έπειτα το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τη χαραγή.
2. Οξικό οξύ (**Merck 100063, CH_3COOH 100%**).
3. Τετραχλωράνθρακας (**Sigma Aldrich 32204, CCl_4**)
4. Παρασκευάζεται διάλυμα με την ανάμειξη ίσων όγκων διαλύματος TBA και οξικού οξέος 100%. Το διάλυμα αυτό (διάλυμα 1 TBA) είναι το διάλυμα εργασίας.

Πειραματική πορεία

3 g ψιλοκομμένου δείγματος ομογενοποιήθηκαν με λίγες σταγόνες ασκορβικού οξέος σε γουδί. Στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο ψάρι προστέθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100mL, με 20 mL από το διάλυμα 1 TBA και 6 mL διαλύματος CCl_4 .Έντονη ανακίνηση του μίγματος για 10 sec.

Στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3100 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία 18- 20°C. Έπειτα διηθήθηκε με χαρτί Whatman no 1 σε ηθμό Buchner υπό κενό. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με πώμα και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 80°C. Στη συνέχεια, μετά από ψύξη του σωλήνα σε νερό βρύσης, μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος στα 532 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα 1 TBA.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg μηλονικής διαλδεΐδης/ kg ψαριού.

Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο εξής:

$$7,8 * Abs = \text{mg μηλονικής διαλδεΐδης/ kg ψαριού}$$

Όπου Abs= η απορρόφηση στα 532 nm

2.6 Προσδιορισμός Πτητικών Συστατικών

Υλικά και σκεύη- Όργανα

- Σπάτουλα
- Γυάλινα φιαλίδια όγκου 20 mL, με διάτρητα πώματα που φέρουν παρεμβύσματα τεφλόν
 - 1να SPME DVB/CAR/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
 - Αναλυτικός ζυγός
 - Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- Αέριος χρωματογράφος GC-MS Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας Agilent 5973 C.



Εικόνα 8: Φιαλίδια (Vials): με πώμα διάτρητο και παρέμβυσμα από τεφλόν



Εικόνα 9: Συσκευή SPME (Agilent technologies) με ίνα SPME

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό του πτητικού προφίλ των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Μικροεκχύλισης δια στερεάς φάσης σε συνδυασμό με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας (SPME/GC-MS).

Αρχικά 4g δείγματος (φιλέτο λαβρακιού) μαζί με 20 μL εσωτερικού προτύπου (**4-methyl-2-pentanol**, 800 ppb) τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο 20mL και σφραγίστηκε αεροστεγώς με διάτρητο πώμα αλουμινίου το οποίο είχε διάφραγμα PTFE/σιλικόνης. Το φιαλίδιο στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 50°C σε υδατόλουτρο για 15 min για επίτευξη ισορροπίας και στη συνέχεια έγινε έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος για άλλα 15 min. Η θύρα έγχυσης του αέριου χρωματογράφου ήταν εξοπλισμένη με liner 0,75 mm i.d, (Supelco, Bellefonte, PA, USA) κατάλληλο για ανάλυση SPME σε λειτουργία split (λόγος split 2:1) τους 250°C. Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη DB-5MS (60m $\times$ 0,32mm $\times$ 1 μm , Agilent Santa Clara, USA). Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με ρυθμό ροής 1,5 mL/min. Η θερμοκρασία του φούρνου διατηρήθηκε τους 40° C για 5 λεπτά, ακολούθησε αύξηση της θερμοκρασίας με ένα ρυθμό 5°C/min έως τους 150°C και τέλος αύξηση έως τους 260°C με ρυθμό 10°C/min όπου διατηρήθηκε για 5 λεπτά. Η θερμοκρασία διεπαφής (γραμμή μεταφοράς) ρυθμίστηκε τους 280°C. Το εύρος σάρωσης μαζών ήταν 29–350 m/z. Η θερμοκρασία της πηγής MS και τετραπόλου ήταν 230 και 150°C, αντίστοιχα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν (n=2). Η ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων έγινε με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης Wiley 7-NIST 05.

2.7 Στατιστική Ανάλυση

Η πειραματική διάταξη (παραγωγή μεμβρανών και εφαρμογή τους σε δείγματα λαβρακιού) επαναλήφθηκε εις διπλούν (n=2 $\times$ 2=4).

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των δεδομένων από τις αναλύσεις – μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν (μικροβιολογικές, φυσικοχημικές και πτητικά).

Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) και του τεστ πολλαπλής εμβέλειας Tukey, το οποίο εξετάζει τις διαφορές των μέσων όρων. Η στατιστική ανάλυση μελετά την εξέλιξη της κάθε επεξεργασίας ανά ημέρα καθώς και σε κάθε ημέρα πώς επηρεάζεται από κάθε μορφή συσκευασίας.

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του λογισμικού στατιστικού πακέτου SPSS έκδοση 25.0 Statistics (IBM, Armonk, NY, USA). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $p = 0,05$.

- Για $p < 0,05$, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των δεδομένων των μεταχειρίσεων.
- Για $p > 0,05$, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των δεδομένων των μεταχειρίσεων. Τα μικροβιολογικά δεδομένα μετατράπηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους των σχηματισμένων αποικιών (cfu/g).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Μελετήθηκε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο (π.χ *Shewanella putrefaciens*) και των γαλακτικών βακτηρίων (L.A.B) κατά την αλλοίωση των φιλέτων λαβρακιού στους μελετώμενους τύπους συσκευασίας. Η δυναμική των πληθυσμών των μικροοργανισμών αυτών και η συμβολή τους στην τελική μικροχλωρίδα, επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος της συσκευασίας. Τα δεδομένα της εξέλιξης της ενδογενούς μικροχλωρίδας του φιλέτου λαβρακιού κατά τη συντήρησή του σε ψύξη παρουσιάζονται στους πίνακες . Όπως αντιλαμβανόμαστε από αυτούς τους πίνακες, κατά την αλλοίωση του φιλέτου λαβρακιού, την κυρίαρχη μικροχλωρίδα σε όλες τις διαφορετικές συσκευασίες αποτέλεσαν η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, οι *Pseudomonas* spp. και τα H_2S producing bacteria, ενώ τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) αναπτύχθηκαν σε μικρότερο βαθμό.

3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ)

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) και πως αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ) κυμαίνεται από 3,60-8,33 log cfu /g και σύμφωνα με τα δεδομένα επηρεάζεται από την παρουσία των αιθέριων ελαίων αλλά και από τις ημέρες συντήρησης. Στο Γράφημα 1 δίνεται σχηματικά η επίδραση του χρόνου και του είδους της συσκευασίας στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, παράγοντες στατιστικά πολύ σημαντικοί για την τιμή της ΟΜΧ.

Η αρχική τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ), ήταν 3,60 log cfu/g και αποτελεί ένδειξη καλής μικροβιολογικής ποιότητας. Σύμφωνα με την ICMFS (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), η τιμή των 7 log cfu/g, αποτελεί το μέγιστο αποδεκτό όριο.

Το μέγιστο αποδεκτό όριο στη συγκεκριμένη μελέτη, για τα δείγματα μάρτυρες ξεπεράστηκε την 6η ημέρα δειγματοληψίας (7,46 log cfu/g) όπως και στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε μεμβράνες PLA (7,27 log cfu/g).

Πίνακας 6: Μεταβολή των τιμών της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (log cfu/g) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

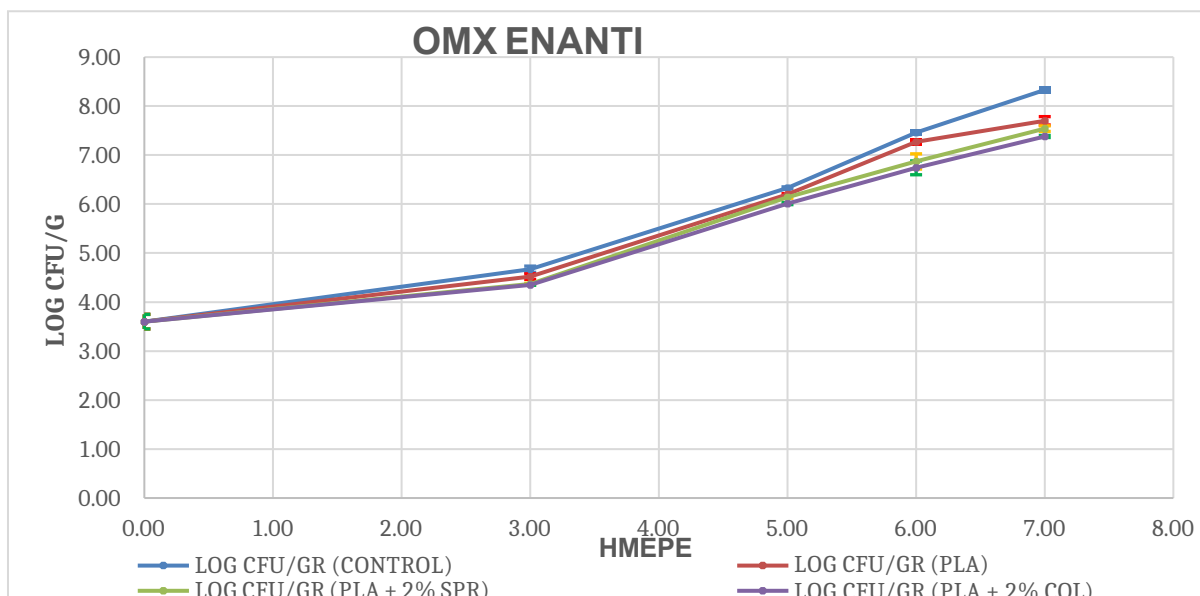
Συσκευασία	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ)				
	Χρόνος (Ημέρα)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρας	3,60±0,15 ^{Aa}	4,67±0,06 ^{bA}	6,33±0,01 ^{cB}	7,46±0,04 ^{cC}	8,33±0,04 ^{cD}
PLA	3,60±0,15 ^{Aa}	4,52±0,06 ^{abA}	6,20±0,01 ^{bB}	7,27±0,03 ^{bcC}	7,70±0,08 ^{bD}
PLA+ 2% SPR	3,60±0,15 ^{Aa}	4,37±0,01 ^{aA}	6,14±0,02 ^{bB}	6,87±0,16 ^{abC}	7,54±0,06 ^{abD}
Pla + 2% COL	3,60±0,15 ^{Aa}	4,35±0,01 ^{aA}	6,01±0,02 ^{aB}	6,74±0,14 ^{aC}	7,38±0,01 ^{aD}

a,b,c... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών ($p < 0,05$)
A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας ($p < 0,05$)

Στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε μεμβράνες PLA + 2% A.E. SPR και σε PLA + 2% A.E. COL εμφανίζεται σημαντική αντιμικροβιακή δράση, ξεπερνώντας το μέγιστο αποδεκτό όριο την 7η ημέρα (7,54 και 7,38 αντίστοιχα).

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται από τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (A,B,C...), η OMX επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από τον χρόνο της συντήρησης, ανεξάρτητα από τον μελετώμενο τύπο συσκευασίας.

Όσον αφορά το είδος της συσκευασίας, οι εκθέτες στατιστικής διαφοράς (a,b,c,...), αποδεικνύουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συσκευασίες μεμβρανών με A.E. και αυτές που δεν έχουν, δηλαδή τους μάρτυρες και τις συσκευασίες με μεμβράνη PLA, για τις περισσότερες ημέρες δειγματοληψίας.



Γράφημα 1: Μεταβολή ολικής μεσόφιλης χλωρίδας κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτων λαβρακιού σε διαφορετικούς τύπους μεμβρανών

Στην περίπτωση της συσκευασίας με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με Α.Ε. COL , στατιστική σημαντική διαφορά υπάρχει σε όλες τις ημέρες δειγματοληψίας ενώ στην αντίστοιχη συσκευασία με α.ε SPR, παρατηρείται στατιστική διαφορά την κρίσιμη 6 η ημέρα δειγματοληψίας, όπου οι συσκευασίες μάρτυρες και αυτές με PLA, ξεπερνούν το επιτρεπτό όριο των 7 log cfu/g.

Τέλος, ανάμεσα στις συσκευασίες με τα δύο διαφορετικά Α.Ε., φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά από την 3^η ημέρα δειγματοληψίας και μετά. Οι συσκευασίες που περιέχουν Α.Ε. COL , εμφανίζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Ως γενικό συμπέρασμα, η συσκευασία με PLA και 2% αιθέριο έλαιο COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από όλες τις μελετώμενες συσκευασίες.

3.1.2. *Pseudomonas Spp.*

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *Pseudomonas spp.* και πώς αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Η *Pseudomonas spp.* κυμαίνεται από 2,97-5,95 log cfu /g και σύμφωνα με τα δεδομένα επηρεάζεται από την παρουσία των αιθέριων ελαίων αλλά και από τις ημέρες συντήρησης.

Στο Γράφημα 2 δίνεται σχηματικά η επίδραση του χρόνου και του είδους της συσκευασίας στην *Pseudomonas* spp., παράγοντες στατιστικά πολύ σημαντικοί για την τιμή της. Αυτό που εύκολα διαπιστώνεται, είναι ότι ακολουθήθηκε παρόμοια πορεία με αυτή της Ο.Μ.Χ.

Η αρχική τιμή της *Pseudomonas* ξεκίνησε στα 2,97 log cfu/g και έφτασε στη μέγιστη τιμή της την 7^η ημέρα δειγματοληψίας τα 5,95 log cfu/g στον μάρτυρα, ενώ στις υπόλοιπες συσκευασίες έφτασε σε χαμηλότερα επίπεδα (5,73, 5,60, 5,30 για τις συσκευασίες PLA, PLA+ 2% SPR, PLA + 2% COL αντίστοιχα).

Αντιμικροβιακή δραστηριότητα και καταστολή της *Pseudomonas* εμφανίζουν και οι συσκευασίες με Α.Ε. SPR και αυτές με Α.Ε. COL. Είναι φανερό όμως, ότι η συσκευασία με PLA και 2% Α.Ε. COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.

Πίνακας 7: Μεταβολή των τιμών της *Pseudomonas* spp. (log cfu/g) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

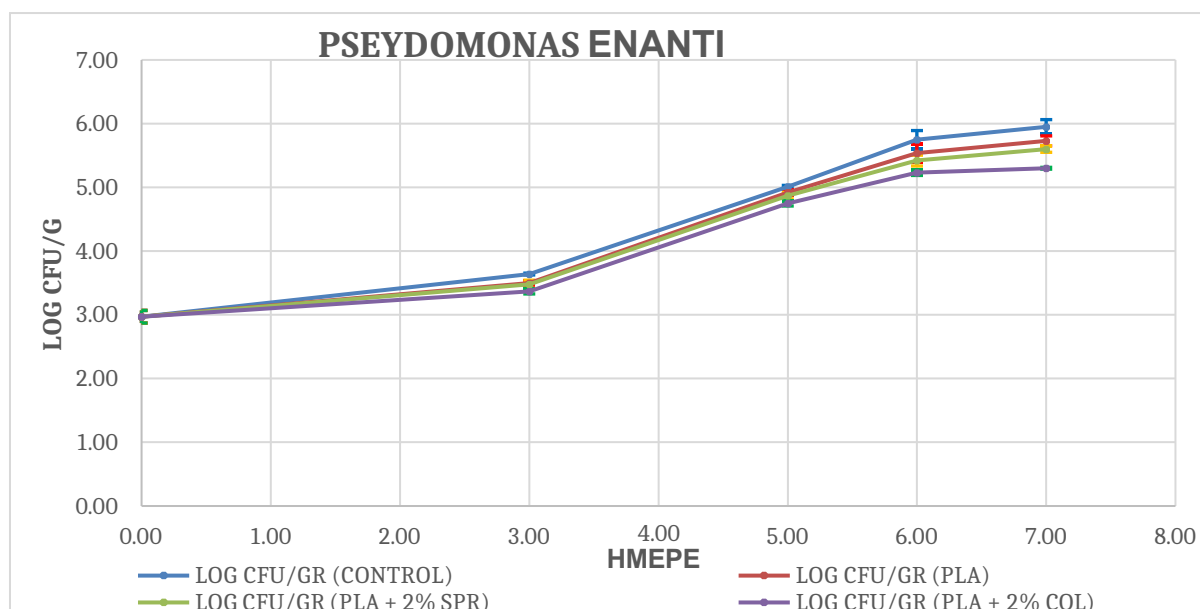
Συσκευασία	<i>Pseudomonas</i> spp.				
	Χρόνος (Ημέρα)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρα	2,97±0,10 ^{Aa}	3,64±0,01 ^{bA}	5,01±0,02 ^{bB}	5,75±0,14 ^{bc}	5,95±0,11 ^{cc}
PLA	2,97±0,10 ^{Aa}	3,50±0,04 ^{abA}	4,92±0,04 ^{abB}	5,54±0,13 ^{abC}	5,73±0,08 ^{bcC}
PLA + 2% SPR	2,97±0,10 ^{Aa}	3,48±0,06 ^{abA}	4,87±0,05 ^{abB}	5,42±0,08 ^{abC}	5,60±0,05 ^{abC}
PLA + 2% COL	2,97±0,10 ^{aA}	3,37±0,04 ^{aA}	4,75±0,04 ^{aB}	5,23±0,04 ^{aC}	5,30±0,01 ^{aC}

a,b,c... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών (p< 0,05)

A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας (p< 0,05)

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται από τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (A,B,C...), η *Pseudomonas* επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από τον χρόνο της συντήρησης, ανεξάρτητα από τον μελετώμενο τύπο συσκευασίας. Εξαίρεση αποτελεί το διάστημα μεταξύ των ημερών 6-7, διάστημα όμως που έχει προκληθεί η αλλοίωση του δείγματος μάρτυρα (control).

Όσον αφορά το είδος της συσκευασίας, οι εκθέτες στατιστικής διαφοράς (a,b,c,...), αποδεικνύουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συσκευασίες μεμβρανών με Α.Ε. και αυτές που δεν έχουν, δηλαδή τους μάρτυρες και τις συσκευασίες με μεμβράνη PLA, για τις περισσότερες ημέρες δειγματοληψίας.



Γράφημα 2: Μεταβολή των τιμών των *Pseudomonas* spp. (log cfu/g) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Στην περίπτωση της συσκευασίας με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με Α.Ε. COL, στατιστική σημαντική διαφορά υπάρχει σε όλες τις ημέρες δειγματοληψίας ενώ στην αντίστοιχη συσκευασία με Α.Ε. SPR, παρατηρείται στατιστική διαφορά, όχι όμως τόσο σημαντική.

Τέλος, ανάμεσα στις συσκευασίες με τα δύο διαφορετικά αιθέρια έλαια, φαίνεται ότι υπάρχει στατιστική διαφορά από την 3^η ημέρα δειγματοληψίας και μετά. Οι συσκευασίες που περιέχουν A.E. COL, εμφανίζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Ως γενικό συμπέρασμα, η συσκευασία με PLA και 2% αιθέριο έλαιο COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από όλες τις μελετώμενες συσκευασίες.

3.1.3. Βακτήρια που παράγουν H₂S (υδροθειούχα)

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βακτηρίων που παράγουν H₂S, και πώς αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Τα βακτήρια που παράγουν H₂S, κυμαίνονται από 1,90-5,03 log cfu /g και σύμφωνα με τα δεδομένα επηρεάζονται από την παρουσία των αιθέρων ελαίων αλλά και από τις ημέρες συντήρησης.

Στο Γράφημα 3 δίνεται σχηματικά η επίδραση του χρόνου και του είδους της συσκευασίας στα βακτήρια που παράγουν H₂S, παράγοντες στατιστικά πολύ σημαντικοί για την τιμή της. Η αρχική τιμή των βακτηρίων που παράγουν H₂S, ξεκίνησε στα 1,90 log cfu/g και έφτασε στη μέγιστη τιμή της την 7^η ημέρα δειγματοληψίας τα 5,03 log cfu/g στον μάρτυρα, ενώ στις υπόλοιπες συσκευασίες έφτασε σε χαμηλότερα επίπεδα (4,89, 4,73, 4,36 για τις συσκευασίες PLA, PLA+ 2% SPR, PLA + 2% COL αντίστοιχα).

Αντιμικροβιακή δραστηριότητα και καταστολή των βακτηρίων που παράγουν H₂S εμφανίζουν και οι συσκευασίες με A.E. SPR και αυτές με A.E. COL. Είναι φανερό όμως, ότι η συσκευασία με PLA και 2% A.E. COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται από τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (A,B,C...), η *Pseudomonas* επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από τον χρόνο της συντήρησης, ιδίως τις πρώτες ημέρες δειγματοληψίας, ανεξάρτητα από τον μελετώμενο τύπο συσκευασίας. Η μεγάλη ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρατηρείται στο μεσοδιάστημα μεταξύ 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας δειγματοληψίας, ενώ στη συνέχεια ο αριθμός των μικροοργανισμών σταθεροποιείται τις ημέρες 5, 6, 7 για όλους τους μελετώμενους τύπους συσκευασίας.

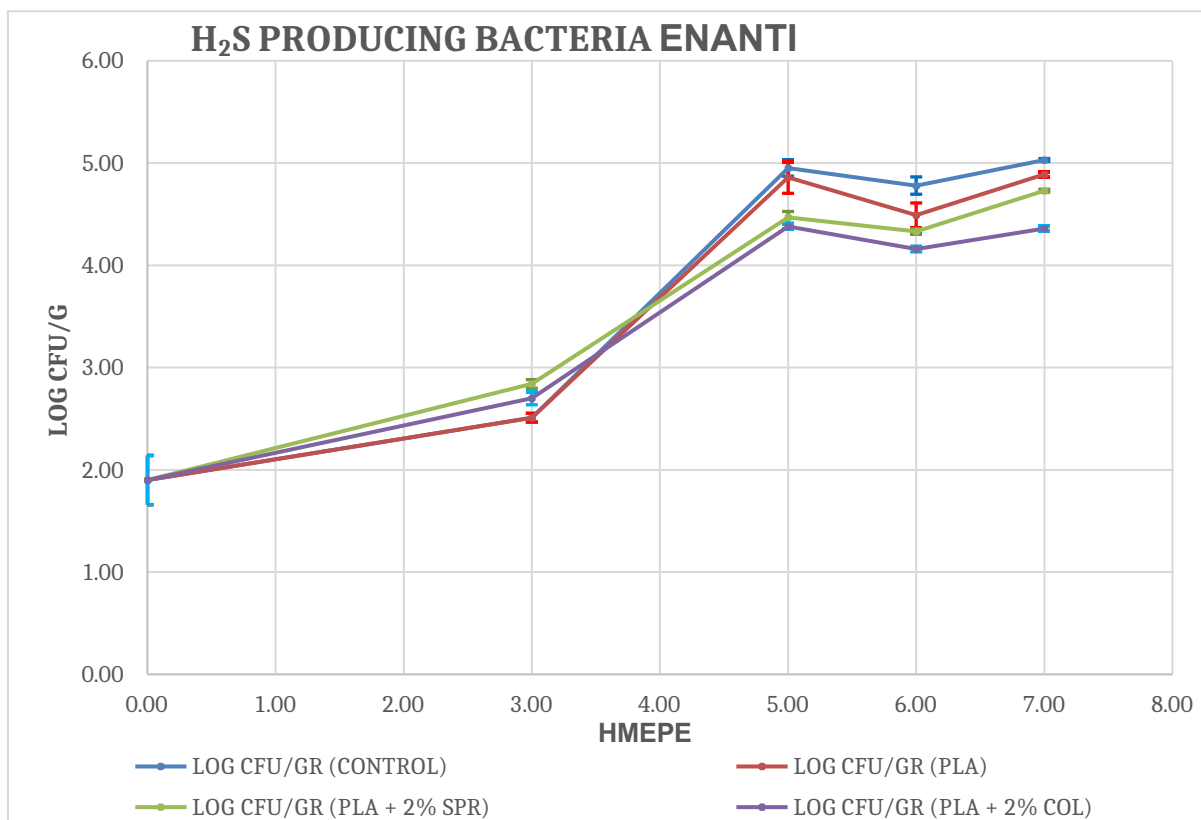
Πίνακας 8: Μεταβολή των τιμών των H₂S producing bacteria (log cfu/g) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Συσκευασία	Βακτήρια που παράγουν H ₂ S				
	Χρόνος (Ημέρα)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρας	1,90±0,24 ^{aA}	2,51±0,04 ^{aA}	4,95±0,08 ^{bB}	4,78±0,08 ^{cB}	5,03±0,01 ^{dB}
PLA	1,90±0,24 ^{Aa}	2,51±0,04 ^{aA}	4,86±0,16 ^{bB}	4,49±0,12 ^{bcB}	4,89±0,02 ^{cB}
PLA + 2% SPR	1,90±0,24 ^{aA}	2,84±0,04 ^{bA}	4,47±0,06 ^{aB}	4,33±0,02 ^{abB}	4,73±0,01 ^{bc}
PLA + 2% COL	1,90±0,24 ^{aA}	2,70±0,06 ^{aAb}	4,38±0,02 ^{aC}	4,16±0,03 ^{aB}	4,36±0,02 ^{aC}

a,b,c.. : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών ($p < 0,05$)
A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας ($p < 0,05$)

Όσον αφορά το είδος της συσκευασίας, οι εκθέτες στατιστικής διαφοράς (a,b,c,...), αποδεικνύουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συσκευασίες μεμβρανών με Α.Ε. και αυτές που δεν έχουν, δηλαδή τους μάρτυρες και τις συσκευασίες με μεμβράνη PLA, για τις περισσότερες ημέρες δειγματοληψίας.

Τόσο στην περίπτωση της συσκευασίας με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με Α.Ε. COL, όσο και στην αντίστοιχη συσκευασία με Α.Ε. SPR υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά σε όλες τις ημέρες δειγματοληψίας.



Γράφημα 3: Μεταβολή των τιμών των βακτηρίων που παράγουν H₂S (log cfu/g) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Τέλος, ανάμεσα στις συσκευασίες με τα δύο διαφορετικά Α.Ε., φαίνεται ότι υπάρχει στατιστική διαφορά από την 3^η ημέρα δειγματοληψίας και μετά. Οι συσκευασίες που περιέχουν Α.Ε. COL, εμφανίζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Ως γενικό συμπέρασμα, η συσκευασία με PLA και 2% αιθέριο έλαιο COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από όλες τις μελετώμενες συσκευασίες.

3.1.4. Οξυγαλακτικά Βακτήρια (L.A.B)

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (L.A.B), και πώς αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Ο πληθυσμός των L.A.B ήταν χαμηλότερος από αυτόν που ελήφθη για άλλα βακτήρια σε αυτή τη μελέτη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι δυνητικά

αναερόβια, δηλαδή η ανάπτυξη τους ευνοείται περισσότερο σε αναερόβιους τύπου συσκευασίας όπως π.χ σε MAP ή σε συσκευασία υπό κενό. Έχουν μεγάλη ανεκτικότητα στο CO₂ και αναπτύσσονται ταχύτατα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τα L.A.B κυμαίνονται από 1,97-3,40 log cfu /g και σύμφωνα με τα δεδομένα επηρεάζονται από την παρουσία των αιθέριων ελαίων αλλά και από τις ημέρες συντήρησης.

Στο Γράφημα 4 δίνεται σχηματικά η επίδραση του χρόνου και του είδους της συσκευασίας στα L.A.B, παράγοντες στατιστικά πολύ σημαντικοί για την τιμή της.

Η αρχική τιμή των LAB ήταν 1,97 log CFU/g και έφτασε στο μέγιστο την 7^η ημέρα (3,40 log CFU/g) για τον μάρτυρα και λίγο χαμηλότερα για τις υπόλοιπες συσκευασίες (3,32, 3,23 και 3,18 για τις συσκευασίες PLA, PLA + 2%SPR και PLA + 2% COL αντίστοιχα).

Αντιμικροβιακή δραστηριότητα και καταστολή των βακτηρίων που παράγουν H₂S εμφανίζουν και οι συσκευασίες με A.E. SPR και αυτές με A.E. COL. Είναι φανερό όμως, ότι η συσκευασία με PLA και 2% A.E. COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται από τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (A,B,C...), τα LAB επηρεάστηκαν στατιστικά σημαντικά από τον χρόνο της συντήρησης, συγκρίνοντας την πρώτη και την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας (ημέρα 7), ανεξάρτητα από τον μελετώμενο τύπο συσκευασίας. Στις ενδιάμεσες ημέρες 3, 5, 6 δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Όσον αφορά το είδος της συσκευασίας, λαμβάνοντας υπόψιν τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (a,b,c...), παρατηρείται ότι στα δείγματα που έχουν συσκευαστεί με μεμβράνες PLA εμπλουτισμένες με A.E. (COL, SPR), εμφανίζεται αναστολή του πληθυσμού των LAB την κρίσιμη 6^η ημέρα δειγματοληψίας όπου το δείγμα μάρτυρας υφίσταται αλλοίωση (OMX>7).

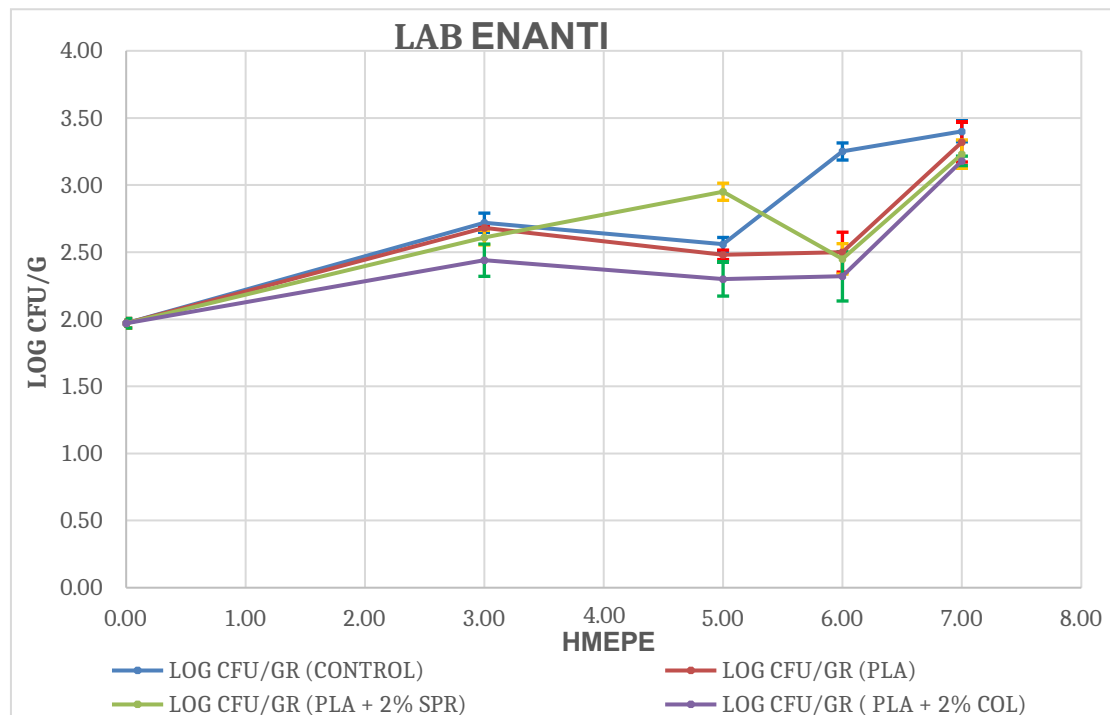
Τόσο η συσκευασία με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με A.E. SPR όσο και αυτή με την μεμβράνη εμπλουτισμένη με α.ε COL αναστέλλουν τα LAB, αλλά η συσκευασία με PLA και 2% αιθέριο έλαιο COL είναι φανερό ότι προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.

Πίνακας 9: Μεταβολή των τιμών των L.A.B (log cfu/g) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Συσκευασία	Οξυγαλακτικά Βακτήρια (LAB)				
	Χρόνος (Ημέρα)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρας	1,97±0,04 ^{Aa}	2,72±0,07 ^{aA}	2,56±0,05 ^{aA}	3,25±0,06 ^{bB}	3,40±0,08 ^{aB}
PLA	1,97±0,04 ^{Aa}	2,68±0,01 ^{aA}	2,48±0,04 ^{aA}	2,50±0,15 ^{aA}	3,32±0,15 ^{aB}
PLA + 2% SPR	1,97±0,04 ^{Aa}	2,61±0,06 ^{aAB}	2,95±0,06 ^{bBC}	2,45±0,11 ^{aA}	3,23±0,11 ^{aC}
PLA + 2% COL	1,97±0,04 ^{aA}	2,44±0,12 ^{aA}	2,30±0,13 ^{aA}	2,32±0,18 ^{aA}	3,18±0,04 ^{aB}

a,b,c.. : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών (p< 0,05)

A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας (p< 0,05)



Γράφημα 4: Μεταβολή των τιμών των L.A.B (log cfu/g) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη των **Pyrgotou et al. (2010)** όπου η προσθήκη 0,2% και 0,4% αιθέριου ελαίου ρίγανης ανέστειλε τον πληθυσμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο (π.χ *Shewanella putrefaciens*) και των γαλακτικών βακτηρίων (L.A.B), των **Kostaki et al. (2009)** όπου η προσθήκη 0,2% αιθέριου ελαίου θυμαριού ανέστειλε τον πληθυσμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο (π.χ *Shewanella putrefaciens*) και των γαλακτικών βακτηρίων (L.A.B) και των **Vatavali et al. (2012)** όπου η προσθήκη 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ανέστειλε τους πληθυσμούς της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο (π.χ *Shewanella putrefaciens*) και των γαλακτικών βακτηρίων (L.A.B) για το φαγκρί.

Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία και με προηγούμενες έρευνες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με την αλλοίωση διάφορων ειδών ιχθυερών παγκοσμίως. Για παράδειγμα, οι **Yang et al. (2019)** που ανέπτυξαν βιοδιασπώμενες ενεργές μεμβράνες που βασίζονται σε πολυγαλακτικό οξύ (PLA) αναμεμειγμένες με PBSA, καρβακρόλη και θυμόλη για την συσκευασία φιλέτων σολωμού, διαπίστωσαν μελετώντας την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ότι

αφού απελευθερώθηκαν οι ενεργές ουσίες των μεμβρανών η αλλοίωση και η υποβάθμιση των φετών σολομού μειώθηκαν σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρα, γεγονός που επέκτεινε τη διάρκεια ζωής των φιλέτων σολομού κατά 3-4 ημέρες κατά την ψυχρή αποθήκευση. Οι **Heydari-Majd et al. (2019)** παρήγαγαν ενεργές συσκευασίες από πολυγαλακτικό οξύ (PLA) που περιείχαν 1,5% w/w νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) και διάφορες συγκεντρώσεις (0,5, 1, 1,5% βάρους-βάρους) αιθέριου ελαίου *Zataria multiflora* Boiss. (ZEO) και αιθέριου ελαίου *Menthe piperita* L. (MEO) με στόχο την επέκταση του χρόνου ζωής του ψαριού τιγρεοβόσκαρος (νερά Ινδικού-Ειρηνικού ωκεανό). Παρατήρησαν ότι, υπήρξε αναστολή του βακτηριακού φορτίου και στις απλές μεμβράνες PLA, όπου η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα ξεπέρασε το αποδεκτό όριο του 7, 3 ημέρες μετά τα δείγματα μάρτυρα (10η ημέρα) και ακόμα μεγαλύτερη αναστολή των βακτηρίων στις μεμβράνες PLA/ZnO/ZEO όπου στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου, η OMX έμεινε κάτω από το 7 μέχρι και τη 16η ημέρα ψύξης.

Οι **Sánchez-García et al. (2024)** συσκεύασαν φρέσκα φιλέτα μπακαλιάρου σε εμπορικές ταινίες πολυγαλακτικού οξέος που είχαν εμποτιστεί με εκχύλισμα φύλλων ελιάς χρησιμοποιώντας υπερκρίσιμο CO₂. Παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή του βακτηριακού πληθυσμού σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες.

3.2. Φυσικοχημικές Αναλύσεις

Μελετήθηκαν οι μεταβολές των εξής χημικών παραμέτρων: του ολικού πτητικού βασικού αζώτου (TVBN), της τριμεθυλαμίνης (TMA), του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και του pH.

3.2.1. Τριμεθυλαμίνη (TMA)

Η σχηματιζόμενη τριμεθυλαμίνη των ιχθυηρών από τη δράση βακτηρίων στο ΤΜΑΟ ή λόγω της δράσης ενδογενών ενζύμων χρησιμοποιείται συχνά ως βιοχημικός δείκτης, εκτιμώντας την ποιότητα και το χρόνο ζωής του ψαριού. Τα επίπεδα της τριμεθυλαμίνης στα ιχθυηρά εξαρτώνται από το είδος, την ηλικία, την εποχή του χρόνου, τον τύπο του μυός και τη διατροφή του ψαριού. Το όριο αποδοχής για την τριμεθυλαμίνη είναι τα 12 mg N/100g ψαριού (EEC 1994).

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα συγκέντρωσης τριμεθυλαμίνης και πως αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Η Τριμεθυλαμίνη (TMA) κυμάνθηκε από 1,40-12,60 mg N/100g ψαριού και σύμφωνα με τα δεδομένα επηρεάζεται από την παρουσία των αιθέριων ελαίων αλλά και από τις ημέρες συντήρησης.

Στο Γράφημα 5 δίνεται σχηματικά η επίδραση του χρόνου και του είδους της συσκευασίας στην Τριμεθυλαμίνη (TMA), παράγοντες στατιστικά πολύ σημαντικοί για την τιμή της. Αυτό που εύκολα διαπιστώνεται, είναι ότι ακολουθήθηκε παρόμοια πορεία με αυτή της Ο.Μ.Χ και της *Pseudomonas* spp.

Η αρχική τιμή της TMA ξεκίνησε στα 1,40 mg N/100 g ψαριού και έφτασε στη μέγιστη τιμή της την 7^η ημέρα δειγματοληψίας τα 12,60 mg N/100 g ψαριού στον μάρτυρα, ενώ στις υπόλοιπες συσκευασίες έφτασε σε χαμηλότερα επίπεδα (12,25, 9,45, 9,45) για τις συσκευασίες PLA, PLA+ 2% SPR, PLA + 2% COL αντίστοιχα).

Το μέγιστο αποδεκτό όριο στη συγκεκριμένη μελέτη, για τα δείγματα μάρτυρες ξεπεράστηκε την 7^η ημέρα δειγματοληψίας (12,60 mg N/100 g ψαριού) όπως και στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε μεμβράνες PLA (12,25 mg N/100 g ψαριού).

Στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε μεμβράνες PLA + 2% A.E. SPR και σε PLA + 2% A.E. COL εμφανίζεται σημαντική αντιμικροβιακή δράση, με το μέγιστο αποδεκτό όριο της TMA να μην ξεπερνιέται την 7^η και τελευταία ημέρα δειγματοληψίας.

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται από τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (A,B,C...), η TMA επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από τον χρόνο της συντήρησης, ιδίως στο διάστημα μεταξύ της 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας δειγματοληψίας, ανεξάρτητα από τον μελετώμενο τύπο συσκευασίας.

Πίνακας 10: Μεταβολή των τιμών της TMA (mg N/ 100 g ψαριού) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Συσκευασία	Τριμεθυλαμίνη (TMA)				
	Χρόνος (Ημέρα)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρας	1,40±0,99 ^{aA}	3,50±0,99 ^{aA}	7,35±1,48 ^{aA}	12,25±0,49 ^{bB}	12,60±0,99 ^{aB}
PLA	1,40±0,99 ^{aA}	2,80±0,99 ^{aA}	6,65±1,48 ^{aA}	11,20±0,99 ^{abB}	12,25±0,49 ^{aB}
PLA + 2% SPR	1,40±0,99 ^{aA}	2,10±0,99 ^{aA}	4,55±2,47 ^{aAB}	8,75±1,48 ^{abAB}	9,45±1,48 ^{aB}
PLA + 2% COL	1,40±0,99 ^{aA}	2,10±0,99 ^{aA}	4,20±1,98 ^{aAB}	8,05±0,49 ^{aBC}	9,45±0,49 ^{aC}

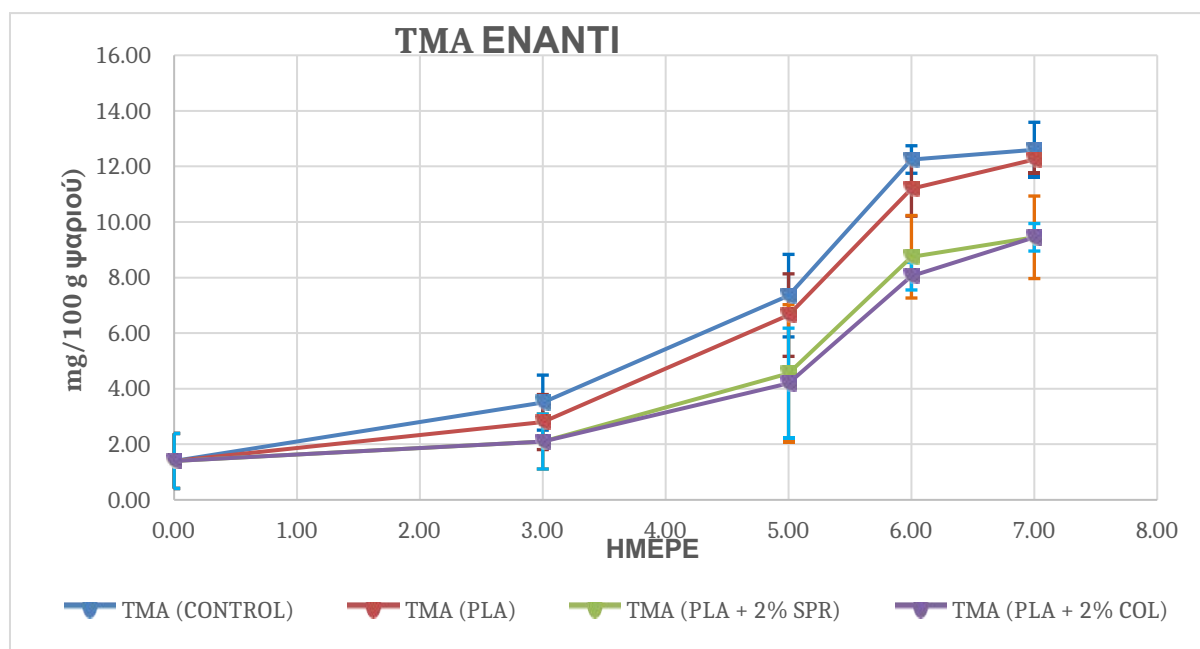
a,b,c... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών ($p < 0,05$)

A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας ($p < 0,05$)

Όσον αφορά το είδος της συσκευασίας, οι εκθέτες στατιστικής διαφοράς (a,b,c,...), αποδεικνύουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συσκευασίες μεμβρανών με Α.Ε. και αυτές που δεν έχουν, δηλαδή τους μάρτυρες και τις συσκευασίες με μεμβράνη PLA, για τις περισσότερες ημέρες δειγματοληψίας.

Την κρίσιμη 6^η ημέρα δειγματοληψίας που επέρχεται η αλλοίωση του δείγματος μάρτυρα (TMA>12), παρατηρείται αναστολή της ποσότητας της Τριμεθυλαμίνης τόσο στα δείγματα που συσκευάστηκαν με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με Α.Ε. SPR, όσο και σε αυτά που συσκευάστηκαν με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με Α.Ε. COL. Την κρίσιμη λοιπόν 6^η ημέρα δειγματοληψίας, το Α.Ε. COL σύμφωνα με τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς, φαίνεται να παρέχει την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.

Ως γενικό συμπέρασμα, η συσκευασία με PLA και 2% αιθέριο έλαιο COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από όλες τις μελετώμενες συσκευασίες.



Γράφημα 5: Μεταβολή των τιμών της TMA (mg N/ 100 g ψαριού) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

3.2.2. Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVBN)

Το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVBN) θεωρείται δείκτης ποιότητας για τα ιχθυηρά. Η αύξησή του σχετίζεται με τη δραστηριότητα των αλλοιογόνων βακτηρίων και των ενδογενών ενζύμων. Στο ολικό πτητικό βασικό άζωτο περιλαμβάνονται οι εξής ενώσεις: αμμωνία, μονοαιθυλαμίνη, διμεθυλαμίνη και τριμεθυλαμίνη, ενώσεις που ευθύνονται για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα αλλοιωμένα ιχθυηρά. Η μεταβολή των τιμών του TVBN ενός συγκεκριμένου είδους ψαριού σχετίζεται με το περιεχόμενο μη πρωτεϊνικό άζωτο του ψαριού (NPN), το οποίο εξαρτάται από τον τύπο διατροφής του ψαριού, την εποχή αλίευσης, το μέγεθος του ψαριού καθώς επίσης και από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το ανώτατο επιτρεπτό όριο που έχει καθοριστεί για το TVBN στα ψάρια από την Ε.Ε (EEC 1995) είναι τα 35 mg N/100g ψαριού.

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVBN) και πως αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Το Ολικό Βασικό Πτητικό Αζωτο (TVBN) κυμαίνεται από 20,3-42,0 mg N/100g ψαριού και σύμφωνα με τα δεδομένα επηρεάζεται από την παρουσία των αιθέριων ελαίων αλλά και από τις ημέρες συντήρησης.

Στο Γράφημα 6 δίνεται σχηματικά η επίδραση του χρόνου και του είδους της συσκευασίας στο Ολικό Βασικό Πτητικό Αζωτο (TVBN), παράγοντες στατιστικά πολύ σημαντικοί για την τιμή του. Αυτό που διαπιστώνεται, είναι ότι ακολουθήθηκε παρόμοια πορεία με αυτή της ΤΜΑ.

Πίνακας 11: Μεταβολή των τιμών του TVBN (mg N/ 100 g ψαριού) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

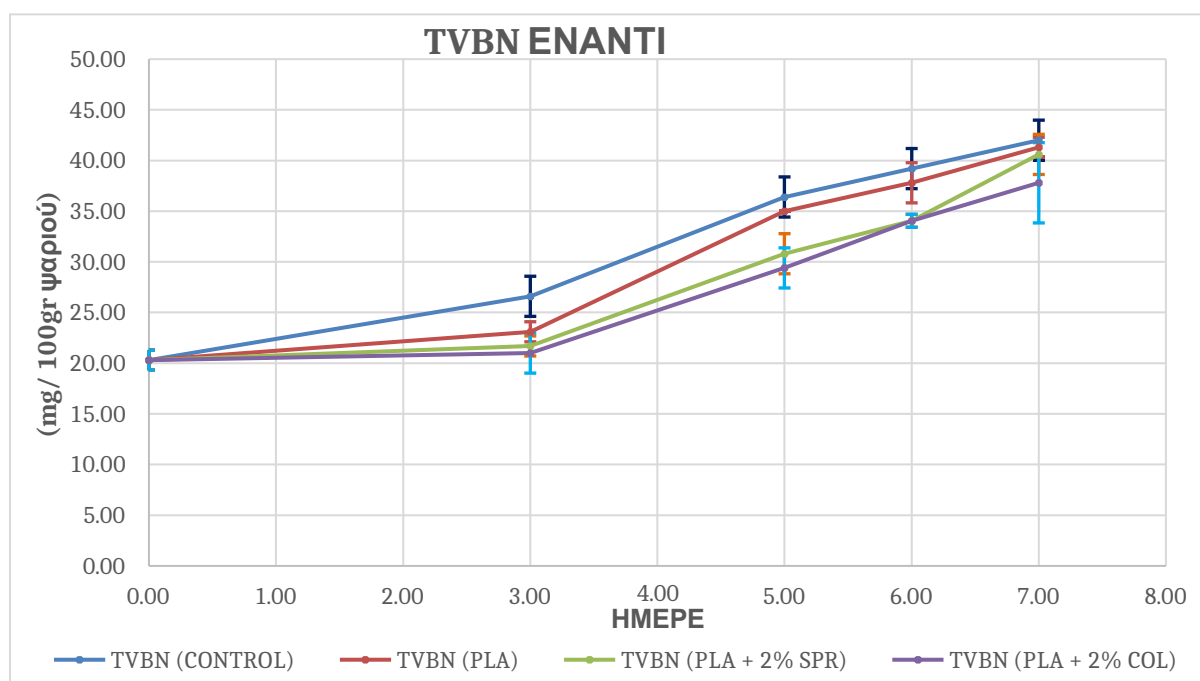
Συσκευασία	Ολικό Πτητικό Βασικό Αζωτο (TVBN)				
	Χρόνος (Ημέρες)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρας	20,30±0,99 ^{Aa}	26,60±1,98 ^{aA}	36,40±1,98 ^{bB}	39,20±1,98 ^{aB}	42,00±1,98 ^{aB}
PLA	20,30±0,99 ^{Aa}	23,10±0,99 ^{aA}	35,00±0,00 ^{ab} B	37,80±1,98 ^{Ab} c	41,30±0,99 ^{aC}
PLA + 2% SPR	20,30±0,99 ^{Aa}	21,70±0,99 ^{aA}	30,80±1,98 ^{ab} B	34,00±0,64 ^{aB}	40,60±1,98 ^{aC}
PLA + 2% COL	20,30±0,99 ^{aA}	21,00±1,98 ^{Aa}	29,40±1,98 ^{aA} B	34,00±0,64 ^{aB}	37,80±3,96 ^{aB}

a,b,c.. : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών (p< 0,05)

A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας (p< 0,05)

Η αρχική τιμή του TVBN ξεκίνησε στα 20,30 mg N/100g ψαριού και έφτασε στη μέγιστη τιμή την 7^η ημέρα δειγματοληψίας τα 42,00 mg N/100g ψαριού στον μάρτυρα, ξεπερνώντας το αποδεκτό όριο του 35 την 5^η ημέρα (36,40 mg N/100g). Στη συσκευασία με PLA, ξεπέρασε το όριο την μέρα 6 (37,80 mg N/100g) ενώ στις συσκευασίες με τα αιθέρια έλαια το όριο ξεπεράστηκε τη μέρα 7 (40,60 και 37,80 mg N/100g ψαριού για τα PLA+2% SPR και PLA+2% COL, αντίστοιχα).

Αντιμικροβιακή δραστηριότητα και καταστολή του TVBN εμφανίζουν και οι συσκευασίες με A.E. SPR και αυτές με A.E. COL. Είναι φανερό όμως, ότι η συσκευασία με PLA και 2% A.E. COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.



Γράφημα 6: Μεταβολή των τιμών του TVBN (mg N/ 100 g ψαριού) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται από τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (A,B,C...), το Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από τον χρόνο της συντήρησης, ιδίως στο διάστημα μεταξύ της 3^{ης}-5^{ης} ημέρας δειγματοληψίας, ανεξάρτητα από τον μελετώμενο τύπο συσκευασίας.

Όσον αφορά το είδος της συσκευασίας, οι εκθέτες στατιστικής διαφοράς (a,b,c....), αποδεικνύουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συσκευασίες μεμβρανών με A.E. (COL, SPR) και αυτές που δεν έχουν, δηλαδή τους μάρτυρες και τις συσκευασίες με μεμβράνη PLA, για τις περισσότερες ημέρες δειγματοληψίας, ιδίως την κρίσιμη 5^η ημέρα δειγματοληψίας όπου στον μάρτυρα ξεπερνιέται το αποδεκτό όριο των 35 mg N/ 100 g ψαριού.

Στην περίπτωση της συσκευασίας με μεμβράνη PLA εμπλουτισμένη με A.E. COL υ, στατιστική σημαντική διαφορά υπάρχει σε όλες τις ημέρες δειγματοληψίας ενώ στην αντίστοιχη συσκευασία με A.E. SPR, παρατηρείται στατιστική διαφορά, όχι όμως τόσο σημαντική.

Τέλος, ανάμεσα στις συσκευασίες με τα δύο διαφορετικά A.E., φαίνεται ότι υπάρχει στατιστική διαφορά την κρίσιμη 5^η ημέρα δειγματοληψίας που ξεπερνιέται στο μάρτυρα το επιτρεπτό όριο. Οι συσκευασίες που περιέχουν A.E. COL, εμφανίζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Ως γενικό συμπέρασμα, η συσκευασία με PLA και 2% αιθέριο έλαιο COL προσφέρει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από όλες τις μελετώμενες συσκευασίες.

3.2.3. Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBA)

Η τιμή του TBA είναι δείκτης της οξείδωσης του λίπους προσδιορίζοντας την περιεχόμενη μηλονική διαλδεϋδη (MDA). Η οξείδωση των λιπιδίων, οδηγεί στην παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και οσμών και επομένως ελαττώνει τον χρόνο ζωής. Το προτεινόμενο όριο για το TBA είναι τα 2 mg MDA/kg ψαριού (Connell et al., 1995).

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Θειοβαρβιτουρικού Οξέος (TBA) και πως αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBA) κυμαίνεται από 3,49-10,26 mg MDA/kg ψαριού και σύμφωνα με τα δεδομένα επηρεάζεται από την παρουσία των αιθέριων ελαίων αλλά και από τις ημέρες συντήρησης.

Στο Γράφημα 7 δίνεται σχηματικά η επίδραση του χρόνου και του είδους της συσκευασίας στο Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBA), παράγοντες στατιστικά πολύ σημαντικοί για την τιμή του.

Η αρχική τιμή του TBA ξεκίνησε στα 3,49 mg MDA/kg ψαριού και έφτασε στη μέγιστη τιμή την 7^η ημέρα δειγματοληψίας τα 10,26 mg MDA/kg ψαριού στη συσκευασία με το PLA. Έφτασε λίγο χαμηλότερα στον μάρτυρα (10,14) ενώ στις συσκευασίες με τα αιθέρια έλαια έφτασε σε χαμηλότερα επίπεδα (9,91 και 9,49 mg MDA/kg ψαριού για τις συσκευασίες PLA+ 2% SPR και PLA + 2% COL, αντίστοιχα). Γενικά πρόκειται για υψηλές τιμές TBA σε σχέση με το προτεινόμενο όριο του 2, ήδη από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας.

Πίνακας 12: Μεταβολή των τιμών του TBA (mg μηλονικής διαλδεϋδης/ kg ψαριού) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Συσκευασία	Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBA)				
	Χρόνος (Ημέρες)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρας	3,49±0,02 ^{Aa}	6,97±0,01 ^{dA}	9,09±0,62 ^{aB}	10,12±0,35 ^{bB}	10,14±0,45 ^{aB}
PLA	3,49±0,02 ^{aA}	6,62±0,02 ^{cA}	9,39±1,18 ^{aB}	9,48±0,06 ^{bB}	10,26±0,06 ^{aB}
PLA + 2% SPR	3,49±0,02 ^{aA}	6,46±0,02 ^{bA}	9,06±0,1 ^{aC}	7,89±0,02 ^{aB}	9,91±0,11 ^{aD}
PLA + 2% COL	3,49±0,02 ^{aA}	6,25±0,01 ^{aA}	7,68±0,02 ^{aB}	7,72±0,04 ^{aB}	9,49±0,04 ^{aC}

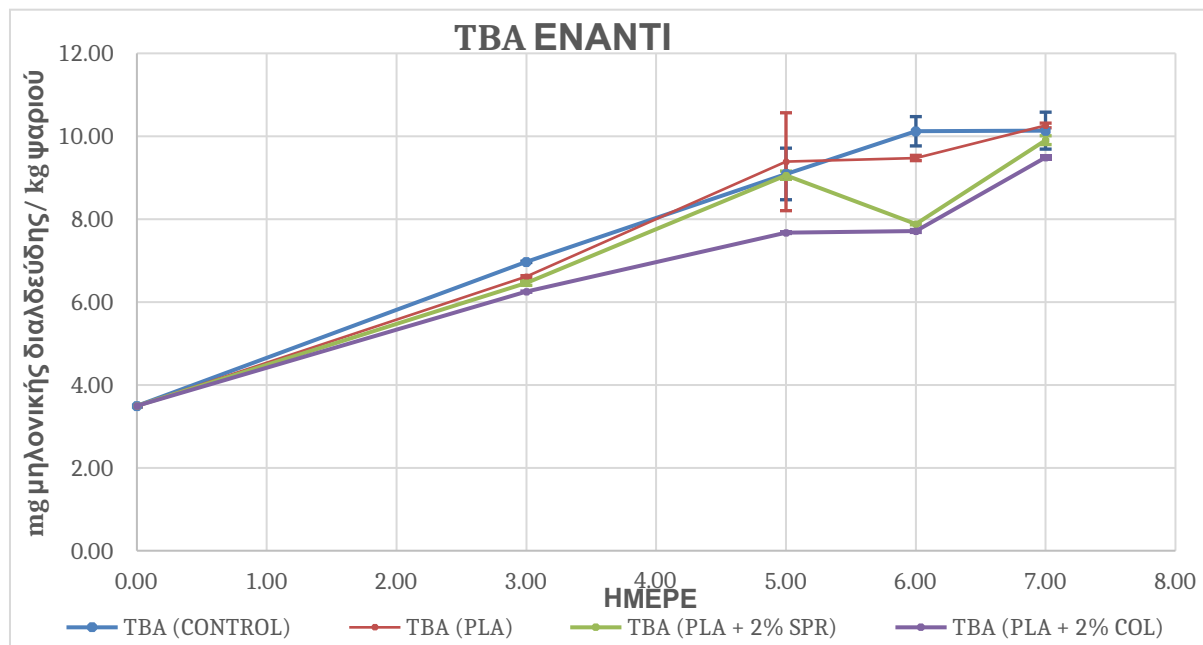
a,b,c... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών ($p < 0,05$)

A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας ($p < 0,05$)

Αντιμικροβιακή δραστηριότητα και καταστολή του TBA εμφανίζουν και οι συσκευασίες με A.E. SPR και αυτές με A.E. COL σε σύγκριση με τον μάρτυρα και τη συσκευασία PLA.

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται από τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς (A,B,C...), το

Θειοβαρβιτουρικό Οξύ επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από τον χρόνο της συντήρησης, ιδίως στο διάστημα μεταξύ της 3^{ης}-5^{ης} ημέρας δειγματοληψίας, ανεξάρτητα από τον μελετώμενο τύπο συσκευασίας.



Γράφημα 7: Μεταβολή των τιμών του TBA (mg μηλονικής διαλδεύδης/ kg ψαριού) συναρτήσει του χρόνου (ημέρες) σε δείγματα φιλέτων λαβρακιού αποθηκευμένα σε διαφορετικούς τύπους συσκευασίας

Όσον αφορά το είδος της συσκευασίας, δεν εμφανίζεται κάποιο σημαντικό μοτίβο ώστε να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση των Α.Ε. στην ποσότητα του TBA.

Οι συσκευασίες που περιέχουν μεμβράνες PLA εμπλουτισμένες με τα Α.Ε., οδηγούν σε ελαφρώς χαμηλότερες τιμές TBA στα δείγματα, οι οποίες όμως δεν είναι στατιστικά σημαντικές, για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας, τόσο για το SPR όσο και για το COL.

3.2.4 Μέτρηση pH

Το pH συνδέεται άμεσα με τη δράση των μικροοργανισμών, η οποία δράση τους εμφανίζει συχνά φαινόμενα ανταγωνισμού στα αποτελέσματα. Οι ψευδομονάδες για παράδειγμα, που βρίσκονται σε αφθονία στα ψάρια, παράγουν διάφορα αμινοξέα οδηγώντας στην αύξηση του pH, ενώ αντίστοιχα η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια, προκαλεί

μείωση του pH. Τα βακτήρια που παράγουν H₂S, τα οποία ανήκουν στην κυρίαρχη μικροχλωρίδα των ψαριών, δεν μειώνουν τόσο αισθητά το pH, καθώς το H₂S είναι ασθενές οξύ. Επομένως, όπως φαίνεται και στο γράφημα 8, κυριαρχεί η δράση των ψευδομονάδων καθώς παρατηρείται μια ανοδική τάση του pH σε όλους τους τύπους συσκευασίας.

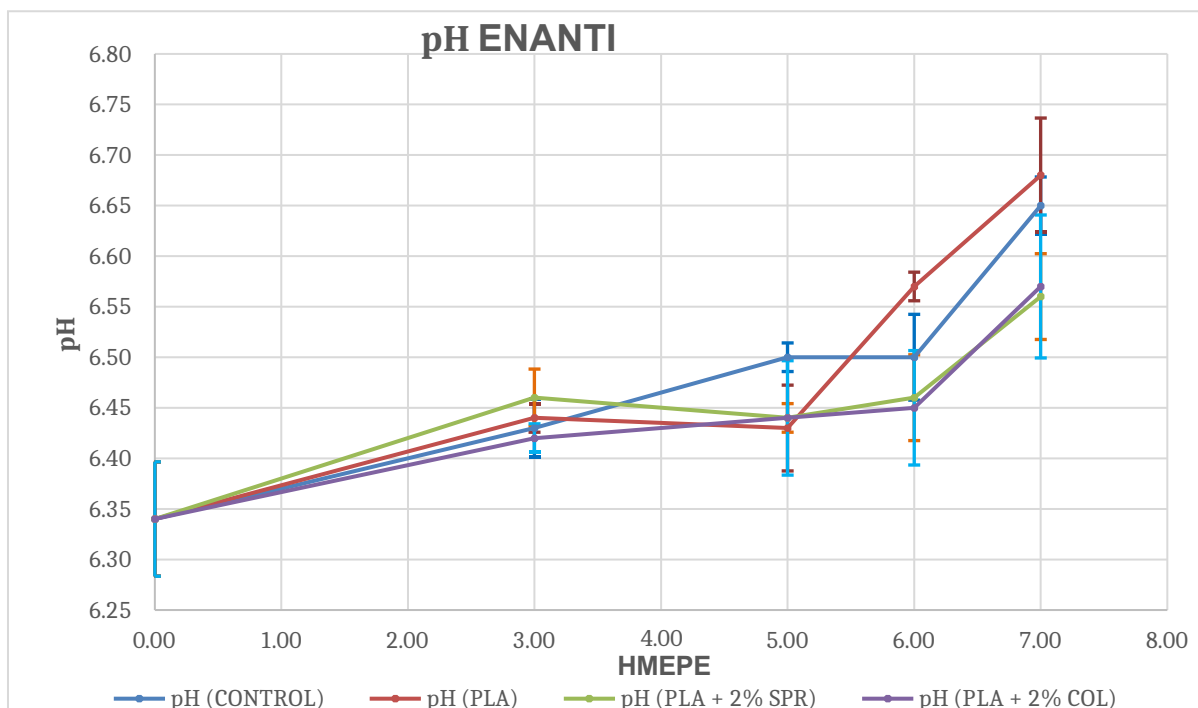
Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του pH και πως αυτά εξελίσσονται από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας έως την έβδομη. Το pH κυμαίνεται από 6,34-6,68 και σύμφωνα με τους εκθέτες στατιστικής διαφοράς, δεν επηρεάζεται σημαντικά ούτε από την παρουσία των αιθέριων ελαίων ούτε από τις ημέρες συντήρησης.

Πίνακας 13: Μεταβολή pH κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτων λαβρακιού σε διαφορετικούς τύπους μεμβρανών

Συσκευασία	pH				
	Χρόνος (Ημέρα)				
	0	3	5	6	7
Δείγμα μάρτυρας	6,34±0,06 ^{aA}	6,43±0,03 ^{Aa}	6,5±0,01 ^{Aa}	6,5±0,04 ^{Aa}	6,65±0,03 ^{Ba}
PLA	6,34±0,06 ^{aA}	6,44±0,01 ^{Aa}	6,43±0,04 ^{Aa}	6,57±0,01 ^{Aba}	6,68±0,06 ^{Ba}
PLA + 2% SPR	6,34±0,06 ^{aA}	6,46±0,03 ^{Aa}	6,44±0,01 ^{Aa}	6,46±0,04 ^{Aa}	6,56±0,04 ^{Aa}
PLA + 2% COL-	6,34±0,06 ^{aA}	6,42±0,01 ^{Aa}	6,44±0,06 ^{Aa}	6,45±0,06 ^{Aa}	6,57±0,07 ^{Aa}

a,b,c.. : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε στήλη) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για μία συγκεκριμένη ημέρα μεταξύ των τύπων συσκευασιών (p< 0,05)

A,B,C... : Διαφορετικοί εκθέτες (σε κάθε σειρά) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών για ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας (p< 0,05)



Γράφημα 8: Εξέλιξη pH κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτου λαβρακιού σε διαφορετικούς τύπους μεμβρανών

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη των **Kostaki et al. (2009)** όπου η προσθήκη 0,2% αιθέριου ελαίου θυμαριού περιορίσε την ποσότητα του θειοβαρβιτουρικού του λαβρακιού και των **Vatavali et al. (2012)** όπου η προσθήκη 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης περιορίσε την ποσότητα του θειοβαρβιτουρικού για το φαγκρί.

Τα αποτελέσματα έρχονται επίσης σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες των **Yang et al. (2019)**, **Heydari-Majd et al. (2019)**, **Fathima et al. (2018)**, **Teimourifard et al. (2024)**.

Οι **Yang et al. 2019** που ανέπτυξαν βιοδιασπώμενες ενεργές μεμβράνες που βασίζονται σε πολυγαλακτικό οξύ (PLA) αναμεμειγμένες με PBSA, καρβακρόλη και θυμόλη για την συσκευασία φιλέτων σολωμού, διαπίστωσαν ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις τιμές TBA μεταξύ των δειγμάτων μάρτυρα και των δειγμάτων με τις μελετώμενες μεμβράνες, στην πρώιμη περίοδο αποθήκευσης. Στη συνέχεια, μετά την 4η ημέρα, οι τιμές TBA των δειγμάτων μάρτυρα ήταν σημαντικά ($p < 0.05$) υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων με τις μεμβράνες, ενώ και ο ρυθμός αύξησης στις τιμές TBA των δειγμάτων με τις μεμβράνες ήταν χαμηλότερος. Στο ίδιο μοτίβο ήταν και τα αποτελέσματα των **Heydari-Majd et al. 2019**, που παρήγαγαν ενεργές συσκευασίες από πολυγαλακτικό οξύ (PLA) που περιείχαν 1,5% w/w νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) και διάφορες

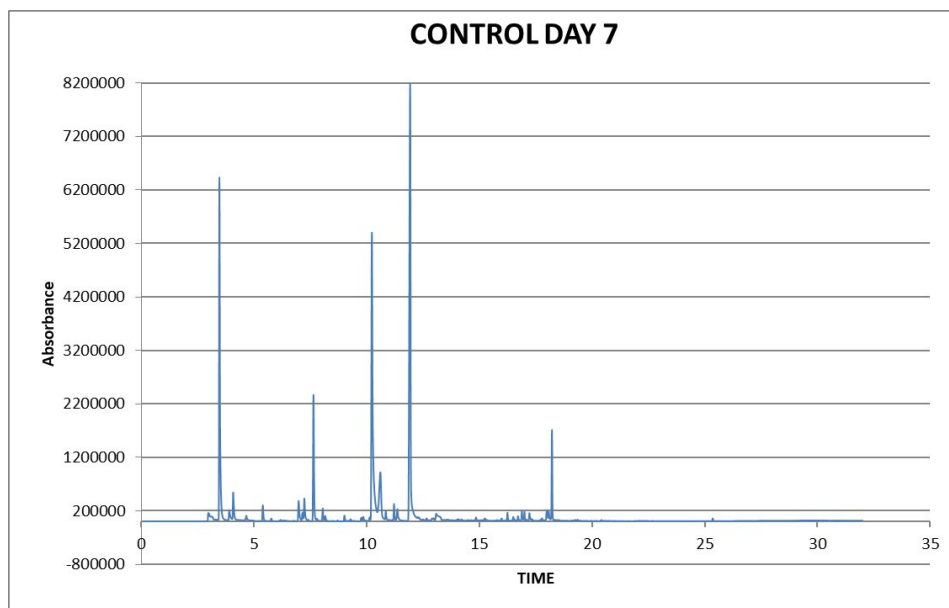
συγκεντρώσεις (0,5, 1, 1,5% βάρους-βάρους) αιθέριου ελαίου *Zataria multiflora* Boiss. (ZEO) και αιθέριου ελαίου *Menthe piperita* L. (MEO) με στόχο την επέκταση του χρόνου ζωής του ψαριού τιγρεοβόσκαρος (νερά Ινδικού-Ειρηνικού ωκεανό). Οι τιμές TBA των δειγμάτων μάρτυρα ήταν σημαντικά ($p < 0.05$) υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων με τις μεμβράνες. Όσον αφορά το Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVBN), παρέμεινε κάτω από το αποδεκτό όριο των 35mg N/100g στα ιχθυηρά κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης, στα δείγματα που ήταν τυλιγμένα σε PLA/ZnO/MEO και PLA/ZnO/ZEO φιλμ. Τα δείγματα που δεν ήταν τυλιγμένα και τα δείγματα που ήταν τυλιγμένα σε καθαρά φιλμ PLA, υπερέβησαν το όριο ασφαλείας του TVB-N στις 12 και 16 ημέρες μετά την κατάψυξη, αντίστοιχα. Αν και οι τιμές του TVB-N αυξήθηκαν και στα δύο τυλιγμένα και μη τυλιγμένα δείγματα με την πάροδο του χρόνου, οι τιμές ήταν σημαντικά χαμηλότερες στα τυλιγμένα δείγματα από ότι στα δείγματα μάρτυρα.

Οι **Fathima et al. (2018)** ανέπτυξαν σύνθετα φιλμ ενσωματώνοντας νανοχιτοζάνη (0,5 %, 1 % και 2 %) σε μία μήτρα πολυγαλακτικού οξέος (PLA) για τη συσκευασία ινδικής λευκής γαρίδας. Όσον αφορά το TVBN, μόνο τα δείγματα που ήταν συσκευασμένα σε 1% PLA ήταν αποδεκτά μέχρι 18 ημέρες αποθήκευσης. Όλα τα άλλα δείγματα (μάρτυρας, 0,5%, 2%) απορρίφθηκαν μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης.

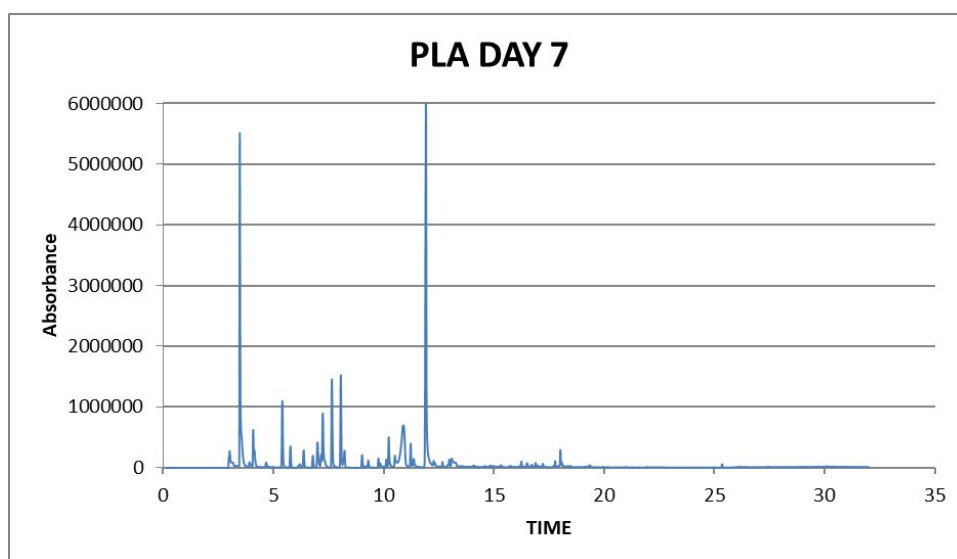
Οι **Teimourifard et al. (2024)** μελέτησαν την επίδραση των ταινιών νανοχιτοζάνης από πολυγαλακτικό οξύ (PLA-NC) που περιέχουν αιθέριο έλαιο *Bunium persicum* (BPEO) (0, 0.3, 0.6 και 0.9%) σε φιλέτα πέστροφας κατά τη συντήρησή τους σε ψύξη για 13 ημέρες. Ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες δειγμάτων, η μεγαλύτερη αναστολή της ποσότητας του TVBN σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα παρατηρήθηκε στο δείγμα PLA-NC με την μεγαλύτερη ποσότητα αιθέριου ελαίου BPEO (0,9%), όπου δεν ξεπέρασε το αποδεκτό όριο των 35 mg/100 g ψαριού.

3.3 Προσδιορισμός Πτητικών Ενώσεων

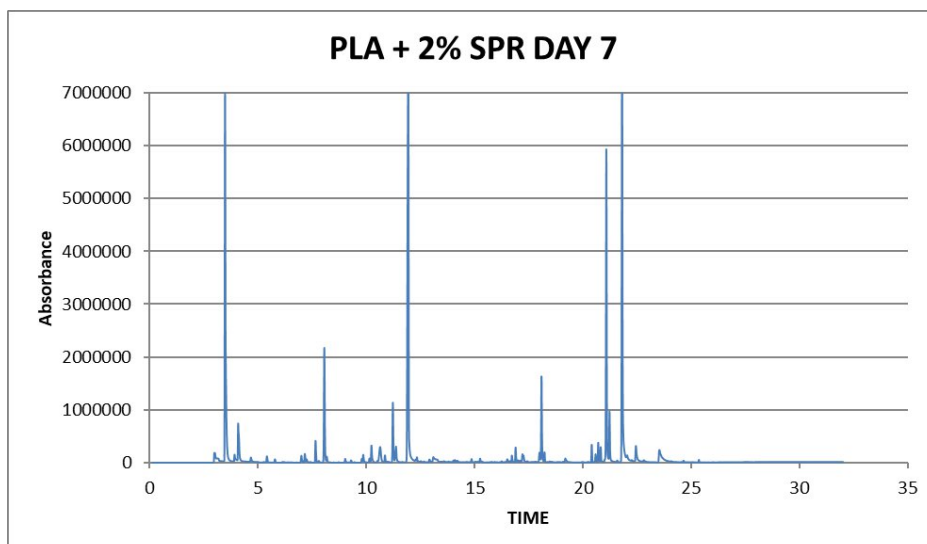
Στις εικόνες 7-10, παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα πτητικού προφίλ που ελήφθηκε από την αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας των διαφορετικά συσκευασμένων δειγμάτων φιλέτων λαβρακιού για την ίδια μέρα συντήρησης (7^η).



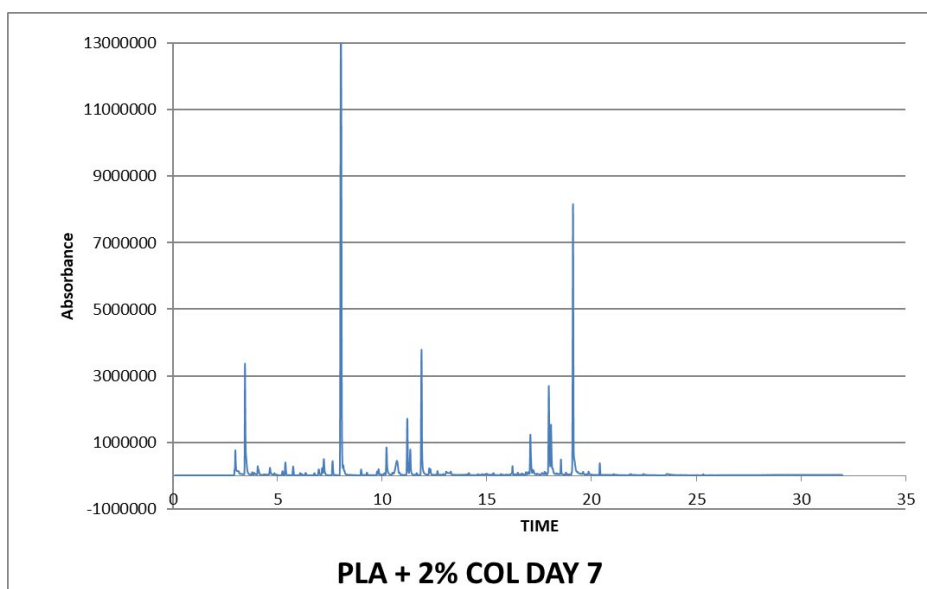
Εικόνα 7: Χρωματογράφημα πτητικού κλάσματος δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο αεροβίως σε PA/PE (μάρτυρας) την 7^η ημέρα (SPME/GC-MS)



Εικόνα 8: Χρωματογράφημα πτητικού κλάσματος δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο σε PLA την 7^η ημέρα (SPME/GC-MS)



Εικόνα 9: Χρωματογράφημα πτητικού κλάσματος δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο σε PLA με 2% αιθέριο έλαιο SPR την 7^η ημέρα (SPME/GC-MS)



Εικόνα 10: Χρωματογράφημα πτητικού κλάσματος δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο σε PLA με αιθέριο έλαιο COL την 7^η ημέρα (SPME/GC-MS)

Οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε κάθε διαφορετικό τύπο συσκευασίας παρουσιάζονται στους πίνακες 14-17. Η παρουσία ή η απουσία πτητικών ενώσεων στα δείγματα του λαβρακιού οδηγεί σε συμπεράσματα σχετικά με την αναστολή που προκαλείται από τη χρήση των αιθέριων ελαίων και συμβάλλει στην εκτίμηση της ποιότητας των δειγμάτων.

Πίνακας 14: Ημιποσοστικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων (ppb) δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο σε σακούλα PA-PE (Δείγμα CONTROL) συναρτήσει του χρόνου συντήρησης.

ΕΝΩΣΗ	ΧΡΟΝΟΣ (ΗΜΕΡΑ)				
	0	3	5	6	7
ΑΛΚΟΟΛΕΣ					
Αιθανόλη	59,7±11,1	74,6±6,3	86,2±177,6	315,9±175,2	69,5±16,9
3 μέθυλο, βουτανόλη-1	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	28,27±9,96
Υποσύνολο	59,7±11,1	74,6±6,3	86,2±177,6	315,9±175,2	97,8±19,6
ΚΕΤΟΝΕΣ					
Προπανόνη-2	85,2±34,4	94,3±27,8	127,5±32,2	134,4±65,0	12,3±4,1
2,6-διμεθυλο, επτανόνη-4	ΔΑ	21,5±4,3	20,6±5,6	12,6±2,8	7,7±1,5
Βουτανόνη-2	ΔΑ	ΔΑ	39,7±4,1	50,4±17,5	9,7±1,6
Ακετοΐνη	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	177,5±19,5
2,3-Βουτανεδιόνη	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	33,7±7,4
4 μέθυλο, πεντανόνη-2	14,4±1,6	21,8±9,5	28,3±15,1	25,9±0,7	29,7±1,3
Υποσύνολο	99,7±34,5	137,5±20,1	216,0±20,9	223,1±39,9	270,4±9,6
ΑΛΔΕΪΔΕΣ					
2 μέθυλο, βουτανάλη	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	9,4±4,2
3 μέθυλο, βουτανάλη	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	16,9±12,6
Εξανάλη	29,6±5,8	37,0±15,9	73,8±19,3	72,1±17,2	ΔΑ
Υποσύνολο	29,6±5,8	37,0±15,9	73,8±19,3	72,1±17,2	26,4±13,3
ΕΣΤΕΡΕΣ					
Οξικός μεθυλεστέρας	50,7±44,1	28,5±11,3	99,3±18,2	325,1±53,8	21,5±0,6
Οξικός αιθυλεστέρας	331,9±26,2	891,2±436,1	1406,7±1516,7	922,2±788,4	182,5±23,4
Προπανικός μεθυλεστέρας	15,4±3,3	ΔΑ	24,7±16,3	17,7±5,4	8,6±1,2
Βουτανικός μεθυλεστέρας	44,8±6,2	83,8±62,7	136,4±153,7	103,3±64,4	16,7±0,2
Υποσύνολο	442,8±29,9	1003,5±311,9	1667,2±880,2	1368,2±457,8	229,4±13,5
ΔΙΑΦΟΡΑ					
Χλωροφόρμιο	17,3±3,6	25,4±0,2	82,1±83,0	79,7±57,5	16,1±1,2

N,N διμέθυλο, μεθυλαμίνη	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	22,2±2,5
Επτάνιο	2851,5± 23,1	5220,2± 3146,0	6291,7± 6368,9	5817,7± 4301,8	938,9± 541,3
Εξάνιο	231,1±16,4	280,1±44,0	704,0±795,5	737,0±568,9	69,8±45,7
2 αιθυλο, εξένιο-1	42,4±11,3	23,9±20,6	42,8±47,4	32,12±27,6	ΔΑ
1,2,3 τριμέθυλο βενζόλιο (αιμελιτόλη)	26,6±2,9	42,2±6,3	37,1±2,7	28,3±3,2	11,9±2,7
Υποσύνολο	3169,0±15,4	5581,7±1573,2	7175,6±2871,7	6720,8±1940,8	1058,8±271,7
ΤΕΡΠΕΝΙΑ/ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ					
α-θουγένιο	14,1±0,4	28,7±15,6	23,2±19,6	10,2±4,9	5,4±1,0
α-πινένιο	17,1±2,4	35,1±24,2	31,4±26,9	37,4±8,4	12,9±4,8
Σαβινένιο	38,9±1,8	79,5±40,4	67,1±54,6	28,0±15,4	13,0±2,6
β-μυρσένιο	9,2±1,2	18,7±11,8	15,5±13,3	ΔΑ	ΔΑ
β-πινένιο	23,8±5,5	45,9±25,6	46,2±30,7	14,9±5,7	14,6±2,1
ο-κυμένιο	37,7±5,5	148,4± 133,4	47,1±39,3	10,9±7,7	17,6±13,0
Λεμονένιο	26,7±5,6	76,4±47,1	30,1±27,2	10,4±5,3	16,1±3,4
1,8-κινεόλη	158,6± 18,8	386,6± 204,4	230,5± 119,8	74,3±28,3	121,0±44,5
Υποσύνολο	326,1±8,1	819,4±96,4	490,1±55,9	166,0±14,4	200,6±19,1
ΣΥΝΟΛΟ	4126,8±22,9	7663,7±825,4	9909,0±1490,7	8866,2±995,1	1861,1±141,1

ΔΑ: Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 15: Ημιποσοστικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων (ppb) δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο με μεμβράνη PLA και σακούλα PA-PE συναρτήσει του χρόνου συντήρησης.

ΕΝΩΣΗ	ΧΡΟΝΟΣ (ΗΜΕΡΑ)			
	3	5	6	7
ΑΛΚΟΟΛΕΣ				
Αιθανόλη	153,9±28,7	242,9±162,5	156,5±45,7	111,9±11,2
3 μέθυλο- 1 βουτανόλη	2,7±3,8	15,3±5,4	63,7±5,5	44,6±1,7
Υποσύνολο	156,6±29,0	258,2±162,6	220,2±46,0	111,9±11,3
ΚΕΤΟΝΕΣ				
Προπανόνη-2	137,3±52,1	135,3±15,5	91,2±95,1	21,3±2,6
Βουτανόνη-2	21,1±0,7	48,7±23,4	17,7±1,1	18,5±6,1
Πεντανόνη-2	3,3±4,6	ΔΑ	ΔΑ	8,4±2,4
3 μέθυλο, πεντανόνη-2	16,4±2,6	17,8±8,8	13,4±8,7	34,5±5,3
2,6 διμέθυλο, επτανόνη-4	29,0±7,1	35,7±13,4	7,6±1,8	7,9±0,5
Ακετοΐνη	ΔΑ	ΔΑ	299,6±91,2	261,0±99,6
Εξανόνη- 3/Πεντανοδιόνη-2,3	9,4±13,2	32,6±21,9	21,7±11,2	17,9±10,1
Υποσύνολο	216,7±24,4	270,1±19,5	451,3±59,3	369,5±41,0
ΑΛΔΕΥΔΕΣ				
3 μέθυλο, βουτανάλη	ΔΑ	ΔΑ	9,1±5,1	15,4±11,6
Εξανάλη	35,9±7,6	29,1±22,2	30,4±11,9	32,8±14,6
Υποσύνολο	35,9±7,6	29,1±22,2	30,4±11,9	32,8±14,6
ΕΣΤΕΡΕΣ				
Οξικός μεθυλεστέρας	141,1±30,3	150,3±19,8	146,9±150,8	83,8±62,5
Οξικός αιθυλεστέρας	374,9±0,6	458,5±257,2	236,4±98,6	128,7±50,2
Υποσύνολο	516,0±30,3	608,8±258,0	383,3±180,2	212,5±80,3
ΔΙΑΦΟΡΑ				
Τριμεθυλαμίνη	ΔΑ	ΔΑ	15,2±5,7	24,0±6,9
Δίχλωρο- μεθάνιο	9,1±4,5	26,8±19,2	12,3±6,3	ΔΑ

Χλωροφόρμιο	1949,2±485,1	3492,0±1245,2	2336,1±247,5	1241,7±1528,8
Εξάνιο	274,4±84,2	482,9±262,5	128,9±80,0	90,4±68,9
Επτάνιο	2324,2±871,0	4280,0±2240,6	1171,1±488,7	248,2±257,2
3, μεθυλένο, επτάνιο	ΔΑ	ΔΑ	6,9±2,4	13,7±2,7
1,2,3 τριμέθυλο βενζόλιο (αιμελιτόλη)	60,4±15,8	86,2±46,1	17,4±5,7	11,8±2,1
Υποσύνολο	4617,9±500,3	8372,9±1288,9	3688,7±226,0	1629,9±694,0
ΤΕΡΠΕΝΙΑ/ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ				
α-θουγένιο	19,4±1,1	25,6±10,7	3,3±0,1	ΔΑ
α-πινένιο	15,7±1,8	24,8±7,1	3,7±2,6	8,4±3,0
Σαβινένιο	65,0±0,3	76,5±33,0	18,5±6,8	ΔΑ
β-μυρσένιο	13,1±1,3	17,4±12,0	11,7±4,7	ΔΑ
β-πινένιο	27,1±1,6	32,0±8,2	ΔΑ	ΔΑ
4-καρένιο / α- τερπινένιο	9,2±0,1	13,2±10,7	ΔΑ	ΔΑ
ο-κυμένιο	107,4±0,9	100,6±57,3	16,5±8,1	ΔΑ
λεμονένιο	65,8±0,7	70,0±38,5	14,9±7,4	9,7±6,1
1,8-κινεόλη	389,6±94,9	267,8±28,1	103,5±134,8	98,7±10,8
γ-τερπινένιο	9,3±1,1	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
Υποσύνολο	721,7±31,6	627,9±29,8	172,1±55,3	116,8±9,0
ΣΥΝΟΛΟ	6264,7±259,8	10167,0±679,6	4946,3±144,8	2518,0±349,6

ΔΑ: Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 16: Ημιποσοστικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων (ppb) δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο με μεμβράνη PLA + 2% αιθέριο έλαιο SPR και σακούλα PA-PE συναρτήσει του χρόνου συντήρησης.

ΕΝΩΣΗ	ΧΡΟΝΟΣ (ΗΜΕΡΑ)			
	3	5	6	7
ΑΛΚΟΟΛΕΣ				
Αιθανόλη	46,3±25,6	87,6±21,9	202,2±36,9	95,2±21,3
3 μέθυλο, βουτανόλη-1	ΔΑ	19,4±7,7	309,9±93,0	78,7±22,6
Οκτανόλη-3	41,1±24,0	82,8±21,6	148,1±5,7	12,1±2,4
Υποσύνολο	87,4±35,1	189,7±22,4	660,3±70,9	185,9±22,0
ΚΕΤΟΝΕΣ				
Προπανόνη-2	28,3±4,9	30,7±10,4	50,8±33,3	20,3±7,4
Βουτανόνη-2	21,1±5,8	22,1±6,1	26,7±8,2	12,3±4,7
Πεντανόνη-2	ΔΑ	12,5±2,7	23,8±1,0	11,9±1,8
4 μέθυλο, πεντανόνη-2	14,8±0,1	21,0±1,3	130,5±28,7	35,9±1,7
Ακετοΐνη	5,7±2,3	43,5±11,9	631,4±81,4	48,7±11,2
2,6 διμέθυλο, επτανόνη-4	6,3±0,5	10,7±1,1	11,8±1,0	10,4±1,0
Υποσύνολο	76,2±4,0	140,4±7,7	875,0±41,6	139,5±41,9
ΑΛΔΕΥΔΕΣ				
3 μέθυλο, βουτανάλη	ΔΑ	9,0±2,7	23,5±10,5	4,3±1,5
Υποσύνολο	-	9,0±2,7	23,5±10,5	4,3±1,5
ΕΣΤΕΡΕΣ				
Μεθυλεστέρας οξικού οξέος	136,9±90,7	28,3±4,3	123,9±35,5	12,6±3,3
Αιθυλεστέρας του οξικού οξέος	70,3±57,8	118,4±21,6	155,3±7,5	29,3±10,8
Μεθυλεστέρας του βουτανικού οξέος	13,6±0,4	11,5±1,8	21,4±7,7	10,2±1,1
Υποσύνολο	220,8±76,1	158,2±15,6	300,5±26,3	52,1±8,0

ΔΙΑΦΟΡΑ				
Τριμεθυλαμίνη	ΔΑ	14,6±5,6	46,9±10,9	14,2±7,8
Χλωροφόρμιο	351,0±41,8	559,4±174,5	801,0±299,7	159,2±23,4
Κυκλοεξανόνη, 3-μεθυλο-	5,48±2,2	7,05±2,8	8,27±7,6	105,81±43,3
Εξάνιο	46,8±34,1	48,1±27,4	194,9±55,4	4,9±1,9
Επτάνιο	494,6±466,9	622,0±115,1	86,5±25,7	26,9±10,6
1,2,3, τριμέθυλο, βενζόλιο	10,8±2,4	23,2±2,4	19,7±1,6	20,5±3,1
6-αλλυλο-ο-κρεσόλη	55,8±36,2	162,7±21,3	17,0±2,3	ΔΑ
Υποσύνολο	959,1±235,7	1430,1±94,8	1166,1±136,9	225,8±13,5
ΤΕΡΠΕΝΙΑ				
α - Πινένιο	5,4±0,1	2,7±0,2	16,0±5,5	10,1±2,5
Σαβινένιο	5,5±0,9	13,1±1,2	24,9±3,6	3,5±0,5
β - Μυρσένιο	ΔΑ	6,3±3,4	20,0±5,1	3,5±1,6
ο-κυμένιο	34,7±11,7	52,1±17,5	120,2±18,2	17,6±7,8
dl-Λιμονένιο	97,5±21,8	188,5±31,2	780,3±82,2	109,7±18,9
1,8- Κινεόλη	39,7±15,5	54,4±12,4	57,2±15,4	11,8±5,4
Κυμενένιο	28,8±2,9	30,0±4,1	59,6±1,5	10,9±1,6
Μενθόνη	123,7±49,4	156,1±51,7	308,5±33,7	233,8±30,5
Μενθόλη	16,2±13,0	188,1±56,7	293,5±122,8	250,8±55,1
4-Τερπινεόλη	16,2±13,0	188,1±56,7	293,5±122,8	250,8±55,1
α-τερπινεόλη	16,6±12,9	38,7±15,3	197,4±19,9	ΔΑ
Διυδροκαρβόνη	21,0±17,9	199,2±41,4	2614,4±276,5	452,8±97,8
Καρβόνη	1523,4±859,1	2650,1±741,2	4100,3±642,6	597,5±111,7
Πιτεριτόνη	ΔΑ	ΔΑ	165,3±39,7	90,1±17,4
Καρβακρόλη	55,2±26,7	129,0±22,6	223,1±122,4	45,2±11,6
Υποσύνολο	2022,0±249,0	3838,1±207,9	9312,9±195,2	1855,1±45,5
ΣΥΝΟΛΟ	3365,5±176,5	57665,5±103,0	12338,4±113,5	2462,8±30,2

ΔΑ: Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 17: Ημιποσοστικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων (ppb) δείγματος λαβρακιού συσκευασμένο με μεμβράνη PLA + 2% αιθέριο έλαιο COL και σακούλα PA-PE συναρτήσει του χρόνου συντήρησης.

ΕΝΩΣΗ	ΧΡΟΝΟΣ (ΗΜΕΡΑ)			
	3	5	6	7
ΑΛΚΟΟΛΕΣ				
Αιθανόλη	167,6±3,0	163,7±6,1	154,0±27,2	115,7±29,3
3 μέθυλο, βουτανόλη-1	66,2±38,4	37,9±0,3	102,9±15,0	365,9±49,1
Προπανόλη-1	ΔΑ	ΔΑ	10,3±2,6	17,2±4,5
Υποσύνολο	233,7±38,5	201,6±6,1	267,2±22,0	498,8±40,6
ΚΕΤΟΝΕΣ				
Προπανόνη-2	29,8±0,9	30,3±3,4	26,7±5,6	84,0±2,9
Βουτανόνη-2	19,0±0,1	17,5±1,6	21,5±3,9	52,5±10,0
Πεντανόνη-2	9,9±3,0	10,7±2,8	12,0±0,4	38,6±7,0
4 μέθυλο, πεντανόνη-2	32,1±10,0	24,4±1,6	115,6±10,6	225,6±15,2
2,6 διμέθυλο, επτανόνη-4	8,4±1,3	5,5±1,0	7,1±0,7	4,9±1,7
3- υδρόξυ-2-βουτανόνη (ακετοΐνη)	92,3±16,1	107,7±8,8	77,2±9,1	379,4±132,6
Υποσύνολο	191,5±8,6	196,1±4,5	260,1±7,0	785,0±60,0
ΑΛΔΕΥΔΕΣ				
3 μέθυλο, βουτανάλη	9,8±0,1	8,6±1,1	13,1±7,9	43,8±4,5
Υποσύνολο	9,8±0,1	8,6±1,1	13,1±7,9	43,8±4,5
ΕΣΤΕΡΕΣ				
Αιθυλαιθέρας	10,4±0,5	14,1±1,1	ΔΑ	ΔΑ
Μεθυλεστέρας οξικού οξέος	30,4±1,0	53,6±35,8	31,9±2,7	107,8±27,5
Οξικός αιθυλεστέρας	103,2±18,8	119,5±5,0	122,4±46,4	131,1±53,0
Μεθυλεστέρας του 2-μεθυλο-,	11,0±1,5	ΔΑ	ΔΑ	30,0±4,3

προπανικού οξέος				
Μεθυλεστέρας του βουτανικού οξέος	10,2±0,3	10,5±1,9	8,2±1,1	ΔΑ
Αιθυλεστέρας του 3-μεθυλο-, βουτανικού οξέος	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	24,9±1,9
Μεθυλεστέρας του εξανικού οξέος	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	12,7±2,6
Υποσύνολο	165,2±10,9	197,7±20,9	162,4±89,6	306,4±30,0
ΔΙΑΦΟΡΑ				
Μέθυλο μερκαπτάνη	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	23,8±4,8
Τριμεθυλαμίνη	29,2±9,0	21,8±8,8	27,4±11,9	36,4±8,1
Διμέθυλο σουλφίδιο	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	24,6±9,7
Χλωροφόρμιο	1208,9±128,5	1259,8±178,1	1449,3±246,8	3682,4±66,1
Διμέθυλο, δισουλφίδιο	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	18,8±4,2
3 μέθυλο, πεντάνιο	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	22,6±9,0
Εξάνιο	59,9±61,9	86,6±23,2	29,4±19,5	213,3±113,4
Επτάνιο	703,9±753,5	957,7±398,1	363,4±275,6	526,2±442,5
Τολουόλιο	13,2±1,5	11,6±1,4	8,9±0,9	50,1±12,6
3 μεθυλενο, επτάνιο	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	31,2±3,2
1,3,5 τριμέθυλο βενζόλιο	14,2±2,1	11,6±0,2	17,0±4,2	25,5±2,8
Υποσύνολο	2029,3±343,0	2349,2±195,4	1895,4±165,8	4654,9±146,1
ΤΕΡΠΕΝΙΑ/ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ				
α-πινένιο	11,1±3,8	13,1±0,9	9,3±5,9	55,4±15,8
Καμφένιο	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	10,5±2,3
β-Μυρσένιο	44,5±0,4	31,2±17,0	52,7±13,5	332,2±80,1
β-πινένιο	17,4±3,6	10,1±8,1	7,1±1,9	93,7±10,8
π-κυμένιο	69,6±20,7	66,4±23,8	70,3±23,8	647,6±67,4
dl-Λιμονένιο	48,2±9,7	45,0±13,4	51,8±16,3	416,8±21,7
1,8 κινεόλη	8,8±1,5	8,9±2,3	25,8±7,7	ΔΑ

γ -Τερπινένιο	9,1±0,8	6,8±3,2	10,7±6,4	102,5±8,2
L Λιναλοόλη	365,9±50,8	249,0±111,0	509,8±157,0	1834,2±414,1
Καμφορά	13,4±0,7	7,7±6,2	14,1±4,4	75,5±11,0
Καρβόνη	67,0±66,7	71,8±54,3	61,0±64,3	26,7±10,3
Καρβακρόλη	22,8±17,8	20,8±6,0	30,3±7,1	18,3±9,7
Υποσύνολο	677,8±28,1	530,7±40,6	843,0±54,8	3613,3±135,5
ΣΥΝΟΛΟ	3073,6±155,0	3282,3±89,3	3174,1±88,4	9403,4±95,8

ΔΑ: Δεν Ανιχνεύθηκε

Οι κυριότερες ενώσεις που περιέχονται στα αιθέρια έλαια COL και SPR παρουσιάζονται στους πίνακες 18 και 19, βοηθώντας στην αξιολόγηση των δειγμάτων.

Πίνακας 18: Πτητικά συστατικά αιθέριου ελαίου SPR (Jirovetz et al. 2002)

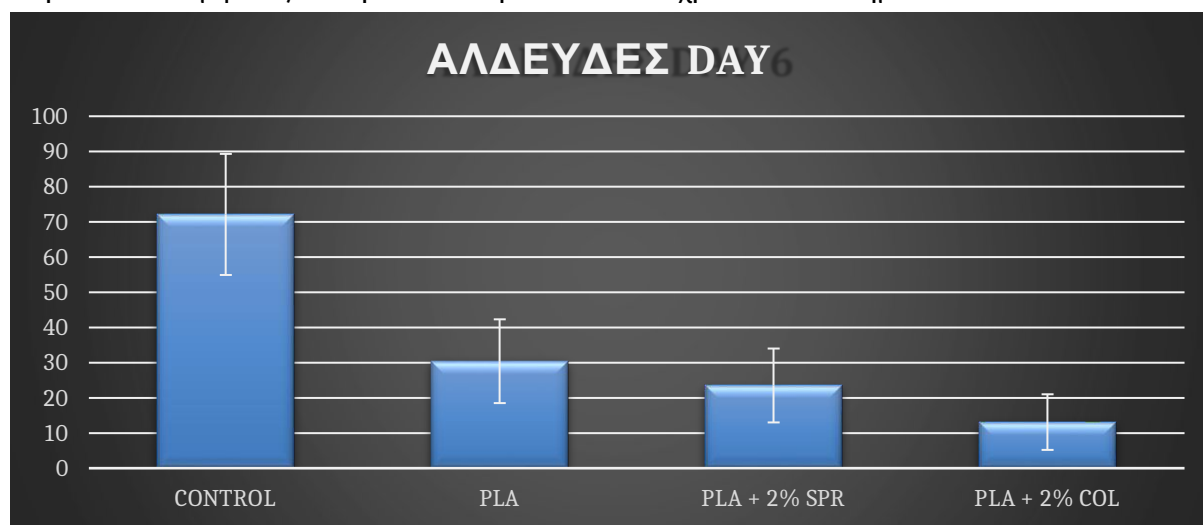
Compound	EO1	SPME2	RI	Compound	EO1	SPME2	RI
3-methyl butanal	0.25	0.37	912	β-bourbonene	0.19	0.12	1518
2-methyl butanal	0.10	0.22	917	linalyl acetate	0.11	0.08	1537
pentanal	nd	0.02	941	β-elemene	0.45	0.37	1572
2-butanol	0.01	0.01	998	trans-dihydrocarvone	0.34	0.31	1601
α-pinene	0.17	0.45	1007	terpinen-4-ol	0.08	0.07	1608
camphene	0.41	0.92	1047	cis-dihydrocarvone	0.27	0.21	1610
β-pinene	0.31	0.22	1072	β-caryophyllene	0.42	0.16	1617
sabinene	0.14	0.05	1108	menthol	0.21	0.56	1623
β-myrcene	0.88	0.36	1143	α-terpineol	0.53	0.36	1657
α-terpinene	0.15	0.09	1149	α-humulene	0.18	0.18	1659
α-phellandrene	0.44	0.24	1151	pulegone	0.24	0.13	1662
δ-3-carene	0.02	0.03	1154	trans-β-farnesene	0.07	0.06	1666
limonene	6.55	8.31	1184	dihydrocarvyl acetate	0.22	0.23	1676
1,8-cineole	4.19	7.12	1219	borneol	0.26	0.18	1694
γ-terpinene	0.12	0.18	1222	germacrene D	1.78	0.92	1711
cis-β-ocimene	0.21	0.06	1225	trans-dihydrocarveol	0.19	0.17	1714
p-cymene	0.52	0.23	1244	bicyclogermacrene	0.06	0.03	1717
cis-3-hexenol	0.04	0.06	1248	carvone	69.34	66.77	1719
trans-β-ocimene	0.56	0.38	1251	cis-dihydrocarveol	0.31	0.19	1726
terpinolene	0.05	0.44	1285	trans-carvyl acetate	1.23	0.99	1758
trans-1-hexen-3-ol	0.66	1.72	1302	trans-carveol	0.66	0.57	1789
hexanol	0.12	0.09	1329	cis-carvyl acetate	0.18	0.14	1796
3-octanol	0.17	0.14	1388	germacrene A	0.23	0.19	1802
trans-sabinene hydrate	0.02	†	1454	cis-carveol	2.14	1.86	1819
α-copaene	0.77	0.45	1475	geraniol	0.87	0.74	1822
linalool	0.48	0.87	1502	cis-jasmone	0.80	0.66	1871

nd=not detected; †=trace compound (< 0.01 percent)

Πίνακας 19: Πτητικά συστατικά αιθέριου ελαίου COL (Ravi et al. 2006)

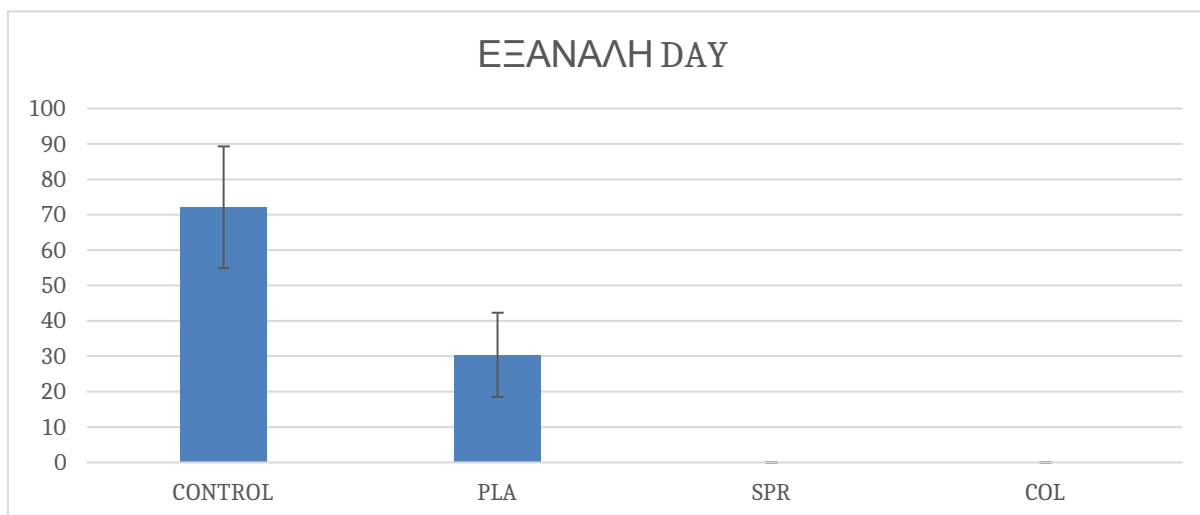
Peak no.	Compounds	Coriander samples								SD
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	
1	A-pinene (AL-PI)	2.81	4.94	6.40	5.10	2.36	6.19	23.23	8.95	6.69
2	B-pinene (B-PI)	0.48	0.52	0.68	0.50	0.31	0.50	1.11	0.74	0.24
3	Myrcene (MYR)	0.37	0.52	0.47	0.53	0.44	0.36	0.64	0.52	0.09
4	Cymene (CYM)	0.42	–	0.47	0.27	0.22	0.49	0.17	0.16	0.17
5	D-Limonene (LIM)	0.22	0.10	0.81	0.31	0.09	0.26	0.10	0.12	0.08
6	Camphene (CAM)	0.08	0.01	0.01	0.16	0.10	0.01	0.30	0.01	0.11
7	Terpinene (TER)	0.15	0.32	0.01	0.13	0.92	0.01	0.01	0.31	0.31
8	Cis linalol oxide (CIS-LI)	0.22	0.27	0.63	0.31	0.01	0.76	–	2.63	0.86
11	Octanol (OCT)	0.16	2.00	0.81	0.19	0.01	0.83	1.78	–	0.79
12	Linalool (LIN)	57.52	69.11	56.71	59.41	75.14	60.99	59.15	66.93	6.56
15	Iso borneol (ISO-B)	0.14	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05
18	Terpineol (TER-ol)	2.02	0.08	0.95	5.37	0.08	3.31	0.09	–	1.97
20	Decanal (DEC)	0.20	0.63	0.30	0.16	0.17	–	0.40	0.55	0.21
21	Cuminal (CUM)	0.54	0.26	0.25	0.13	0.22	0.15	0.17	0.22	0.13
23	Beta citronellol (B-CIT)	0.65	0.01	1.67	0.52	0.01	0.63	–	–	0.58
24	Geraniol (CIS)	2.35	0.61	0.33	3.87	0.01	2.30	0.45	0.94	1.34
25	B-citral (M-CIT)	0.24	0.10	0.01	0.01	0.01	0.38	0.10	0.08	0.13
27	Hexadecanal (HEX)	0.35	0.85	0.38	0.30	0.10	0.10	0.10	0.50	0.26
28	Undecanoic acid (UND)	0.07	0.01	0.01	0.1	0.01	0.13	0.33	–	0.12
31	Tridecanal (TRI)	1.03	0.47	0.97	0.83	0.48	0.76	0.22	0.33	0.30
32	Trans-geraniol (TRANS)	0.15	0.08	0.01	0.11	0.09	0.16	–	–	0.06
33	Geranyl acetate (GER-ACE)	24.51	14.34	24.01	19.76	18.32	19.94	8.95	13.25	5.39
35	Undecanal (UNDEC)	0.13	0.45	–	–	–	–	0.29	0.37	0.19
44	Tetradecanoic acid (TET)	0.92	1.44	1.02	–	0.08	0.16	0.09	0.26	0.52
49	Hexadecanoic acid (HEX)	1.80	0.54	0.91	–	0.14	0.70	0.41	1.54	0.64
		97.53	97.62	97.14	98.21	99.26	99.10	98.08	98.40	–

Όπως παρατηρούμε, βρέθηκαν πάρα πολλά πτητικά συστατικά σε όλες τις ομάδες δειγμάτων, χωρίς να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση μεμονωμένων ουσιών στην αλλοίωση των ψαριών. Για το λόγο αυτό, ομαδοποιήσαμε τις ουσίες με βάση την χαρακτηριστική τους ομάδα ώστε να εξάγουμε κάποια συμπεράσματα, δίνοντας έμφαση στις τελευταίες ημέρες δειγματοληψίας (6^η και 7^η) που είναι καθοριστικές λόγω του ότι εμφανίζεται η αλλοίωση σε εκείνο το χρονικό διάστημα.



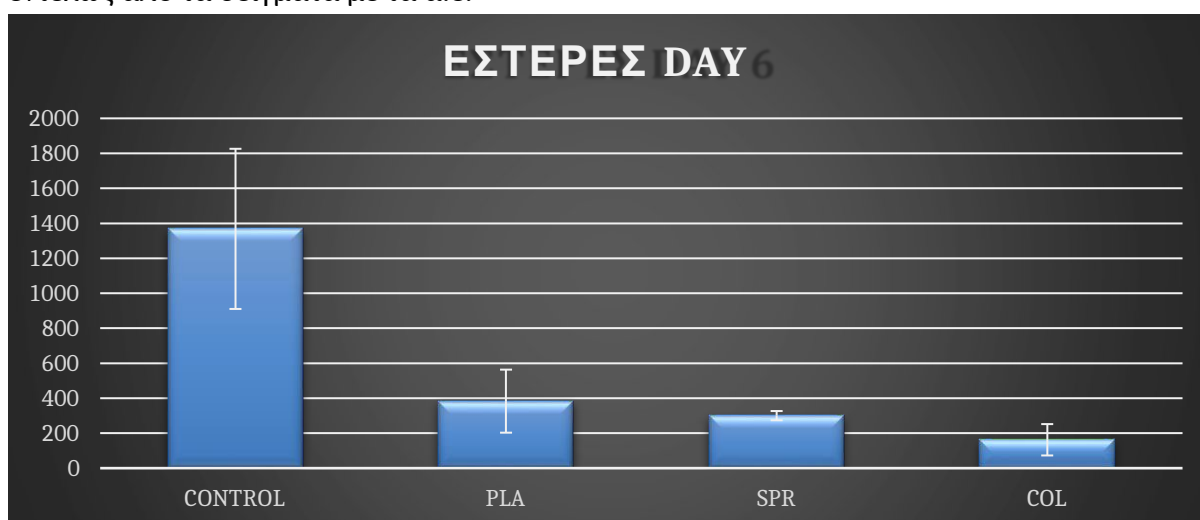
ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 1: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΛΔΕΥΔΩΝ DAY 6

Στο πρώτο ραβδόγραμμα απεικονίζεται το σύνολο των αλδευδών την 6^η ημέρα δειγματοληψίας. Παρατηρούμε ότι έχουμε θετική επίδραση των α.ε στην ποσότητα των αλδευδών, από την οποία συμπεραίνουμε ότι τα αιθερία έλαια επιβραδύνουν την οξείδωση των λιπαρών στα δείγματα ψαριών.



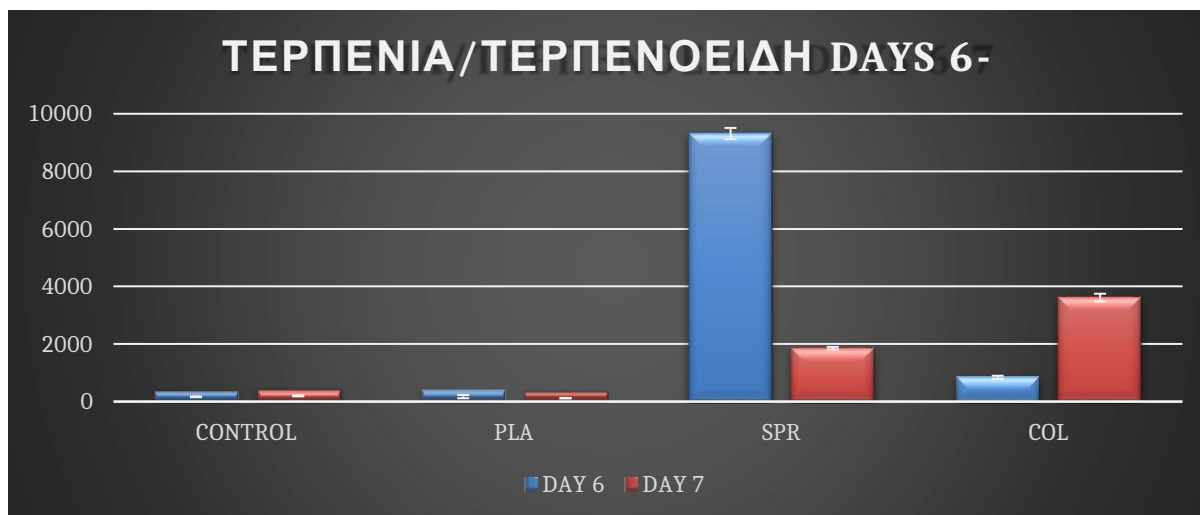
ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 2: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΕΞΑΝΑΛΗΣ DAY 6

Στο επόμενο ραβδόγραμμα απεικονίζεται η ποσότητα μία σημαντικής κατά την αλλοίωση αλδεύδης, της εξανάλης (χαρακτηριστική οσμή μούχλας) την κρίσιμη 6^η ημέρα δειγματοληψίας. Παρατηρούμε αναστολή της ουσίας από τα α.ε καθώς ενώ η ουσία υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες στα δείγματα μάρτυρα και στα δείγματα με PLA, απουσιάζει εντελώς από τα δείγματα με τα α.ε.



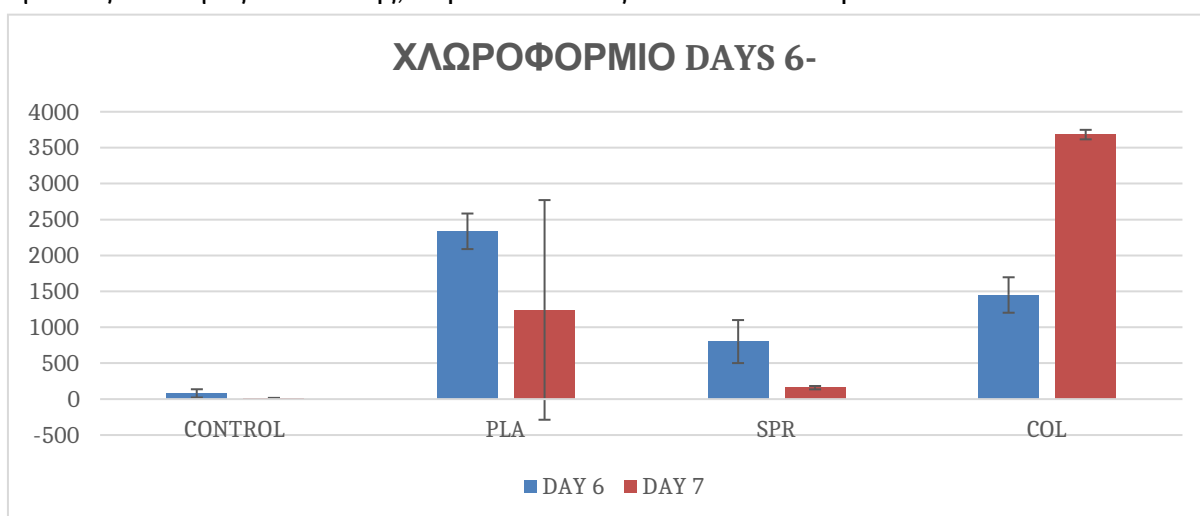
ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 3: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΕΣΤΕΡΩΝ DAY 6

Στο επόμενο ραβδόγραμμα απεικονίζονται παρόμοια αποτελέσματα με τις αλδεύδες και για τους εστέρες την 6^η ημέρα δειγματοληψίας. Τα α.ε λοιπόν, πιθανότατα παρεμβαίνουν και στη δράση των εστεροποιητικών ενζύμων ή αναστέλλουν τα βακτήρια που παράγουν εστέρες.



ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 4: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ/ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ DAYS 6-7

Όσον αφορά τα τερπένια και τερπενοειδή για τις ημέρες δειγματοληψίας 6 και 7, τα δείγματα με τα α.ε εμφανίζουν τεράστιες ποσότητες τερπενίων λόγω των ελαίων. Αυτά δε σχετίζονται άμεσα με αλλοίωση των δειγμάτων αλλά ενδέχεται να καλύπτουν ή να εμποδίζουν οσμές αλλοίωσης, παραπλανώντας τον καταναλωτή.



ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 5: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟΥ DAYS 6-7

Μία ένωση που απουσιάζει από το δείγμα μάρτυρα τις τελευταίες ημέρες δειγματοληψίας αλλά βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στις υπόλοιπες ομάδες δειγμάτων, είναι το χλωροφόρμιο. Αυτό θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης των δειγμάτων, αλλά πιθανότατα οφείλεται στο ότι το χλωροφόρμιο ήταν ο διαλύτης για την παρασκευή των μεμβρανών που περιέχουν PLA.

Για άλλες σημαντικές ουσίες αλλοιώσεις όπως η ΤΜΑ, δεν μπορέσαμε να εξάγουμε διαφωτιστικά συμπεράσματα.

Ως γενικό συμπέρασμα από τα αποτελέσματα των πτητικών εξάγονται τα εξής:

- Η συσκευασία PLA εμπλουτισμένη με αιθέρια έλαια, φαίνεται να επιβραδύνει αποτελεσματικά την παραγωγή αλδευδών και εστέρων.
- Οι υψηλές συγκεντρώσεις τερπενοειδών επιβεβαιώνουν τη μεταφορά και δράση των αιθέριων ελαίων μέσα στο τρόφιμο και μπορούν να παραπλανήσουν τον καταναλωτή όσον αφορά την αλλοίωση του ψαριού.

Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζονται και σε παλαιότερες μελέτες. Οι **Miyasaki et al. (2011)** μελέτησαν την μεταβολή των πτητικών ενώσεων στο φρέσκο κρέας ψαριού κατά τη διάρκεια 3 έως 4 ημερών αποθήκευσης σε πάγο για διάφορα είδη ψαριών. Η ανάλυση SPME-GC/MS έδειξε ότι ορισμένες αλδεΐδες και αλκοόλες όπως η 1-επτανόλη, (E)-2-οκτενάλη, (E)-2-εξανάλη, η 1-πεντανόλη, (E,E)-2,4 επταδιενάλη, 2,4-εξαδιεναλη, η 1-εξανόλη, η 4-επτενάλη, και άλλες αυξάνονταν με μεγάλο ρυθμό στο σκουμπρί και στο χούφταρο, με μικρότερο στο αφρόψαρο και ακόμη μικρότερο ρυθμό στην κόκκινη σφυρίδα και στο ψάρι φούσκα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η Εξανάλη ήταν μια κυρίαρχη ένωση που αυξήθηκε από την αρχή της αποθήκευσης στο σκουμπρί. Η αύξηση των πτητικών ενώσεων ήταν μικρή στη σφυρίδα και τη φούσκα. Η αύξηση αυτών των αλδευδών και αλκοολών θεωρήθηκε ότι ήταν ένας κατάλληλος δείκτης για την παρακολούθηση της φρεσκάδας του «φρέσκου» ψαριού, εκτός από τα ψάρια με λευκή σάρκα.

Οι **Guillen et al. (2002)** μελέτησαν τα πτητικά συστατικά του ωμού και καπνιστού μαύρου λαβρακιού και πέστροφας, με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεής φάσης και της αέριας χρωματογραφίας αερίου/ φασματομετρίας μάζας. Στο λαβράκι η κύρια ομάδα πτητικών είναι οι αλδεΐδες (εξανάλη: λιπαρότητα και οσμή χόρτου, επτανάλη: ξύλο, λίπος, καρύδι, βενζαλδεΐδη: κρεμώδες, καρυδένιο, οκτανάλη, δεκανάλη κλπ.). Ανίχνευσαν και οξέα, εστέρες, φαινολο-παράγωγα κ.α. Στην πέστροφα εκτός από τις κορεσμένες αλδεΐδες που παρατηρήθηκαν σε παρόμοιες ποσότητες με το λαβράκι, βρέθηκε μόνο οξικό οξύ, λίγες κετόνες και 3 αλκοόλες (1 πεντεν-3-όλη, 1 οκτεν-3-όλη, 2 αίθυλ-1- εξανόλη). Εστέρες βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο λαβράκι.

Οι **Almeida et al. (2010)** αξιολόγησαν τα πτητικά συστατικά της *Mentha spicata* L. και τη σύσταση του εκχυλίσματος. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων μέντας ανίχνευσε πολλές ενώσεις με βιομηχανικό ενδιαφέρον όπως η καρβόνη, η κινεόλη και η πουλεγκόνη οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και στην παρούσα έρευνα στα δείγματα λαβρακιού συσκευασμένα σε μεμβράνες εμπλουτισμένες με αιθέριο έλαιο SPR.

Αντίστοιχα, οι **Ravi et al. (2007)** μελέτησαν το χαρακτηρισμό του αρώματος δειγμάτων ελαίου COL (*Coriandrum sativum* L.). Η λιναλοόλη ήταν το κύριο συστατικό σε όλα τα δείγματα, ακολουθούμενη από τον οξικό γερανυλεστέρα και το α-πινένιο, ενώσεις που βρέθηκαν και στην παρούσα έρευνα στα δείγματα λαβρακιού συσκευασμένα σε μεμβράνες εμπλουτισμένες με αιθέριο έλαιο COL.

4. Συμπεράσματα

Οι μεμβράνες φαίνεται ότι είναι μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική στις υπάρχουσες επικρατούσες συσκευασίες, η οποία μπορεί να υπερβεί την εξειδικευμένη αγορά των λειτουργικών τροφίμων. Η χρήση φυσικών αντιμικροβιακών/αντιοξειδωτικών μέσω των αιθέριων ελαίων σε συνδυασμό με τις μεμβράνες αυτές αποτελεί ένα νέο στοίχημα και αντικείμενο μελέτης για τη συντήρηση τροφίμων, με τελικό στόχο την εφαρμογή του στη βιομηχανία. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί μεμβρανών/ελαίων που μπορούν να μελετηθούν για τη μεγιστοποίηση της επιμήκυνσης του χρόνου ζωής του εκάστοτε τροφίμου. Στη συγκεκριμένη μελέτη λάβαμε τα εξής συμπεράσματα:

- Η κυρίαρχη μικροχλωρίδα των φιλέτων λαβρακιού αποτελούνταν από την *O.M.X*, τις *Pseudomonas* spp., τα βακτήρια που παράγουν H_2S (*Shewanella*) και εμφανίστηκαν σε πολύ μικρότερο βαθμό LAB επειδή η συσκευασία μας δεν ήταν αναερόβια (MAP, κενό). Οι *Pseudomonas* ακολούθησαν παρόμοια πορεία με την *OMX*.
- Από τη μελέτη του μικροβιακού προφίλ των δειγμάτων φιλέτου λαβρακιού κατά την εφαρμογή των μεμβρανών, η παρουσία αιθέριων ελαίων SPR και COL στις μεμβράνες είχε θετική επίδραση, με το αιθέριο έλαιο COL να προκαλεί τη μεγαλύτερη αναστολή σε όλους τους μικροοργανισμούς.
- Από τις κλασικές χημικές αναλύσεις, συμπεράναμε ότι
 - α) και τα δύο έλαια είχαν εξίσου καλή ανασταλτική δράση στην ποσότητα της TMA, καθώς ενώ το δείγμα μάρτυρας ξεπέρασε το επιτρεπτό όριο την ημέρα 7, τα δείγματα με τα έλαια παρέμειναν αρκετά κάτω από το όριο.
 - β) και τα δύο έλαια είχαν εξαιρετική ανασταλτική δράση στην ποσότητα του TVBN, καθώς το επιτρεπτό όριο στα δείγματα με τη μεμβράνη και το έλαιο ξεπεράστηκε **2 μέρες μετά** από το δείγμα μάρτυρα. Επίσης το TVBN ακολούθησε σε όλες τις συσκευασίες παρόμοια πορεία με την *O.M.X* και τις *Pseudomonas*, δείχνοντας έτσι τη

συσχέτισή του με τη ανάπτυξή τους, καθιστώντας τον σημαντικό μικροβιακό μεταβολίτη για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

γ) Οι ποσότητες του TBA ήταν ήδη υψηλές συγκριτικά με το προτεινόμενο όριο από την πρώτη μέρα δειγματοληψίας, αλλά παρόλα αυτά, τα δείγματα με τη μεμβράνη και το έλαιο έφτασαν σε χαμηλότερα επίπεδα από το control.

- Η συσκευασία PLA εμπλουτισμένη με αιθέρια έλαια, ιδιαίτερα με COL, φαίνεται να επιβραδύνει αποτελεσματικά την παραγωγή πτητικών ενώσεων που σχετίζονται με αλλοίωση.

5. Μελλοντικές Προτάσεις

Οι μεμβράνες PLA λόγω της φυσικής και φύσης τους, μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στο κομμάτι της βιωσιμότητας, αφήνοντας μηδενικό αποτύπωμα στο περιβάλλον, λόγω της ικανότητας βιοδιάσπασής τους.

Η ανάπτυξη και η προοπτική που ανοίγεται για την παραγωγή αντιβακτηριδιακών μεμβρανών καθώς και όλα τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν, παρεμποδίζονται από το σημαντικό πρόβλημα του υψηλού τους κόστους, κόστος που φτάνει 3-5 φορές πιο υψηλό από αυτό των πλαστικών πολυμερών.

Μέσα από την έντονη προσπάθεια των επιστημονικών ομάδων, το πρόβλημα του κόστους αναμένεται σταδιακά να επιλυθεί. Αν στον τομέα της συσκευασίας ο 20ος αιώνας ήταν ο αιώνας του πλαστικού, ο 21ος αιώνας θα είναι ο τομέας των φυσικών αντιμικροβιακών συσκευασιών.

Η παραγωγή των μεμβρανών σε βιομηχανική κλίμακα, απαιτεί στο μέλλον την προσπάθεια συστηματοποίησης και σχεδιασμού κατάλληλης γραμμής παραγωγής για να τυποποιηθεί τόσο το προϊόν όσο και η διαδικασία.

Για να γίνει αποδεκτή μία νέα συσκευασία, κρίνεται απαραίτητη η ύπαρξη των κατάλληλων ιδιοτήτων και η σταθερή αντιμικροβιακή/αντιοξειδωτική δράση της. Επομένως, η συνεργιστική δράση φυσικών μεμβρανών και αιθέριων ελαίων απαιτεί ακόμα μεγαλύτερη μελέτη, με τη δοκιμή διαφορετικών συνδυασμών μεμβρανών και ελαίων αλλά ακόμα και την ταυτόχρονη ενσωμάτωση στις μεμβράνες δύο ή και περισσότερων ελαίων, με στόχο την μεγαλύτερη δυνατή επιμήκυνση της διάρκειας ζωής του τροφίμου.

Σε ερευνητικό επίπεδο μελλοντικά, μεγάλο ενδιαφέρον εμφανίζει η προσπάθεια ενσωμάτωσης νανουλικών σε μεμβράνες όπως αυτή του PLA. Μπορεί να εξεταστεί δηλαδή η χρήση νανοσωματιδίων που ενισχύονται με αιθέρια έλαια, τα οποία σωματίδια μπορούν να προσφέρουν μακροχρόνια απελευθέρωση των δραστικών συστατικών. Επίσης, η χρήση τεχνικών όπως η μικροενθυλάκωση, προσφέρεται για καλύτερο έλεγχο της απελευθέρωσης των δραστικών ενώσεων.

Επιπλέον, αντί για αιθέρια έλαια, μπορεί να εξεταστεί η χρήση μεταβιοτικών (postbiotics) (προϊόντων ζύμωσης από προβιοτικά), τα οποία έχουν αντιμικροβιακές και συντηρητικές ιδιότητες, καθώς και η συνεργιστική τους δράση με αιθέρια έλαια για την επιμήκυνση της ζωής του φιλέτου λαβρακιού. Τα postbiotics είναι κατάλληλα για τρόφιμα (food-grade) και βιοαποικοδομήσιμα, οπότε οδηγούν σε μία εφικτή ερευνητική διαδρομή.

Τέλος, ενδιαφέρουσα προοπτική εμφανίζει η χρήση της τεχνολογίας απορρόφησης/ απελευθέρωσης αερίων με τη χρήση συσκευασιών που απορροφούν οξυγόνο (O_2 scavengers) ή απελευθερώνουν διοξείδιο του άνθρακα (CO_2 emitters) για να διατηρούν καλύτερα το τροφικό περιβάλλον. Η τεχνολογία αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσουμε μια συσκευασία όπου τα αιθέρια έλαια ενεργοποιούνται μόνο όταν το επίπεδο οξυγόνου ή άλλων αερίων ξεπεράσει ένα όριο, διατηρώντας έτσι την ποιότητα για μεγαλύτερο διάστημα.

6. Βιβλιογραφία

Ιστοσελίδες

Quality and quality changes in fresh fish - 8. Assessment of fish quality (fao.org)

<http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768E/T1768E04.htm>

<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/91dc1ed4-6450-4a3c-8cab-45009644715c>

Ελληνική

Αμπραχίμ, Α. (2006) Υγιεινή των αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις. Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Αναγνωστόπουλος (2015) Προπτυχιακή διπλωματική εργασία: Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus* στους 10oC. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος

Αρβανιτογιάννης, Ι., Σάνδρου, Δ. & Κούρτης, Λ. (2001) Ασφάλεια Τροφίμων. Εφαρμογή της Ανάλυσης Επικινδυνότητας και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP) Στις Βιομηχανίες Τροφίμων και Ποτών. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Βασιλειάδου Σ. (2006) Τεχνολογία και ποιοτικός έλεγχος αλιευμάτων. Σημειώσεις θεωρίας του τμήματος Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών. Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης, παράρτημα Ν. Μουδανιών.

Βασιλειάδου, Σ. (2002) Ποιοτική αξιολόγηση και μεταποίηση της σάρκας της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.). Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Βέρδος (2014) Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία: «Μικροβιακή αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής, απεντερωμένων εκτρεφόμενων ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) κατά τη συντήρηση υπό ψύξη» Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος

Ιωάννου Αθηνά-Δήμητρα (2012) Διπλωματική Εργασία: «Διερεύνηση της μικροβιολογικής

κατάστασης της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) από ιχθυοπωλεία στην Καρδίτσα» Τμήμα Κτηνιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας σε σύμπραξη με το ΤΕΙ Ηλείου.

Λαζογεώργου και Μάκου (1998) Πτυχιακή εργασία: «Οργανοληπτικές και βιοχημικές μεταβολές στο είδος *sparus auratus* (τσιπούρα) σε ψύξη» ΤΕΙ Μεσολογγίου Σχολή Τεχνολόγων Γεωπονίας Τμήμα Ιχθυοκομείας/ Αλιείας

Λουλούδα (2021) Μεταπτυχιακή διατριβή: «Περιγραφή της ποιότητας ιχθυηρών με τη χρήση μικροβιολογικών οργανοληπτικών μεθόδων και ταχείων τεχνολογιών»

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων Και Διατροφής Του Ανθρώπου

Μπλούκας, Ι. Γ. (2004). «Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων». Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή. pp. 21-43. Κεφάλαιο 9: Ψύξη. pp. 219-246. Εκδόσεις Σταμούλη.

Μποζιάρης, Ι. Σ. (2010). Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Έκδοση 2. Κεφάλαιο 2: Μεταθανάτιες μεταβολές. 36. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

Πανέτσος, Α. (1978) Υγιεινή Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης. Τόμος Α', Θεσσαλονίκη. Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία

Σακελλαρίου (2017) ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: “Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*) κατά την αποθήκευση τους σε υπέρψυξη.” Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών , Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος

Σαρρής, Κ., Ηλιάδης, Ν., Μπουρτζή-Ζατζοπούλου, Ε. & Κουμπατή-Αρτοποιού, Μ. (2004) «Μαθήματα Γενικής και Ειδικής Μικροβιολογίας». Πανεπιστημιακές σημειώσεις. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Μπαδέκα Α (2022), «Σημειώσεις Συσκευασίας Τροφίμων» ΠΜΣ Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Φράγκος (2007) Διατριβή μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης: «Επίδραση του συνδυασμού της ελαφριάς αλάτισης και ριγανέλαιου στον χρόνο ζωής φρέσκων φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας, συσκευασμένων υπό κενό και διατηρημένων υπό ψύξη». Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών , Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος

- Aberoumand, A. (2010) A Review on *Pseudomonas* in Marine Fish. World Journal of Fish and Marine Sciences, 2(4), 291-296.
- Ackman, R. G. & Gunnlaugsdottir, H. (1992) Seafoods and Fishery Byproducts: Natural and Unnatural Environments for Longer Chain Omega -3 Fatty Acids. In: A. J. St. Angelo (ed) Lipid Oxidation in Food, pp. 298-230. American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Ackman, R. G. (1995) Composition and Nutritive Value of Fish and Shellfish Lipids. In: A. Ruiter (ed.) Fish and Fishery Products, Composition, Nutritive Properties and Stability, pp. 117-156. Cab International, Wallingford, UK.
- Ågren, J. J. & Hänninen, O. (1993) Effects of cooking on the fatty acids of three freshwater fish species. Food Chemistry, 46, 377-382.
- Alirezalu, K., Pateiro, M., Yaghoubi, M., Alirezalu, A., Peighambardoust, S.H., Lorenzo, J.M., (2020). Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and technofunctional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review. Trends Food Sci. Technol., 100, 292-306.
- Almeida, P.P., Mezzomo, N. & Ferreira, S.R.S. (2012) Extraction of *Mentha spicata* L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. *Food Bioprocess Technol* 5, 548-559
- Aminzare, M., Hashemi, M., Hassanzad Azar, H., Hejazi, J., (2016). The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products: A review. J. Human, Environ. Heal. Promot., 1, 63-74.
- Anita D, Sharad A, Amanjot K, Ritu M., (2014). Antioxidant profile of *Coriandrum sativum* methanolic extract. Int Res J Pharm, 5, 220-4.
- Antoine, F. R., Wei, C. I., Otwell, C. A., Sims, R. C., Littell, R. C., Hogle, A. D., Marshall, M. R. (2002). TVB-N correlation with odor evaluation and aerobic plate count in Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*). Journal of Food Science, 67(9)
- Armstrong, G. S., Wyllie, S. G & D. N. Leach (1994) Effects of preservation by gamma - irradiation on the nutritional Quality of Australian fish. Food Chemistry, 50, 351-357.
- Arrieta, M. P., López, J., Hernández, A., & Rayón, E. (2014). Ternary PLA-PHB-Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. European Polymer Journal, 50(1), 255-270.
- Ashie I. N. A., Smith J. P., Simpson B. K. 1996 Spoilage and self-life extension of fresh fish and shelfish. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36(1-2), 87-121.

Ates DA, Erdogrul OT. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turk J Biol* 2003, 27, 157- 162.

Audley M.A., Shetty K.J., Kinsella J.E. (1978). Isolation and properties of phosphilase A from Pollock muscle. *J. Food Sci.*, 43, 1771-1775.

Botta, D., Pirri, L. C., & Mantica, E. (1984). Ground Water Pollution by Organic Solvents and their Microbial Degradation Products. In *Analysis of Organic Micropollutants in Water* (pp. 261-275). Springer Netherlands.

Bowman, J. P. (2001) Methods for Psychrophilic bacteria. *Methods in Microbiology* (30): 591-614.

Bozal, N., Montes, M. J., Tudela, E., Jimenez, F., and Guinea, J. (2002). *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 195-205.

Boziaris, I., Kordila, A., Neofitou, C. (2011). Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 887-895.

Brahmi, F., Khodir, M., Mohamed, C., Pierre, D., (2017). Chemical composition and biological activities of *Mentha* species. In: El-Shemy, H. (Ed.), *Aromatic and Medicinal Plants Back to Nature*. InTechOpen Limited, London, UK, pp. 37-72.

Brettar, I., R. Christen, and M. G. Hofle. (2002). *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 2211-2217.

Burdock G.A., Carabin I.G. (2009). Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food Chem Toxicol*, 47, 22-34.

Chomnawang, C., Nantachai, K., Yongsawatdigul, J., Thawornchinsombut, S., & Tungkawachara, S. (2007). Chemical and biochemical changes of hybrid catfish fillet stored at 4°C and its gel properties. *Food Chemistry*, 103, 420-442.

Chu Z, Zhao T, Li L, Fan J, Qin Y (2017). Characterization of Antimicrobial Poly (Lactic Acid)/Nano-Composite Films with Silver and Zinc Oxide Nanoparticles. *Materials* (Basel). 2017 Jun 16;10(6):659.

Connell, J. J., & Howgate, P. F. (1969). Sensory and objective measurements of the quality of frozen stored haddock of different initial freshnesses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20(8), 469-476. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740200805>

Dainty, R. H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 19-33.

Dalgaard, P., Gram, L., Huss, H. H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 283-294.

Delaquis, R. J., Stanich, K., Girard, B., & Massa, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol*, 74, 101-109.

Drosinos, E. H., Lambropoulou, K., Mitre, E., & Nychas, G. J. E. (1997). Attributes of fresh gilthead seabream (*Sparus aurata*) fillets treated with potassium sorbate, sodium gluconate and stored under a modified atmosphere at 0±1 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 569-575.

Ed-Dra, A., Filai, F.R., Bou-Idra, M., Zekkori, B., Bouymajane, A., Moukrad, N., Benhallam, F., Bentayeb, A., 2018. Application of *Mentha suaveolens* essential oil as an antimicrobial agent in fresh turkey sausages. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 6, 7–12.

Erkan, N., & Özden, Ö. (2008). Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1549-1559.

FAO. (1986) Fisheries Technical Papers-T142. The production of fish meal and oil. Fisheries Industries Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6899E/X6899E00.HT>

FAO. (2005) Post-harvest changes in fish. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy. <http://www.fao.org/fishery/topic/12320/en>

Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 367–392.

P.E. Fathima (2018), Satyen Kumar Panda, P. Muhamed Ashraf, T.O. Varghese, J. Bindu, Polylactic acid/chitosan films for packaging of Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*), *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 117, 2018, Pages 1002-1010, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.214>.

FDA, 2020. Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Substances generally recognized as safe. <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/182.20> (accessed 5.8.20)

Foods, APHA Technical Committee on Microbiological Methods for. (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4.

Forbes, A. B., Sahm, F. D. & Weissfeld, S. A. (2002) Diagnostic Microbiology, 11th edn. Mosby, Inc. St. Louis, Missouri.

Fraser O., Sumar S. (1998) Compositional changes and spoilage in fish. *Nutr. Food Sci.*, 5, 275-279.

Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Biluđić, T., Kređić, G., Stulić, V., Barba, F.J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., & Repek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res. Int.*, 113, 245–262.

Gökoğlu, N., Cengiz, E., & Yerlikaya, P. (2004). Determination of the shelf-life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Food Control*, 15, 1-4.

Goulas, A. E., & Kontominas, M. G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93(3), 511–520.

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

Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 262-266.

Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., & Galotto, M.J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.*, 146, 144–150.

Guillén, M.D. and Errecalde, M.C. (2002), Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 82: 945-952.

Guzman, A., Gnutek, N., & Janik, H. (2011). Biodegradable Polymers for Food Packaging – Factors Influencing Their Degradation and Certification Types – Chemistry and Chemical Technology, 5(1), 115–122.

Haard, N. F. (1995) Composition and Nutritive Value of fish Proteins and Other Nitrogen Compounds. In: A. Ruiter (ed.) *Fish and Fishery Products, Composition, Nutritive Properties and Stability*, pp. 77-116. Cab International, Wallingford, UK.

Hansen T.L., Gill T., Rontved S.D., Huss H.H (1996) Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Res. Int.*, 29, 181-186.

Heipieper, H. J., Keweloh, H., & Rehm, H. J. (1991). Influence of phenols on growth and

membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1213-1217.

Herbert R.A., Hendrie M.S., Gibson D.M., & Shewan J.M. (1971) Bacteria active in spoilage of certain seafoods. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 41-45.

Herrera, F. C., Santos, J. A., Otero, A., & Garcia-Lopez, M.-L. (2006). Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), 527-536.

Mojtaba Heydari-Majd, Babak Ghanbarzadeh, Mostafa Shahidi-Noghabi, Mohammad Ali Najafi, Mohammadyar Hosseini (2019), A new active nanocomposite film based on PLA/ZnO nanoparticle/essential oils for the preservation of refrigerated *Otolithes ruber* fillets, *Food Packaging and Shelf Life*, Volume 19, 2019, Pages 94-103, ISSN 2214-2894, <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.002>.

Holub, B. J. (1992) Potential health benefits of the omega-3 fatty acids in fish. In: G. Bligh (ed.) *Seafood Science and Technology*, pp. 40-45. Fishing News Books: a division of Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford, London, Edinburgh, Cambridge (USA), Carlton-Victoria (Australia).

Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Editorial. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), vii.

Huss, H. H. (1995) Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries technical paper* - 348. Rome-

Ivanova, E. P., T. Sawabe, N. V. Zhukova, N. M. Gorshkova, O. I. Nedashkovskaya, K. Hayashi, G. M. Frolova, A. F. Sergeev, K. G. Pavel, V. V. Mikhailov, & D. V. Nicolau. (2003). Occurrence and diversity of mesophilic *Shewanella* strains isolated from the North-West Pacific Ocean. *Syst. Appl. Microbiol.*, 26, 293-301.

Jamshidian, M., Tehrani, E. A., Imran, M., Jacquot, M., & Desobry, S. (2010). Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 552-571.

Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology*. Sixth Edition. Part III: Microorganisms in Foods. Sea Foods. 101-113. Part V: Indicators of Food Safety and Quality-Principles of Quality Control and Microbial Criteria. 387-442.

Jayasena, D.D., & Jo, C., 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 34, 96-108.

Jørgensen, B. R., Gibson, D. M., Huss, H. H. (1988). Microbiological quality and shelf-life

prediction of chilled fish. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 295-307

Ju J, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W (2019). Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(15):2467-2480.

Keskin D, & Toroglu S. (2011). Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. *J Environ Biol*; 32, 251-6.

Kinsella, E. J. (1986) Food Components with Potential Therapeutic Benefits: The n-3 Polyunsaturated Fatty Acids of Fish Oils. *Food Technology*, February, 89-97, 146.

Kocatepe, D., Turan, H., Altan, C. O., Keskin, İ., Ceylan, A., Köstekli, B., & Candan, C. (2019). Influence of different essential oils on marinated anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) during refrigerated storage. *Food Science and Technology*, 39(suppl 1), 255–260.

Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, 26(5), 475–482.

Lambert, A. D., Smith, J. P., & Dodds, K. L. (1991). Shelf-life extension and microbiological safety of fresh meat: a review. *Food Microbiology*, 8, 267-297.

Leisner, J. J., & Gram, L. (1999) Spoilage of fish, *Encyclopedia of Food Microbiology*, ed. by Robinson RK, Batt CA and Patel PD. Academic Press, San Diego, CA, pp. 813– 820

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E.P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J.B. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties.

Leistner, L., & Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6,41–46.

Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.*, 112, 77–83.

Liston, J. (1980) Microbiology in fishery science. In: Connell, J.J. (ed.) *Advances in fishery science an technology*, pp. 138-157. Fishing News Books Ltd., Farnham, England.

Lougovois, V. P., Kyranas, E. R., & Kyranas, V. R. (2003). Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, 36, 551-560.

Love, R. M. (1992) Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. In: G. M. Hall (ed.) *Fish Processing Technology* (1st Ed.), pp. 1-30. Blackie Academic & Professional,

London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.

Mengoli, A. (1994) Qualità Nutrizionali del muscolo di Pesce (Nutritional qualities of fish muscle). *Industrie Alimentari*, XXXIII, dicembre, 1221-1228.

Miyasaki, T., Hamaguchi, M. and Yokoyama, S. (2011), Change of Volatile Compounds in Fresh Fish Meat during Ice Storage. *Journal of Food Science*, 76: C1319-C1325.

Mol, S., Erkan, N., Üçok, D., & Tosun, Ş. Y. (2007). Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Foods*, 18, 120-128.

Montville, J. T., & Matthews, K. R. (2010). *Food Microbiology*. Chapter 6: Micro-organisms: Indicators and Microbiological Criteria. Sna. 85-86. Chapter 24: Natural Methods of Food Preservation. page. 390.

Mossel D.A.A., Corry J.E.L., Struijk, C.B., & Baird R.M. (1995) *Essentials of the Microbiology of Foods: a textbook for advanced studies*. Wiley, England, pp. 175-214

Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., Pateiro, M., Lucini, L., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2020). Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: An overview. *Curr. Opin. Food Sci.*, 31, 81-87.

Malek Abdul, Nur Syazwani & Faizuwani, M & Khusaimi, Zuraida & Bonnia, N.N & Rusop, M & Asli, Noor. (2021). Preparation and Characterization of Biodegradable Polylactic Acid (PLA) Film for Food Packaging Application: A Review. *Journal of Physics: Conference Series*. 1892. 012037. 10.1088/1742-6596/1892/1/012037.

Nanasombat S, & Lohasupthawee P. (2005). Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. *KMITL Sci Tech J.*, 5, 527-38.

Nettleton, J. A., & Exler, J. (1992). Nutrients in wild and farmed fish and shellfish. *Journal of Food Science*, 57(2), 257-260.

Nikmaram, N., Budaraju, S., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Cox, R. B., Mallikarjunan, K., & Roohinejad, S. (2018). Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Sci.*, 145, 245-255.

Nogi, Y., C. Kato, & Horikoshi, K. (1998). Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 170, 331-338.

Nychas, E. G.-J., Marshall, L. D., & Sofos, N. J. (2007). Meat, Poultry, and Seafood. In: Doyle, M. P. & Beuchat, L. R. (eds) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd edn. p.p. 105-140. ASM Press, Washington, D.C.

- Ogunsona, E. O., Muthuraj, R., Ojogbo, E., Valerio, O., & Mekonnen, T. H. (2020). Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. *Applied Materials Today*, 18, 100473.
- Ólafsdóttir, G., & Jónsdóttir, R. (2009). Volatile aroma compounds in fish. In *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis* (pp. 97–117). CRC Press.
- Ólafsdóttir, G., Lauzon, H. L., Martinsdóttir, E., & Kristbergsson, K. (2006). Influence of storage temperature on microbial spoilage characteristics of haddock fillets (*Melanogrammus aeglefinus*) evaluated by multivariate quality prediction. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 112-125.
- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, J., Mackie, I. M., Henahan, G., Nielsen, J., & Nielsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 8, Issue 8, 1997, Pages 258-265
- Olafsdottir, G. and Fleurence, J. (1998). Evaluation of fish freshness using volatile compounds - Classification of volatile compounds in fish. In *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry, Proceedings of the Final meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness"* AIR3 CT94 2283. Nantes Nov 12–14, 1997. International Institute of Refrigeration.
- Olley, J., Doe, P. E. & Heruwati, E. S. (1988). The influence of drying and smoking on the nutritional properties of fish: an introductory overview. In: J. R. Burt (ed.) *Fish Smoking and Drying, The Effect of Smoking and Drying on the Nutritional Properties of Fish*, pp. 1-21. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Oumzil, H., Ghouami, S., Rhajaoui, M., Ilidrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faid, M., & Benjouad, A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phyther. Res.*, 16, 727–731.
- Özogul, F., Kuley, E., & Özogul, Y. (2007). Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in aluminium foil at 2 ± 1 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 903-909.
- Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S., & Özogul, F. (2009). Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Food Chemistry*, 114, 505-510.
- Panjwani D, Mishra B, & Banji D. (2010). Time dependent antioxidant activity of fresh juice of leaves of *Coriandrum sativum*. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 2, 63-6.

Parlapani F.F., Meziti A., Kormas Ar.K., & Bozaris S.I. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology*, 33, 85-89.

Parlapani, F. F., Malouchos, A., Haroutounian, S. A., & Bozaris, I. S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 153-163.

Parth N. Patel, Khushboo G. Parmar, Alpesh N Nakum, Mitul N Patel, Palak R Patel, Vanita R Patel, Dr. Dhrubo Jyoti Sen Shri (2011) Sarvajani Pharmacy College, Gujarat Technological University, Arvind Baug, Mehsana-384001, Gujarat, India.

Pateiro, M., Barba, F.J., Domínguez, R., Sant'Ana, A.S., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., Gómez, Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Sant'Ana, A. S., Domínguez, R., Rodríguez-Lázaro, D., & Lorenzo, J. M. (2021). Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108966.

Pearson, D. (1976) *The Chemical Analysis of foods* (7th ed.) pp.383-389. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York.

Pierson, D. M., Zink, L. D. & Michele Smoot, L. (2007) *Indicator Microorganisms and Microbiological*

Potter, T. L., & Fagerson, I. S. (1990). Composition of coriander leaf volatiles. *J Agric Food Chem.*, 38, 2054-6.

Prakash, O., Chandra, M., Pant, A.K., & Rawat, D.S. (2016). Mint (*Mentha spicata* L.) oils, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, London, UK, pp. 561-572.

Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N. (2010). Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. *Journal of Food Science*, 75(7), M406-M411.

Raal, A, Arak ,E, & Orav, A. (2004). Chemical composition of coriander seed essential oil and their conformity with EP standards. *Agraarteadus*, 15, 234-9.

Ravi, R., Prakash, M. & Bhat, K. (2007) Aroma characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil samples. *Eur Food Res Technol* 225, 367-374.

Ringø, E., & Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160(3-4), 177-203.

Romeilah, R. M., Fayed, S. A., Mahmoud, G. I. (2010). Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *J Appl Sci Res.*, 6, 50-62.

Sallam, K. I. (2007). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry*, 101, 592-600.

Sánchez-García, F., Machado, N. D., Tirado-Fernández, M., Cejudo-Bastante, C., Roldán, A. M., Mantell-Serrano, C., & Casas-Cardoso, L. (2025). Hake Fish Preservation Using Plant-Based Impregnated Polylactic Acid Food Films as Active Packaging. *Applied Sciences*, 15(2), 643. <https://doi.org/10.3390/app15020643>

Saranraj, P., & Devi, D. (2018). Essential oil and its antibacterial properties - A Review. *Life Sci. Arch.*, 3, 994-1011.

Scaffaro, R., Maio, A., Sutura, F., Gulino, E. F., & Morreale, M. (2019). Degradation and Recycling of Films Based on Biodegradable Polymers: A Short Review. *Polymers*, 11(4), 651.

Scherer, R., Augusti, P. R., Bochi, v. C., Steffens, C., Fries, L. L. M., Daniel, A. P., Kubota, E. H., Neto, J. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G., & Orlie, V. (2010). Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated. *Meat Science*, 86(2), 317-323.

Serfert, Y., Drusch, S., & Schwarz, K. (2010). Sensory odour profiling and lipid oxidation status of fish oil and microencapsulated fish oil. *Food Chemistry*, 123(4), 968-975.

Sérot, T., Regost, C., & Arzel, J. (2002). Identification of odour-active compounds in muscle of brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary lipid sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(6), 636-643.

Shakour, N., Khoshkhoo, Z., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A., & Mahasti Shotorbani, P. (2021). Investigating the properties of PLA-nanochitosan composite films containing *Ziziphora Clinopodioides* essential oil and their impacts on oxidative spoilage of *Oncorhynchus mykiss* fillets. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1299-1311.

Passos, Janine Silva & Duarte-Almeida, Joaquim & Pérez, Daniel & Franco, Bernadette. (2010). Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos - CIENCIA TECNOL ALIMENT*. 30. 10.1590/S0101-20612010000500021.

Singh Pannu, A., Singh, S., & Dhawan, V. (2018). A Review Paper on Biodegradable Composites Made from Banana Fibers. *Asian Journal of Engineering and Applied Technology*, 7(2), 7- 15.

Stokes JL (1966), Redmond ML. Quantitative ecology of psychrophilic microorganisms. *Appl*

Microbiol. 1966 Jan;14(1):74-8.

Su, S., Kopitzky, R., Tolga, S., & Kabasci, S. (2019). Polylactide (PLA) and its blends with poly (butylene succinate) (PBS): A brief review. *Polymers*, 11(7), 1–21.

Oz, Ayse & Süfer, Özge & Çelebi, Yasemin. (2017). Poly (Lactic Acid) Films in Food Packaging Systems. 2. 10.23880/FSNT-16000131.

Tawakkal, I. S. M. A., Cran, M. J., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2014). A review of poly (lactic acid)-based materials for antimicrobial packaging. *Journal of Food Science*, 79(8), 65-67

Teimourifard, R., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., Karabagias, I. K., Ghadami, F., Gholami, F., Noori, N., & Khorrami, R. (2024). Effect of PLA-Nanochitosan Films on the Shelf-Life Extension of Fresh Rainbow Trout Fillets. *Coatings*, 14(12), 1579. <https://doi.org/10.3390/coatings14121579>

Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J.,E. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 65–72.

Tsironi, T., Houhoula, D., & Taoukis, P. (2020). *Hurdle technology for fish preservation. Aquaculture and Fisheries*. doi:10.1016/j.aaf.2020.02.001

Tsang, Y. F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y. S., & Jeon, Y. J. (2019). Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International*, 127, 625– 644.

Vatavali, K., Karakosta, L., Nathanailides, C., Georgantelis, D., & Kontominas, M. G. (2012). Combined Effect of Chitosan and Oregano Essential Oil Dip on the Microbiological, Chemical, and Sensory Attributes of Red Porgy (*Pagrus pagrus*) Stored in Ice. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3510–3521.

Veberg, A., Vogt, G., & Wold, J. P. (2006). Fluorescence in aldehyde model systems related to lipid oxidation. *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 562–570.

Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, Lies DP, Saffarini DA, MacGregor BJ, Ringelberg DB, White DC, Nishijima M, Sano H, Burghardt J, Stackebrandt E, Nealson KH (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999 Apr;49 Pt 2:705-24.

Vogel F. B., Venkateswaran K., Satomi M., & Gram L. (2005 a). Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H₂S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 10, 1128.

Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Satomi, M., & Gram, L. (2005 b). Identification of *Shewanella*

baltica as the Most Important H₂S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6689–6697.

Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*, 24, 2130.

Yagoub, O. S. (2009). Isolation of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state. *Journal of Bacteriology Research*, 1(7), 85-88.

Yang, C., Tang, H., Wang, Y., Liu, Y., Wang, J., Shi, W., & Li, L. (2019). Development of PLA-PBSA based biodegradable active film and its application to salmon slices. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100393.

Yorkowski M., & Brockerhoft H. (1965). Lyso lecthinase of cod muscle. *J. Fish Res.*, 22, 643-652.

Zare-Shehneh, M., Askarfarashah, M., Ebrahimi, L., Kor, N.M., ZareZardini, H., Soltaninejad, H (2004). Biological activities of a new antimicrobial peptide from *Coriandrum sativum*. *Int J Biosci*, 4, 89-99.

Zhong, Y., Godwin, P., Jin, Y., & Xiao, H. (2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 27–35.

Zuntar, I., Krivohlavek, A., Kosić-Vuknić, J., Granato, D., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., (2018). Pharmacological and toxicological health risk of food (herbal) supplements adulterated with erectile dysfunction medications. *Curr. Opin. Food Sci.* 24, 9-15.