

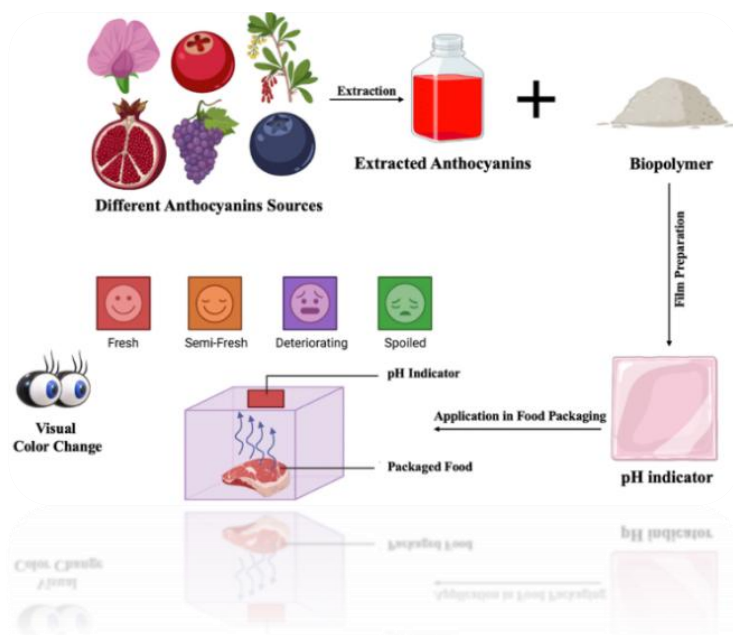


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Έξυπνη συσκευασία: Παραγωγή μεμβρανών από άμυλο
καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο και
μελέτη της δράσης τους σε κιμά κοτόπουλο**



Καλύβα Ζαχαρούλα
Χημικός

Ιωάννινα 2025

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Έξυπνη συσκευασία: Παραγωγή μεμβρανών από άμυλο
καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο και
μελέτη της δράσης τους σε κιμά κοτόπουλο**

Καλύβα Ζαχαρούλα (Α.Μ.: 1467)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μπαδέκα Αναστασία, Καθηγήτρια

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μπαδέκα Αναστασία, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Π.Ι.

Κοσμά Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Π.Ι.

Παπαγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Π.Ι.

Ιωάννινα, 2025

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων» του Τμήματος Χημείας, στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Μπαδέκα Αναστασίας, προς την οποία εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για την υπεύθυνη καθοδήγηση αλλά και την αδιάκοπη συνεργασία κι ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Παπαγεωργίου Γεώργιο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κ. Κοσμά Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που συμφώνησαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς την κ. Κοσμά για την πολύτιμη βοήθεια και την υποστήριξή της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, αλλά και τη βιομηχανία «ΠΙΝΔΟΣ Α.Ε.» για τη δωρεάν διάθεση δειγμάτων κιμά κοτόπουλου, για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τον πατέρα μου Ιωάννη, τη μητέρα μου Βασιλική και τα αδέρφια μου Νίκο και Παρασκευά, για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη που μου έδειξαν κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών μου σπουδών, καθώς και την αμέριστη ηθική και υλική βοήθεια που μου προσφέρουν. Θερμές ευχαριστίες και στους δικούς μου ανθρώπους, συγγενείς, φίλους και συναδέλφους που ήταν δίπλα μου οποιαδήποτε στιγμή και αν τους χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εποχή της πληροφόρησης και της παγκόσμιας οικονομίας, οι απαιτήσεις του σύγχρονου καταναλωτή για ποιοτικά και ασφαλή τρόφιμα αυξάνονται συνεχώς. Η συσκευασία των τροφίμων έχει ως πρωταρχικό στόχο να προστατεύει το προϊόν από το εξωτερικό περιβάλλον και να διατηρεί την ποιότητά του. Πλέον, η παραδοσιακή συσκευασία δεν μπορεί να ανταπεξέλθει στις υπάρχουσες απαιτήσεις και γι' αυτό το λόγο είναι αναγκαία η ανάπτυξη νέων, καινοτόμων συσκευασιών με βελτιωμένη λειτουργικότητα. Τέτοιες συσκευασίες θεωρούνται τόσο οι ενεργές όσο και οι έξυπνες, εξαιτίας της δυνατότητάς τους να βελτιώνουν την ποιότητα και να πληροφορούν τον καταναλωτή γι' αυτή, αντίστοιχα. Ειδικότερα, υπάρχουν τρεις τεχνολογίες έξυπνης συσκευασίας οι οποίες αναπτύχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες, αυτές των δεικτών, των αισθητήρων και των φορέων δεδομένων.

Οι δείκτες φρεσκάδας αποτελούν μια από τις λιγότερο μελετημένες κατηγορίες έξυπνης συσκευασίας. Σκοπός τους είναι να ενημερώνουν τον καταναλωτή για την ποιότητα των προϊόντων, μέσω της βασικής λειτουργίας των δεικτών να μεταβάλουν το χρώμα τους ως απόκριση σε κάποια μεταβολή του pH. Για να παραχθούν τέτοιες συσκευασίες σε βιομηχανική κλίμακα στην Ευρωπαϊκή Ένωση και να κυκλοφορήσουν στην αγορά των τροφίμων πρέπει να πληρούν κάποιες βασικές προϋποθέσεις, με κυριότερη αυτή του να μην παρατηρούνται φαινόμενα μετανάστευσης από το υλικό στο τρόφιμο, εξασφαλίζοντας την ασφάλειά του. Στην Αμερική, την Ιαπωνία και την Αυστραλία έχουν κυκλοφορήσει έξυπνες συσκευασίες τροφίμων με τεχνολογία δεικτών φρεσκάδας, οι οποίες όμως κατά κύριο λόγο περιέχουν χημικές και όχι φυσικές ενώσεις σαν δείκτες.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης αποτέλεσε η παραγωγή μια έξυπνης συσκευασίας με τεχνολογία δεικτών φρεσκάδας για άμεση παρακολούθηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών προϊόντων κρέατος, η οποία θα έχει ως βάση φυσικά συστατικά, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης του τροφίμου από τα υλικά της συσκευασίας του. Συγκεκριμένα, ως βάση για τις εδώδιμες μεμβράνες χρησιμοποιήθηκε το άμυλο καλαμποκιού, ενώ σαν φυσικός δείκτης οι ανθοκυανίνες του κόκκινου λάχανου, λόγω της αυξημένης σταθερότητας των τελευταίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με πολυσακχαρίτες. Το προϊόν στο οποίο μελετήθηκε η δράση των συγκεκριμένων μεμβρανών ήταν νωπός κιμάς κοτόπουλου, όπου η αλλοίωσή του

ανιχνεύεται μέσω της συσσώρευσης πτητικών ενώσεων αζώτου (TVB-N) και αύξησης του pH.

Αναλυτικότερα, το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τρία μέρη. Συγκεκριμένα, στο πρώτο μέρος έλαβε χώρα η εκχύλιση των ανθοκυανινών από το κόκκινο λάχανο και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του φαινολικού του περιεχομένου. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν α) απλές μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού (CSF), β) εμπλουτισμένες με εκχύλισμα κόκκινου λάχανου (CSF+10%RCE, CSF+20%RCE) και γ) εμπλουτισμένες με χημικό δείκτη κόκκινο του μεθυλίου (CSF+5%MRI), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για το εάν ο φυσικός δείκτης είναι ευαίσθητος και ανιχνεύει τις αλλαγές και αλλοιώσεις του τροφίμου και όχι για να προταθεί ως δυνητική έξυπνη συσκευασία. Ακολούθησε η μέτρηση του πάχους τους, η μελέτη των μηχανικών τους ιδιοτήτων, ο προσδιορισμός υγρασίας και διαλυτότητας των μεμβρανών όπως και η αντιοξειδωτική τους δράση. Στο τρίτο μέρος, αυτές οι μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες σε συσκευασίες με δείγματα κιμά κοτόπουλου, τα οποία μελετήθηκαν από μικροβιολογικής (O.M.X., ζύμες-μύκητες, *Pseudomonas* spp., *B. Thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, LAB) και φυσικοχημικής (pH, TVB-N, πτητικό προφίλ) απόψεως, ώστε να εξακριβωθεί εάν η χρωματική μεταβολή των μεμβρανών αντιπροσωπεύει την πραγματική αλλοίωση του τροφίμου και αν εν τέλει μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια έξυπνη συσκευασία. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ και οι αναλύσεις στον κιμά πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 0, 3, 5, 7.

Αναφορικά με τις παρασκευασθέντες μεμβράνες προέκυψε ότι η προσθήκη εκχυλίσματος στις μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού βελτιώνει τις μηχανικές τους ιδιότητες, ενώ αυξάνει την αντιοξειδωτική τους δράση και τα ποσοστά υγρασίας και διαλυτότητας των φιλμ, σε βαθμό ανάλογο με το ποσοστό του εκχυλίσματος.

Ο έλεγχος των μεμβρανών ως έξυπνη συσκευασία πραγματοποιήθηκε μέσω οπτικής παρατήρησης της μεταβολής των χρωμάτων των δεικτών. Συγκεκριμένα, το χρώμα των CSF+10%RCE και CSF+20%RCE μεμβρανών μεταβλήθηκε αισθητά την 7^η ημέρα, ενώ ο μάρτυρας CSF+5%MRI έδειξε μία μικρή χρωματική αλλαγή στο δεξί του άκρο την 5^η ημέρα, ενώ την 7^η ημέρα είχε αλλάξει εξ ολοκλήρου το χρώμα του, γεγονός που υποδεικνύει την αλλοίωση του δείγματος, τη συσσώρευση πτητικών ενώσεων αζώτου και την αύξηση του pH. Τόσο οι φυσικοχημικές όσο και οι μικροβιολογικές αναλύσεις

έδειξαν πως η αλλοίωση του δείγματος επήλθε μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας, με τα επίπεδα του pH, των TVB-N και των μικροοργανισμών να υπερβαίνουν τα αποδεκτά όρια την 7^η ημέρα, συνεπώς η πιθανότερη ημέρα αλλοίωσης προσδιορίστηκε ως η 6^η. Ακόμη η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από το σύνολο των πτητικών ενώσεων και τη μεταβολή των συγκεντρώσεών τους κατά τις ημέρες της αερόβιας αποθήκευσης.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της συγκεκριμένης εργασίας εξάγεται το συμπέρασμα πως οι μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού με δείκτη κόκκινου λάχανου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες σε έξυπνες συσκευασίες προϊόντων κρέατος, εφόσον ανιχνεύουν τη συσσώρευση πτητικών ενώσεων αζώτου που παράγονται κυρίως από μικροβιακή προσβολή του δείγματος και μεταβάλλουν το χρώμα τους όταν επέρχεται αλλοίωση αυτού.

ABSTRACT

In the age of information and the global economy, modern consumers' demands for high-quality, safe food are constantly increasing. The primary purpose of food packaging is to protect the product from the external environment and maintain its quality. Traditional packaging can no longer meet existing requirements, which is why it is necessary to develop new, innovative packaging with improved functionality. Such packaging is both active and smart, due to its ability to improve quality and inform the consumer about it, respectively. Specifically, there are three smart packaging technologies that have been developed in recent decades: indicators, sensors, and data carriers.

Freshness indicators are one of the least studied categories of smart packaging. Their purpose is to inform consumers about product quality through the basic function of indicators, to change color in response to a change in pH. In order such packaging to be produced on an industrial scale in the European Union and placed on the food market, it must meet certain basic requirements, the most important of which is that there must be no migration from the material to the food, thus ensuring its safety. In the United States, Japan, and Australia, smart food packaging with freshness indicator technology has been already used, which mainly contains chemical rather than natural compounds as indicators.

The aim of this research study was to produce smart packaging with freshness indicator technology for direct monitoring of the quality characteristics of meat products, which will be based on natural ingredients, so that there is no risk of food contamination from the packaging materials. Specifically, corn starch was used as the basis for the edible films, while red cabbage anthocyanins were used as a natural indicator due to their increased stability when interacting with polysaccharides. The product, on which the action of these films was studied, was fresh chicken mince, where spoilage is detected through the accumulation of volatile nitrogen compounds (TVB-N) and an increase in pH.

Particularly, the experiment was carried out in three parts. In the first part, anthocyanins were extracted from red cabbage, and their antioxidant capacity and phenolic content were determined. Then, a) simple corn starch films (CSF), b) films enriched with red cabbage extract (CSF+10%RCE, CSF+20%RCE), and c) films enriched with the

chemical indicator methyl red (CSF+5%MRI), were produced with the latter been used as the control, in order to determine whether the natural indicator is sensitive and can possibly detect changes and alterations in food, rather than to propose it as a potential smart packaging material. This was followed by measuring their thickness, studying their mechanical properties, determining the moisture and solubility of the films, and their antioxidant activity. In the third part, these membranes were used as indicators in packaging with chicken mince samples, which were studied from a microbiological (TVC, yeasts-molds, *Pseudomonas spp.*, *B. Thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, LAB) and physicochemical (pH, TVB-N, volatile profile) aspect, in order to verify whether the color change of the membranes represents the actual deterioration of the food and whether it can ultimately be used as smart packaging. The samples were stored under aerobic conditions at $4\pm1^{\circ}\text{C}$ and the analyses on the minced meat were performed on days 0, 3, 5, and 7.

Regarding the prepared films, it was found that the addition of extract to corn starch films improves their mechanical properties, while increasing their antioxidant activity and the moisture and solubility rates of the films, to an extent proportional to the percentage of extract.

The membranes were tested as smart packaging through visual observation of the color change of the indicators. Specifically, the color of the CSF+10%RCE and CSF+20%RCE membranes changed significantly on the 7th day, while the CSF+5%MRI control showed a slight color change at its right end on the 5th day, and by the 7th day its color had changed completely, indicating sample deterioration, accumulation of volatile nitrogen compounds, and an increase in pH. Both physicochemical and microbiological analyses showed that the sample spoiled between the 5th and 7th day, with pH, TVB-N, and microorganism levels exceeding acceptable limits on the 7th day, therefore the most likely day of spoilage was determined to be the 6th. This hypothesis is also confirmed by the total volatile compounds and the change in their concentrations during the days of aerobic storage.

Based on the data from this study, it can be concluded that corn starch membranes with red cabbage extract can be used as indicators in smart packaging for meat products, as they detect the accumulation of volatile nitrogen compounds produced mainly by microbial attack of the sample and change their color when it spoils.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	ii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	vi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	xi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xii
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	2
1.1 Συσκευασία τροφίμων	2
1.2 Ενεργή συσκευασία και εφαρμογές αυτής.....	3
1.3 Έξυπνη συσκευασία και νομοθετικό πλαίσιο	5
1.4 Τεχνολογίες έξυπνης συσκευασίας	7
1.4.1 Δείκτες (Χρόνο-θερμοκρασιακοί δείκτες, δείκτες φρεσκάδας και αερίου) ..	8
1.4.2 Αισθητήρες.....	9
1.4.3 Φορείς δεδομένων (barcodes, RFID).....	10
1.5 Μεταβολές χαρακτηριστικών τροφίμων και εφαρμογές των δεικτών φρεσκάδας.....	10
1.5.1 Αποικοδόμηση ATP.....	10
1.5.2 Ολικό πτητικό άζωτο (TVB-N)	11
1.6 Κατηγορίες χρωματομετρικών δεικτών ανίχνευσης TVB-N.....	13
1.6.1 Δείκτες pH	13
1.6.2 Συνθετικές χρωστικές ως χρωματομετρικοί δείκτες	13
1.6.3 Φυσικές χρωστικές ως χρωματομετρικοί δείκτες	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: MEMBRANES.....	18
2.1 Εδώδιμες μεμβράνες.....	18
2.2 Είδη εδώδιμων μεμβρανών	20
2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα εδώδιμων μεμβρανών	22
2.4 Μεμβράνη από άμυλο καλαμποκιού	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΡΕΑΣ	27
3.1 Είδη κρέατος	27
3.2 Παράγοντες αλλοίωσης του κρέατος	28
3.2.1 Μικροβιολογική αλλοίωση	28
3.2.2 Ενζυμική αλλοίωση.....	31
3.2.3 Οξείδωση λιπιδίων.....	32
3.2.4 Οξείδωση πρωτεϊνών	32
3.3 Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N) στο κρέας	35

3.3.1 Βιοσύνθεση των TVB-N στο κρέας.....	37
3.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό TVB-N στο κρέας.....	39
ΣΚΟΠΟΣ	42
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΑΠΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΛΑΧΑΝΟ, ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	43
1.1 Εκχύλιση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο	43
1.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας και φαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου.....	43
1.3 Έλεγχος μεταβολής του χρώματος του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου συναρτήσει του pH	47
2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΑΜΥΛΟ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟ ΦΥΣΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΑΠΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΛΑΧΑΝΟ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΚΟΚΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥΣ ...	48
2.1 Παρασκευή μεμβρανών	48
I. Παρασκευή μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού	48
II. Παρασκευή μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού και εκχύλισμα από κόκκινο λάχανο	48
III. Παρασκευή μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού και ενσωματωμένο δείκτη κόκκινο του μεθυλίου	49
2.2 Μελέτη των παρασκευασθέντων μεμβρανών	50
2.2.1 Μέτρηση πάχους μεμβρανών	50
2.2.2 Μέτρηση μηχανικών ιδιοτήτων μεμβρανών	50
2.2.3 Προσδιορισμός ποσοστού υγρασίας και διαλυτότητας μεμβρανών	51
2.2.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικού περιεχομένου μεμβρανών.....	52
3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ ΚΙΜΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ	53
3.1 Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων από κιμά κοτόπουλο	53
3.2 Μικροβιολογική ανάλυση	54
3.3 Δείκτες ποιότητας δειγμάτων	58
3.3.1 Προσδιορισμός pH	58
3.3.2 Προσδιορισμός ολικού πτητικού αζώτου	58
3.3.3 Προσδιορισμός Πτητικού Προφίλ με Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου σε συνδυασμό με Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (HS-SPME/GC-MS).....	60
3.4 Στατιστική ανάλυση	62
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
1. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΛΑΧΑΝΟΥ	63

1.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικού περιεχομένου	63
1.2 Έλεγχος μεταβολής του χρώματος του εκχυλίσματος συναρτήσει του pH	66
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΘΕΝΤΩΝ MEMBRANΩΝ	66
2.1 Οπτική παρατήρηση των μεμβρανών	66
2.2 Έλεγχος μεταβολής του χρώματος των παρασκευασθέντων μεμβρανών σε συνθήκες διαφορετικού pH.	67
2.3 Μέτρηση πάχους μεμβρανών	71
2.4 Έλεγχος μηχανικών ιδιοτήτων μεμβρανών	72
2.5 Έλεγχος του ποσοστού υγρασίας και διαλυτότητας των μεμβρανών.....	75
2.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας και φαινολικού περιεχομένου των μεμβρανών	77
3. ΜΕΛΕΤΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ MEMBRANΩΝ ΣΕ ΚΙΜΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ	80
3.1 Οπτικός έλεγχος μεταβολής του χρώματος των μεμβρανών κατά τις ημέρες συντήρησης	80
3.2 Μικροβιολογική ανάλυση	82
3.3 Φυσικοχημικές αναλύσεις	90
3.3.1 pH	90
3.3.2 Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N)	93
3.3.3 Ανάλυση πτητικών ενώσεων	95
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Βιοδραστικά συστατικά που χρησιμοποιούνται στις ενεργές συσκευασίες (Vilela et al., 2018).	5
Εικόνα 2: Αποικοδόμηση του ATP σε ινοσίνη και υποξανθίνη (https://www.shodex.com/en/dc/02/03/12.html)	11
Εικόνα 3: Τρόπος δράσης των δεικτών φρεσκάδας στην έξυπνη συσκευασία (Shao et al., 2021).	12
Εικόνα 4: Οι χημικές δομές των κυριότερων ανθοκυανινών (Oladzadabbasabadi et al., 2022).	15
Εικόνα 5: Χημική δομή της βασικής ανθοκυανίνης του κόκκινου λάχανου (Zhang & Jing, 2022).	16
Εικόνα 6: Αλλαγές χρωμάτων των ανθοκυανινών εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου συναρτήσει του pH (Abedi-Firoozjah et al., 2022).	17
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση παραγωγής εδώδιμων μεμβρανών (αριστερά) και επικαλύψεων (δεξιά) (Mohamed et al., 2020).	19
Εικόνα 8: Κατηγοριοποίηση των εδώδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων βάσει των συστατικών τους (Amrita Poonia, 2017).	22
Εικόνα 9: Δομή της αμυλόζης (αριστερά) και της αμυλοπηκτίνης (δεξιά) (Wang et al., 2022).	24
Εικόνα 10: Ζελατινοποίηση και αναδιάταξη του αμύλου (Ojogbo et al., 2020).	25
Εικόνα 11: Παραγωγή γαλακτικού οξέος (Mutwakil, 2011).	30
Εικόνα 12: Παράγοντες αλλοίωσης του κρέατος (Bekhit et al., 2021).	35
Εικόνα 13: Βιοσύνθεση και μεταβολισμός TMA (Bekhit et al., 2021).	38
Εικόνα 14: Μηχανισμός αντίδρασης της ρίζας DPPH με κάποιο αντιοξειδωτικό (Sadeer et al., 2020).	44
Εικόνα 15: Μηχανισμός αντίδρασης των φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Sadeer et al., 2020).	45
Εικόνα 16: Χημική δομή του δείκτη κόκκινο του μεθυλίου σε όξινο και βασικό περιβάλλον (Khadka & Bhattarai, 2021).	50
Εικόνα 17: Διαδικασία διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων από το αρχικό ομογενοποιημένο δείγμα σε πεπτονούχο διάλυμα συγκέντρωσης 0,1 % w/v (Μικροβιολογία Τροφίμων I Ενότητα 3, n.d.).	55
Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της απόσταξης μεθ' υδρατμών (αριστερά), σύγχρονη συσκευή απόσταξης Kjeldahl (δεξιά) (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2074/2005).	59
Εικόνα 19: Χρωματικές μεταβολές του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου συναρτήσει του pH.	66
Εικόνα 20: Κυκλικές μεμβράνες από: άμυλο καλαμποκιού (CSF), άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο σε περιεκτικότητα 10% (CSF+10%RCE), άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο σε περιεκτικότητα 20% (CSF+20%RCE), άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη κόκκινο του μεθυλίου σε περιεκτικότητα 5% (CSF+5%MRI).	67
Εικόνα 21: Μεταβολές χρωμάτων των μεμβρανών CSF+10%RCE συναρτήσει του pH.	68
Εικόνα 22: Μεταβολές χρωμάτων των μεμβρανών CSF+20%RCE συναρτήσει του pH.	68
Εικόνα 23: Μεταβολές χρωμάτων των μεμβρανών CSF+5%MRI συναρτήσει του pH.	69
Εικόνα 24: Χημικές δομές του Α)αμύλου, Β)ανθοκυανινών και Γ)κόκκινο του μεθυλίου.	74
Εικόνα 25: Μεταβολή χρωμάτων των μεμβρανών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης του κιμά κοτόπουλο.	80
Εικόνα 26: Μορφολογία των αποικιών, Α) OMX, Β) Εντεροβακτήρια, Γ) B. thermosphacta, Δ) Ψευδομονάδες, Ε) Γαλακτικά βακτήρια, ΣΤ) Ζύμες - Μύκητες.	89

Εικόνα 27: % μεταβολή των πτητικών ενώσεων στα δείγματα κιμά κοτόπουλου κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες.....	102
---	-----

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ευρωπαϊκοί Κανονισμοί σχετικά με την έξυπνη συσκευασία.	7
Πίνακας 2: Συνθετικές χρωστικές ως χρωματομετρικοί δείκτες στην έξυπνη συσκευασία.	14
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά και θερμοκρασία ζελατινοποίησης διαφόρων πηγών αμύλου (Ojogbo et al., 2020; Olkku & Rha, 1978; Zhu, 2015).	26
Πίνακας 4: Κατηγορίες μικροοργανισμών βάση των συνθηκών ανάπτυξής τους (Αγγελής, 2017).....	29
Πίνακας 5: Προϊόντα των μικροοργανισμών αλλοίωσης στο κρέας (Bekhit et al., 2021).	31
Πίνακας 6: Μεταβολικά προϊόντα αποικοδόμησης αμινοξέων (Paczkowski & Schütz, 2011).	34
Πίνακας 7: Επιτρεπτά όρια TVB-N σε νωπά προϊόντα κρέατος (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2074/2005; Balamatsia et al., 2006; Bekhit et al., 2021; Hopkins et al., 2020).	41
Πίνακας 8: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα του αέριου χρωματογράφου.	61
Πίνακας 9: Πειραματικά δεδομένα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος.....	63
Πίνακας 10: Αντιοξειδωτική δράση και φαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου.....	64
Πίνακας 11: Πάχος των διαφορετικών ειδών μεμβρανών.	71
Πίνακας 12: Τιμές των παραμέτρων εφελκυσμού των δειγμάτων μεμβρανών.	72
Πίνακας 13: % υγρασία (MC) και % διαλυτότητα (WS) μεμβρανών.	76
Πίνακας 14: Αντιοξειδωτική ικανότητα και φαινολικό περιεχόμενο των μεμβρανών.	77
Πίνακας 15: Μεταβολή των αναπτυχθέντων μικροοργανισμών (log cfu/g) του κιμά συναρτήσει των ημερών συντήρησης.	83
Πίνακας 16: Μεταβολή του pH του κιμά κοτόπουλου συναρτήσει των ημερών συντήρησης.	91
Πίνακας 17: Μεταβολή του ολικού πτητικού αζώτου (TVB-N) του κιμά κοτόπουλου συναρτήσει των ημερών συντήρησης.	93
Πίνακας 18: Ημιποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων (ppb) στα δείγματα κιμά κοτόπουλου κατά τις ημέρες αερόβιας συντήρησης.....	96
Πίνακας 19: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε κιμά κοτόπουλο και το χαρακτηριστικό τους άρωμα (PubChem, n.d.).....	97

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

Βάσει του Νόμου 2939/01 ως συσκευασία (μέσο) νοείται «κάθε προϊόν κατασκευασμένο από οποιοδήποτε είδος υλικού και προοριζόμενο να χρησιμοποιείται για να περιέχει αγαθά. Σκοπός της είναι η προστασία, η διακίνηση, η διάθεση και η παρουσίαση των αγαθών από τον παραγωγό μέχρι τον χρήστη ή τον καταναλωτή. Ως συσκευασίες θεωρούνται όλα τα είδη μίας ή πολλαπλής χρήσης που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό» (Νόμος 2939/2001 (Κωδικοποιημένος) - ΦΕΚ Α 179/06.08.2001, π.δ.). Η συσκευασία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλυσίδα διακίνησης τροφίμων και αποτελεί αναπόσπαστο μέρος τόσο των διεργασιών παραγωγής όσο και ολόκληρης της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων

1.1 Συσκευασία τροφίμων

Κύριος σκοπός της συσκευασίας τροφίμων είναι η προστασία των προϊόντων από τις επιπτώσεις που προκαλούνται από το εξωτερικό περιβάλλον καθώς και η διατήρηση της ποιότητας αυτών κατά τη μεταφορά, την αποθήκευση και την τελική χρήση. Οι βασικές λειτουργίες κάθε συσκευασίας τροφίμων είναι οι εξής (Ghaani et al., 2016; Müller & Schmid, 2019):

- Προστασία: η συσκευασία προστατεύει το τρόφιμο από το εξωτερικό περιβάλλον.
- Επικοινωνία: μέσω της συσκευασίας ο καταναλωτής ενημερώνεται για το είδος του προϊόντος διαμέσου γραπτών κειμένων ή γραφικών και εικόνων (λογότυπο της βιομηχανίας παραγωγής, διατροφική δήλωση κ.α.).
- Ευκολία: στόχος της κάθε βιομηχανίας γενικότερα και της συσκευασίας των προϊόντων της ειδικότερα, είναι να προσαρμόζεται στον τρόπο ζωής των καταναλωτών και να απλοποιεί τον χειρισμό των συσκευασιών, προσφέροντάς τους εύκολες και καινοτόμες λύσεις, όπως για παράδειγμα έτοιμα γεύματα, εύκολο

άνοιγμα και δυνατότητα επανακλεισίματος της συσκευασίας και επεξεργασία σε μικροκύματα.

- ο Περιορισμός: η συσκευασία θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να παρέχει ευκολία μεταφοράς και χειρισμού στους καταναλωτές (π.χ. δοχεία διαφορετικού σχήματος και μεγέθους ώστε να καλύπτονται οι ανάγκες όλων των ενδιαφερόμενων ανθρώπων).

Επιπλέον, η ασφαλής παράδοση και η συντήρηση των συσκευασμένων τροφίμων πριν την κατανάλωση, αποτελούν κύριους στόχους σε όλη την εφοδιαστική αλυσίδα του προϊόντος. Όμως, η απώλεια κάποιων χαρακτηριστικών ποιότητας των τροφίμων συμβαίνει κατά τη διανομή και την αποθήκευση λόγω βιολογικής, χημικής και φυσικής υποβάθμισης και είναι αρκετά δύσκολο να αποφευχθεί. Όσο το τρόφιμο βρίσκεται στις εγκαταστάσεις της βιομηχανίας τροφίμων, εκτελούνται συνεχείς μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις, με σκοπό να μη διανεμηθεί κάποιο αλλοιωμένο προϊόν στην αγορά. Ωστόσο η συσκευασία τροφίμων επιτελεί μόνο προστατευτικό ρόλο και δεν συμμετέχει στην προσπάθεια διατήρησης της ποιότητας (Ghaani et al., 2016).

Η παραδοσιακή συσκευασία δεν είναι πλέον επαρκής λόγω των συνεχώς αυξανόμενων προσδοκιών των καταναλωτών, αυξανόμενης πολυπλοκότητας των προϊόντων, καθώς και εθνικών και διεθνών πρωτοβουλιών για την προώθηση μιας κυκλικής οικονομίας και την ελαχιστοποίηση του αποτυπώματος άνθρακα των τυποποιημένων προϊόντων. Απαιτείται επίσης καινοτόμος συσκευασία με βελτιωμένη λειτουργικότητα για την κάλυψη μιας ποικιλίας επιπλέον καταναλωτικών αναγκών. Η ανάγκη για ανακάλυψη νέων τεχνολογιών που θα παρέχουν στους καταναλωτές προϊόντα με υψηλή διατροφική αξία και ευκολία στην αντίληψη του εάν ένα τρόφιμο είναι κατάλληλο για κατανάλωση, οδήγησε στην γέννηση των εννοιών «ενεργή» και «έξυπνη» συσκευασία αντίστοιχα.

1.2 Ενεργή συσκευασία και εφαρμογές αυτής

Η ενεργή συσκευασία (active packaging) μεταβάλλει τις συνθήκες του συσκευασμένου τροφίμου με σκοπό την επιμήκυνση του χρόνου ζωής ή τη βελτίωση της ασφάλειας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί την ποιότητα του

συσκευασμένου τροφίμου. Η ενεργή συσκευασία στηρίζεται στην ενσωμάτωση συστατικών που απελευθερώνουν ή απορροφούν ουσίες προς και από το συσκευασμένο τρόφιμο και τον περιβάλλοντα χώρο αυτού (Ghaani et al., 2016).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες ένταξης συστημάτων ενεργής συσκευασίας στις συμβατικές συσκευασίες τροφίμων, με πιο διαδεδομένες τις παρακάτω (Vilela et al., 2018):

- Απορροφητές οξυγόνου: αποσκοπούν στην ελάττωση ή και την αποφυγή ανάπτυξης ζυμών, μυκήτων, αερόβιων βακτηρίων και στην παρεμπόδιση της οξείδωσης λιπαρών, ελαίων, βιταμινών, καθώς και στη διατήρηση του χρώματος.
- Απορροφητές αιθυλενίου: αποσκοπούν στην επιβράδυνση της γρήγορης ωρίμανσης και του μαλακώματος διαφόρων φρούτων και λαχανικών.
- Απορροφητές διοξειδίου του άνθρακα: αποσκοπούν στην απομάκρυνση του CO₂ κατά την αποθήκευση προς αποφυγή της διάρρηξης της συσκευασίας.
- Απορροφητές υγρασίας: δρουν ελέγχοντας την περίσσεια υγρασίας και ελαττώνοντας την ενεργότητα του νερού στην επιφάνεια του τροφίμου, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ζυμών, μυκήτων και βακτηρίων.
- Απορροφητές δυσσομιών, αμινών και αλδεϋδών: ελαττώνουν την πικρότητα διαφόρων φρούτων και βελτιώνουν το άρωμα λιπαρών τροφίμων.
- Απορροφητές UV ακτινοβολίας: περιορίζουν την UV ακτινοβολία που επιφέρει οξείδωση στα τρόφιμα.
- Απομακρυντές λακτόζης: δρουν ακινητοποιώντας το ένζυμο λακτάση στη συσκευασία του τροφίμου (γάλα και παράγωγα αυτού), για να μπορούν να καταναλώνουν το προϊόν και άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη.
- Απομακρυντές χοληστερόλης: δρουν ακινητοποιώντας τη ρεδουκτάση της χοληστερόλης στη συσκευασία του τροφίμου και βελτιώνουν την υγιεινή των γαλακτοκομικών προϊόντων.
- Εκπομποί CO₂: παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των gram (-) βακτηρίων και των μυκήτων.
- Εκπομποί αιθανόλης: παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων.
- Απελευθερωτές αντιμικροβιακών συντηρητικών: παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών και βακτηρίων, αποτρέποντας τη μόλυνση και την αλλοίωση του τροφίμου.

- Εκπομποί διοξειδίου του θείου: παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων.
- Απελευθερωτές αντιοξειδωτικών: παρεμποδίζουν την οξείδωση λιπών και ελαίων που περιέχονται σε πληθώρα κατηγοριών τροφίμων.
- Εκπομποί αρώματος: δρουν καλύπτοντας διάφορες δυσοσμίες, ελαχιστοποιώντας το φαινόμενο του flavor scalping και βελτιώνοντας το άρωμα των τροφίμων.
- Εκπομποί φυτοφαρμάκων: παρεμποδίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων μόλυνσης ή ελέγχουν για την παρουσία διαφόρων παρασίτων και μυκήτων.



Εικόνα 1: Βιοδραστικά συστατικά που χρησιμοποιούνται στις ενεργές συσκευασίες (Vilela et al., 2018).

1.3 Έξυπνη συσκευασία και νομοθετικό πλαίσιο

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA, European Food Safety Authority) η έξυπνη συσκευασία ή αλλιώς τα έξυπνα υλικά συσκευασίας ορίζονται ως: «Υλικά και αντικείμενα που παρακολουθούν την κατάσταση των συσκευασμένων τροφίμων ή τον περιβάλλοντα χώρο αυτών». Στόχος της έξυπνης συσκευασίας είναι να πληροφορεί τους καταναλωτές σχετικά με την κατάσταση ποιότητας στην οποία βρίσκεται το τρόφιμο (κατάλληλο ή μη για κατανάλωση). Δηλαδή το υλικό συσκευασίας πρέπει να «παρακολουθεί» το προϊόν χωρίς να αλληλοεπιδρά με αυτό (Müller & Schmid, 2019) .

Η έξυπνη συσκευασία θα μπορούσε να επιφέρει μόνο θετικά αποτελέσματα στην παγκόσμια αγορά, εφόσον μέσω αυτής θα μειωνόταν το ποσοστό των ανθρώπων που προσβάλλονται από τροφικές δηλητηριάσεις (κατανάλωση αλλοιωμένων τροφίμων), καθώς και τα ποσοστά απόρριψης τροφίμων που είναι κατάλληλα για βρώση (π.χ. απόρριψη τροφίμων που πλησιάζουν την ημερομηνία λήξεως ή έχει μεταβληθεί ελάχιστα το χρώμα τους όμως διατηρούν τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά και δεν έχουν υποστεί πραγματική αλλοίωση). Ακόμη, οι βιομηχανίες τροφίμων θα επωφελούνταν από την άποψη ότι θα διένειμαν ποιοτικά και ασφαλή προϊόντα και θα απέφευγαν τυχόν παράπονα από καταναλωτές, από υπεύθυνους αλυσίδων εμπορίας τροφίμων (super market), ανακλήσεις κάποιων προϊόντων από την αγορά και δυσφήμιση αυτών.

Για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η έξυπνη συσκευασία σε βιομηχανική κλίμακα, για εμπορικούς σκοπούς, πρέπει να πληρούνται κάποιες νομικές απαιτήσεις. Το νομικό πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι αρκετά πιο αυστηρό συγκριτικά με αυτό των ΗΠΑ, της Ιαπωνίας ή της Αυστραλίας και μέχρι πρότινος δεν υπήρχε νομοθεσία που να επέτρεπε την κατασκευή και διανομή έξυπνων υλικών συσκευασίας, ούτε την εισαγωγή αυτών εντός ευρωπαϊκής ζώνης από άλλες χώρες (Müller & Schmid, 2019).

Κάποιοι από τους βασικούς Ευρωπαϊκούς Κανονισμούς (ΕΚ) που εισήχθησαν τις τελευταίες δεκαετίες, σχετικά με τις προϋποθέσεις ύπαρξης και κατασκευής έξυπνων υλικών συσκευασίας φαίνονται στον Πίνακα 1. Σύμφωνα με αυτούς, οι έξυπνες συσκευασίες δεν πρέπει να μεταφέρουν τα συστατικά τους στα τρόφιμα, διότι μπορεί να τεθεί η ανθρώπινη υγεία σε κίνδυνο ή να μεταβληθεί η σύσταση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων. Επιπλέον, η συσκευασία θα πρέπει να φέρει την επισήμανση πως περιέχει «έξυπνα υλικά» τα οποία είναι μη βρώσιμα και να μην παραπλανά τον καταναλωτή. Τέλος, όλοι οι κανονισμοί ορίζουν με σαφήνεια τα χαρακτηριστικά των υλικών τα οποία επιτρέπεται να έρθουν σε επαφή με τα τρόφιμα, καθώς και τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν τα έξυπνα υλικά συσκευασίας ώστε να λάβουν έγκριση παραγωγής και χρήσης.

Πίνακας 1: Ευρωπαϊκοί Κανονισμοί σχετικά με την έξυπνη συσκευασία.

Αριθμός ΕΚ	Πηγή και θέμα κανονισμού
1935 / 2004	(Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1935/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 27ης Οκτωβρίου 2004 σχετικά με τα υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα και με την κατάργηση των οδηγιών 80/590/ΕΟΚ και 89/109/ΕΟΚ, 2004)
2023 / 2006	(Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2023/2006 της Επιτροπής, της 22ας Δεκεμβρίου 2006 , σχετικά με την ορθή πρακτική παραγωγής υλικών και αντικειμένων που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τρόφιμα
450 / 2009	(Κανονισμός αριθ. 450/2009 της Επιτροπής, της 29ης Μαΐου 2009 , σχετικά με τα ενεργά και νοήμονα υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τρόφιμα
10 / 2011	(Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 10/2011 της Επιτροπής, της 14ης Ιανουαρίου 2011 , για τα πλαστικά υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα

Γενικά, η έξυπνη συσκευασία δεν περιέχει συστατικά που θα μπορούσαν να παρατείνουν τον χρόνο ζωής των τροφίμων (όπως αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά κλπ.) ή να βελτιώσουν την ποιότητά τους, όπως η ενεργή συσκευασία. Συνεπώς, ο συνδυασμός αυτών των δύο, θα μπορούσε να προσδώσει στο προϊόν πλήρη κάλυψη και ασφάλεια και να αναπτυχθεί το λεγόμενο “smart packaging”.

1.4 Τεχνολογίες έξυπνης συσκευασίας

Γενικά, υπάρχουν τρεις κύριες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στην έξυπνη συσκευασία, ώστε να επιτευχθεί η ανίχνευση και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, οι οποίες είναι:

- Δείκτες: για άμεση παρακολούθηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου.
- Αισθητήρες: παρακολουθούν τις συνθήκες που υπάρχουν στο περιβάλλον της συσκευασίας και είναι ικανές να μεταβάλλουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων.
- Φορείς δεδομένων: χρησιμοποιούνται μόνο για αποθήκευση και μεταφορά δεδομένων προς τους καταναλωτές.

1.4.1 Δείκτες (Χρόνο-θερμοκρασιακοί δείκτες, δείκτες φρεσκάδας και αερίου)

Η κύρια λειτουργία των δεικτών είναι να μεταφέρουν πληροφορίες στον καταναλωτή σχετικά με την παρουσία ή απουσία μιας ουσίας ή κάποιου μικροοργανισμού, τη σχετική συγκέντρωση αυτών (διαβάθμιση χρώματος) καθώς και για την έκταση μιας αντίδρασης που πιθανών να λαμβάνει χώρα μετά τη συσκευασία του τροφίμου. Οι πληροφορίες αυτές συνήθως γίνονται αντιληπτές από τον καταναλωτή μέσω οπτικής παρατήρησης αλλαγής χρώματος. Οι δείκτες χρησιμοποιούνται για ποιοτική και όχι για ποσοτική ανάλυση (Ghaani et al., 2016). Οι τρεις κύριες κατηγορίες δεικτών είναι οι εξής:

α) Χρόνο – θερμοκρασιακοί δείκτες (Time – Temperature Indicators, TTI): είναι οικονομικές και εύκολες στη χρήση «μικροσυσκευές» ενσωματωμένες στην συσκευασία. Η αρχή λειτουργίας των TTI βασίζεται στην ανίχνευση των εξαρτώμενων από το χρόνο και τη θερμοκρασία μηχανικών, χημικών, ηλεκτροχημικών, ενζυμικών ή μικροβιολογικών αλλαγών ενός τροφίμου. Ως χημικές ή φυσικές μεταβολές θεωρούνται διάφορες αντιδράσεις οξέος – βάσης ή πολυμερισμού που λαμβάνουν χώρα κατά τη μεταβολή της θερμοκρασίας και του χρόνου, ενώ οι βιολογικές αποκρίσεις βασίζονται σε ενζυμικές ή μικροβιακές μεταβολές (ανάπτυξη μικροοργανισμών, σπορίων κλπ.) (Müller & Schmid, 2019). Η θερμοκρασία είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη διάρκεια ζωής ενός προϊόντος. Μεταβολές αυτής πιθανώς να ευνοούν την ανάπτυξη ή την επιβίωση διαφόρων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την τελική αλλοίωση του τροφίμου. Επιπλέον, κυρίως στα προϊόντα κρέατος η λανθασμένη ψύξη ή απόψυξη μπορεί να επιφέρει μετουσίωση των πρωτεϊνών και υποβάθμιση της ποιότητάς τους, ή και δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών.

β) Δείκτες φρεσκάδας (freshness indicators): είναι έξυπνες συσκευές που τοποθετούνται εντός της συσκευασίας και «παρακολουθούν» τη μεταβολή της ποιότητας ενός προϊόντος κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά. Η απώλεια φρεσκάδας μπορεί να προκληθεί από έκθεση του τροφίμου σε αντίξοες για αυτό συνθήκες (π.χ. έκθεση σε ↑T, στον ήλιο, σε περιβάλλον με υγρασία κλπ.), ανάπτυξη μικροβιακού φορτίου ή και σχηματισμό ενώσεων που προκαλούν υποβάθμιση και αλλοίωση (πτητικές ενώσεις αζώτου κ.α.). Τα παραπάνω προκαλούν μη αναστρέψιμες αλλαγές, συνήθως του pH, οπότε μέσω αλλαγής του χρώματος του δείκτη γίνεται μια ποιοτική εκτίμηση της κατάστασης όπου βρίσκεται το τρόφιμο.

γ) Δείκτες αερίου (gas indicators): Οι δείκτες αερίου τοποθετούνται εντός της συσκευασίας για να παρακολουθούν τυχόν αλλαγές που συμβαίνουν στο εσωτερικό περιβάλλον, λόγω διαφόρων ενζυμικών ή χημικών αντιδράσεων που μπορεί να λαμβάνουν χώρα, του μεταβολισμού των μικροοργανισμών, καθώς και τη μεταβολή της συγκέντρωσης αερίων (O_2 , CO_2 , H_2S κ.α.) λόγω του φαινομένου της διάχυσης. Οι δείκτες αερίου χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον για ανίχνευση του O_2 και του CO_2 . Η παρουσία O_2 επηρεάζει τη γεύση, την οσμή, το χρώμα, τη θρεπτική αξία και το χρόνο ζωής των τροφίμων. Συγκεκριμένα, επιταχύνει την αποικοδόμηση και την αλλοίωση των περισσότερων κατηγοριών τροφίμων, γι' αυτό και η επιθυμητή συγκέντρωσή του εντός συσκευασίας είναι 0 – 2 %. Αντιθέτως, η δράση του CO_2 είναι να προλαμβάνει τη μικροβιακή ανάπτυξη, γι' αυτό και χρησιμοποιείται συχνά σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP) σε συγκεντρώσεις 20 – 80 %.

Επιπλέον, εφόσον έρχονται σε επαφή με το τρόφιμο, θα πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις, μεταξύ των οποίων, να είναι αδιάλυτοι στο νερό και μη τοξικοί. Η πρώτη προϋπόθεση είναι εξίσου σημαντική με τη δεύτερη, διότι εάν ο δείκτης παρουσιάζει διαλυτότητα στο νερό, υπάρχει η πιθανότητα να αλλοιωθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (χρώμα, γεύση, οσμή) και να μην είναι αποδεκτό από το καταναλωτικό κοινό (Ghaani et al., 2016; Kalpana et al., 2019; Müller & Schmid, 2019).

1.4.2 Αισθητήρες

Οι αισθητήρες είναι ηλεκτρονικές συσκευές που μετατρέπουν ένα σήμα σε ένα άλλο, μέσω ενός μετατροπέα. Η πλειονότητα αυτών αποτελούνται από ένα υποδοχέα (receptor), έναν μετατροπέα (transducer), ένα ηλεκτρονικό σύστημα επεξεργασίας σήματος και μια μονάδα απεικόνισης σήματος. Μία από τις κύριες κατηγορίες αισθητήρων είναι οι χημικοί αισθητήρες, η δράση των οποίων στηρίζεται στη χημική αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του υποδοχέα και της αναλυόμενης ουσίας. Ακολουθούν οι αισθητήρες αερίων, οι οποίοι ανιχνεύουν και υποδεικνύουν την παρουσία αερίων (O_2 , CO_2 κ.α.) ή πτητικών ενώσεων (πτητικές ενώσεις αζώτου κ.α.). Ακόμη, οι βιοαισθητήρες είναι άλλη μία κατηγορία αισθητήρων, οι οποίοι σε αντίθεση

με τους χημικούς, αποτελούνται από υποδοχείς κατασκευασμένους από ένζυμα, αντιγόνα, ορμόνες, νουκλεϊκά οξέα κ.α. και μπορούν να ανιχνεύσουν παθογόνους μικροοργανισμούς όπως οι *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, και *Campylobacter* (Ghaani et al., 2016; Kalpana et al., 2019; Müller & Schmid, 2019).

1.4.3 Φορείς δεδομένων (barcodes, RFID)

Οι φορείς δεδομένων ή αλλιώς αυτοματοποιημένες συσκευές αναγνώρισης, δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση ποιότητας ενός τροφίμου, όπως οι δείκτες και οι αισθητήρες, αλλά συμβάλλουν στην ιχνηλασιμότητα.

Η ιχνηλασιμότητα αντιπροσωπεύει τη δυνατότητα ανάκτησης της θέσης ενός προϊόντος, αλλά και του ιστορικού θέσεων, μέσω της μοναδικής ταυτοποίησης του προϊόντος, της αυτόματης συλλογής των δεδομένων, της σύνδεσης και της ανταλλαγής πληροφοριών σε όλες τις επιχειρησιακές διαδικασίες. Οι πιο γνωστοί φορείς δεδομένων στη βιομηχανία τροφίμων είναι οι γραμμωτοί κώδικες (barcodes) και οι ετικέτες αναγνώρισης ραδιοσυχνότητας (Radio-Frequency Identification - RFID tags).

1.5 Μεταβολές χαρακτηριστικών τροφίμων και εφαρμογές των δεικτών φρεσκάδας

1.5.1 Αποικοδόμηση ATP

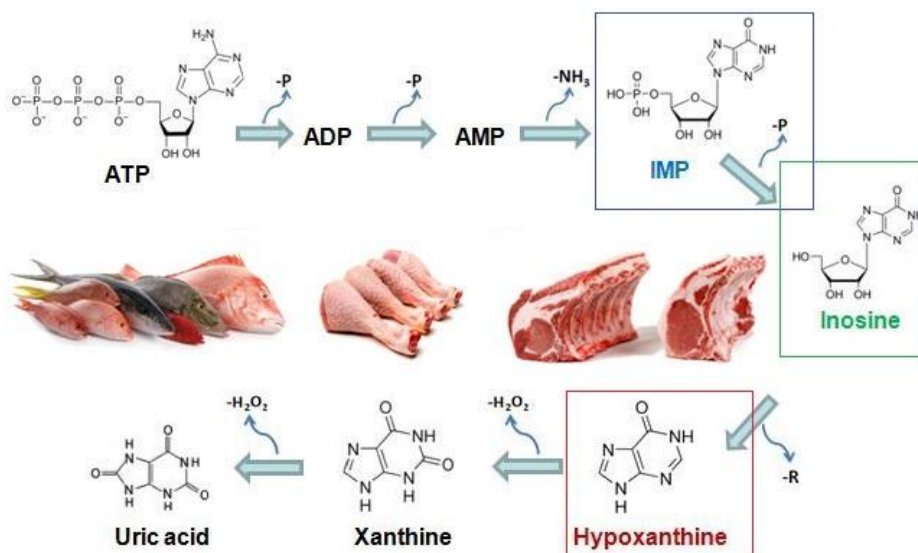
Οι μύες των προϊόντων κρέατος είναι πλούσιοι σε ATP. Όταν το ζώο είναι ζωντανό, το ATP υδρολύεται σε ADP και επανασυντίθεται συνεχώς μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Μετά τη σφαγή του ζώου και τη διακοπή της αναπνοής του, το ADP δεν μετατρέπεται εύκολα σε ATP και έτσι λαμβάνει χώρα συσσώρευση του πρώτου και ελάττωση του δεύτερου (πρακτικά το ATP εξαφανίζεται εντελώς 24 ώρες μετά τη σφαγή του ζώου). Το ADP αποφωσφορυλιώνεται γρήγορα σε AMP και απαμινώνεται σε IMP (κυρίαρχο νουκλεοτίδιο σε μυϊκούς ιστούς). Η μεταθανάτια αποικοδόμηση της IMP σε ινοσίνη και υποξανθίνη προκύπτει τόσο από αυτολυτικά όσο και από βακτηριακά ένζυμα (Εικόνα 2). Ανάλογα με το είδος του κρέατος και τις συνθήκες

χειρισμού και αποθήκευσης, μεταβάλλεται και ο βαθμός αποδόμησης της IMP (Ma et al., 2021).

Ως μέτρο αλλοίωσης των παραγώγων κρέατος χρησιμοποιείται η τιμή K, η οποία λαμβάνεται από τον λόγο της συγκέντρωσης ινοσίνης και υποξανθίνης προς το ολικό ATP (Σχέση 1). Όσο αυξάνεται η τιμή του λόγου K, τόσο μεγαλύτερη θεωρείται και η αλλοίωση του τροφίμου ([url: https://www.shodex.com/en/dc/02/03/12.html](https://www.shodex.com/en/dc/02/03/12.html))

$$K = \left(\frac{\text{Ινοσίνη} + \text{Υποξανθίνη}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{Ινοσίνη} + \text{Υποξανθίνη}} \right) \times 100$$

(Σχέση 1)



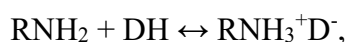
Εικόνα 2: Αποικοδόμηση του ATP σε ινοσίνη και υποξανθίνη (<https://www.shodex.com/en/dc/02/03/12.html>)

1.5.2 Ολικό πτητικό άζωτο (TVB-N)

Μετά την αποσύνθεση του ATP, οι πρωτεΐνες που είναι παρούσες στο κρέας αποικοδομούνται ταχέως από διάφορα βακτήρια και ένζυμα, προς τα αντίστοιχα πεπτίδια και αμινοξέα, τα οποία με τη σειρά τους διασπώνται σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (αμμωνία, αμίνες κ.α.) και υψηλής πτητικότητας. Συνεπώς η περιεκτικότητα σε πτητικές ενώσεις αζώτου και κυρίως σε αμμωνία (NH₃), διμεθυλαμίνη (DMA) και τριμεθυλαμίνη (TMA), χρησιμοποιείται ως ο κύριος δείκτης ανίχνευσης της αλλοίωσης των κρεάτων και των θαλασσινών. Η ύπαρξη και η

αυξανόμενη συγκέντρωση αυτών, προσδίδει στα τρόφιμα τη χαρακτηριστική υφή και οσμή του «αλλοιωμένου και χαλασμένου» προϊόντος. Γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης των TVB – N προκαλεί και αύξηση του pH στο συσκευασμένο τρόφιμο.

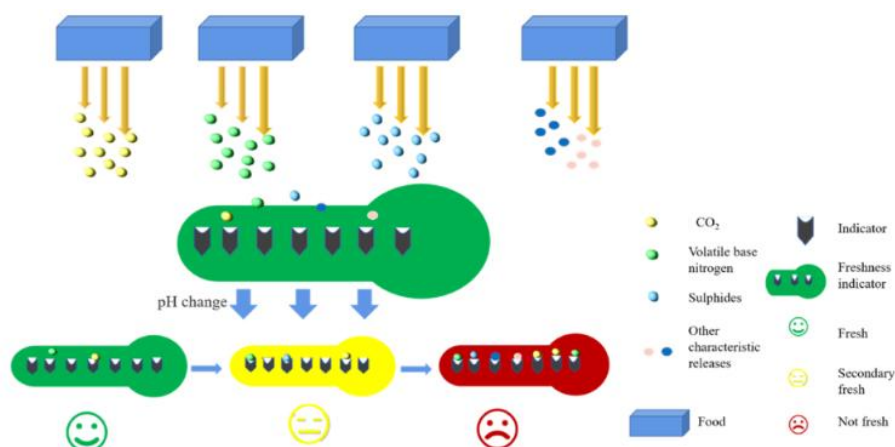
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους γίνεται μέσω αλκαλίωσης του δείγματος με οξείδιο του μαγνησίου (MgO) και επακόλουθη απόσταξη μεθ' υδρατμών και τιτλοδότηση με HCl ή H₂SO₄ (μέθοδος Conway & Byrne). Αυτή η μέθοδος είναι αρκετά χρονοβόρα και απαιτεί τεχνογνωσία για να πραγματοποιηθεί, επομένως δεν επιτρέπει στον καταναλωτή να καταλαβαίνει μόνος του εάν το προϊόν είναι ασφαλές. Ακόμη, για την ανίχνευση των TVB – N χρησιμοποιούνται ηλεκτροχημικοί δείκτες, δείκτες φθορισμού και pH. Από αυτούς, ο πιο απλός και οικονομικός είναι ο δείκτης pH, όπου μέσω της αλλαγής χρώματος (χρωμογόνος αισθητήρας) ο καθένας μπορεί να καταλάβει εάν το τρόφιμο έχει υποστεί αλλοίωση ή όχι. Μία θεωρητική εξίσωση που περιγράφει τη μεταβολή του χρώματος είναι η εξής (Shao et al., 2021; Wells et al., 2019):



Χρώμα A Χρώμα B

όπου R: ομάδα αλκυλίου, DH και D⁻ πρωτονιωμένη και αποπρωτονιωμένη μορφή του δείκτη pH.

Μία σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των δεικτών pH για ανίχνευση της φρεσκάδας ενός προϊόντος φαίνεται στην Εικόνα 3. Το χρώμα που εμφανίζεται όταν το τρόφιμο είναι φρέσκο ή μη, διαφέρει ανάλογα με τον δείκτη που είναι ενσωματωμένος στο υλικό συσκευασίας.



Εικόνα 3: Τρόπος δράσης των δεικτών φρεσκάδας στην έξυπνη συσκευασία (Shao et al., 2021).

1.6 Κατηγορίες χρωματομετρικών δεικτών ανίχνευσης TVB-N

1.6.1 Δείκτες pH

Σε κλειστές συσκευασίες τροφίμων, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των TVB – N, τόσο αυξάνεται και η τιμή του pH. Οι δείκτες pH έχουν ενσωματωμένες διάφορες ευαίσθητες στο pH χρωστικές (χημικές ή φυσικές) και είναι σχεδιασμένοι κατά τέτοιο τρόπο, ώστε όταν αυτές οι ενώσεις αλληλοεπιδράσουν με κάποιο οξύ ή βάση, να αλλάζει το χρώμα τους. Δεδομένου ότι αυτή η αλλαγή χρώματος είναι εμφανής με γυμνό μάτι, οι δείκτες pH είναι πολλά υποσχόμενοι για τη χρήση τους σε συσκευασίες ευαλλοίωτων τροφίμων και έχουν ευρεία προοπτική στην αγορά, με σκοπό την παρακολούθηση της κατάστασης φρεσκάδας αυτών. Έτσι οι προμηθευτές και οι καταναλωτές θα μπορούν να αναγνωρίζουν αμέσως εάν το εκάστοτε τρόφιμο είναι κατάλληλο για διανομή και κατανάλωση αντίστοιχα (Ma et al., 2021; Wu et al., 2021)

1.6.2 Συνθετικές χρωστικές ως χρωματομετρικοί δείκτες

Οι συνθετικοί χημικοί δείκτες – χρωστικές, αφενός εμφανίζουν αρκετά μεγάλη ευαισθησία στις αλλαγές του pH, μπορούν να παραχθούν σε βιομηχανική κλίμακα και σε χαμηλή τιμή, αφετέρου πολλοί από αυτούς εμφανίζουν τοξικότητα. Παρόλο που έχουν γίνει διάφορες έρευνες σχετικά με την ενσωμάτωση συνθετικών χρωστικών σε υλικά συσκευασίας, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς εάν αυτές οι ενώσεις αλληλοεπιδρούν ή μεταναστεύουν στο τρόφιμο. Σε καμία περίπτωση δεν είναι επιθυμητό από την επιστημονική κοινότητα, να παραχθούν υλικά συσκευασίας που να προειδοποιούν τους καταναλωτές για την κατάσταση φρεσκάδας του προϊόντος και να θέτουν σε κίνδυνο την υγεία τους, λόγω επιβλαβών προσθέτων (συνθετικές χρωστικές). Κάποιες τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να αποφευχθούν τα παραπάνω, είναι η χημική τροποποίηση των χρωστικών προς σταθεροποίησή τους, η ενθυλάκωση αυτών ή ο «εγκλωβισμός» τους μεταξύ δύο άλλων μη επιβλαβών για το τρόφιμο στρωμάτων. Βέβαια, οι δύο τελευταίες μέθοδοι πιθανόν να παρατείνουν τον χρόνο απόκρισης των δεικτών, διότι οι TVB – N θα πρέπει να διαπεράσουν και άλλα στρώματα μεμβρανών μέχρι να έρθουν σε επαφή με τον δείκτη και να επέλθει η χρωματική αλλαγή. Οι πιο συνηθισμένες συνθετικές χρωστικές που έχουν μελετηθεί για τον έλεγχο της

φρεσκάδας σε κρέατα και θαλασσινά καθώς και η μεταβολή του χρώματός τους, φαίνονται στον Πίνακα 2 (Ma et al., 2021; Wu et al., 2021).

Πίνακας 2: Συνθετικές χρωστικές ως χρωματομετρικοί δείκτες στην έξυπνη συσκευασία.

Συνθετική χρωστική	Ανίχνευση	Αλλαγή χρώματος κατά την αλλοίωση	pH μεταβολής χρώματος
Πράσινο της βρωμοκρεσόλης	TVB – N	Κίτρινο → μπλε	pH > 6
Μωβ της βρωμοκρεσόλης	TVB – N	Κίτρινο → μωβ	pH > 6
Φαινολοφθαλεΐνη	TVB – N	Άχρωμο → ροζ	pH > 8
Πολυανιλίνη	TVB – N	Πράσινο → μπλε	pH > 6
Ο - φαινυλενοδιαμίνη	TVB – N	Κόκκινο → κίτρινο	pH > 6
2,4,6 - τρινιτροφαινόλιο	TMA	Κίτρινο → κόκκινο	pH > 6
Αλιζαρίνη	TVB – N	Κίτρινο → μωβ	pH > 6,3
Ερυθρό του μεθυλίου	TVB – N	Κόκκινο → κίτρινο	pH > 6,2

1.6.3 Φυσικές χρωστικές ως χρωματομετρικοί δείκτες

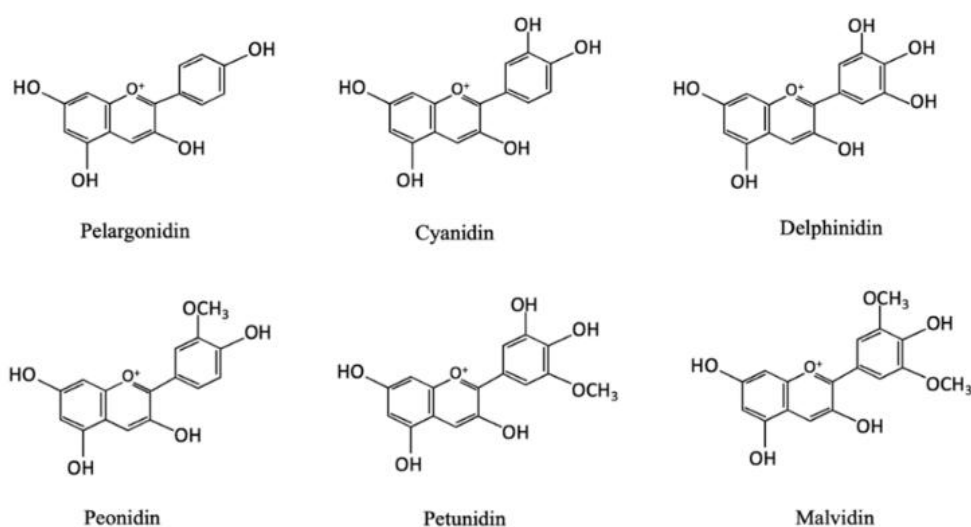
Εξαιτίας των πιθανών κινδύνων στην υγεία των καταναλωτών και της τοξικότητας των συνθετικών χρωστικών, οι επιστήμονες τα τελευταία χρόνια άρχισαν να εστιάζουν την προσοχή τους στην εύρεση φυσικών χρωστικών που να είναι ευαίσθητες στις μεταβολές του pH, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως χρωματομετρικοί δείκτες σε έξυπνες συσκευασίες τροφίμων. Οι σημαντικότερες από αυτές τις χρωστικές είναι οι ανθοκυανίνες, η κουρκουμίνη και η χλωροφύλλη (Wu et al., 2021).

Η κουρκουμίνη είναι μια πολυφαινόλη που εκχυλίζεται από τον κουρκουμά και παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη δράση και έντονο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα. Σε εύρος pH 1–7, παρουσιάζει κίτρινο χρώμα και για pH>8, το χρώμα της κουρκουμίνης αλλάζει σε κόκκινο-πορτοκαλί. Η κουρκουμίνη στο εύρος pH (6-6,5) στο οποίο αλλοιώνονται τα προϊόντα κρέατος, μεταβάλλει το χρώμα της από κίτρινο σε ανοιχτό πορτοκαλί, μία αλλαγή που δεν γίνεται εύκολα αντιληπτή από τον καταναλωτή. Συνεπώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έξυπνος δείκτης σε υλικά

συσκευασίας τέτοιου είδους τροφίμων (Wu et al., 2021). Η ενσωμάτωση της χλωροφύλλης σε συσκευασίες τροφίμων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, ενώ η δράση των ανθοκυανινών σε αυτές παρουσιάζεται παρακάτω.

1.6.3.1 Ανθοκυανίνες

Οι περισσότερες φυσικές χρωστικές ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινόλων. Ειδικότερα, οι ανθοκυανίνες είναι οι πιο κοινές φυσικές χρωστικές και βρίσκονται σε πληθώρα φρούτων, λαχανικών και φυτών τα οποία εμφανίζουν μπλε, κόκκινες ή μωβ αποχρώσεις (κόκκινο λάχανο, γλυκοπατάτα, βατόμουρα, σμέουρα, σταφύλια κ.α.).



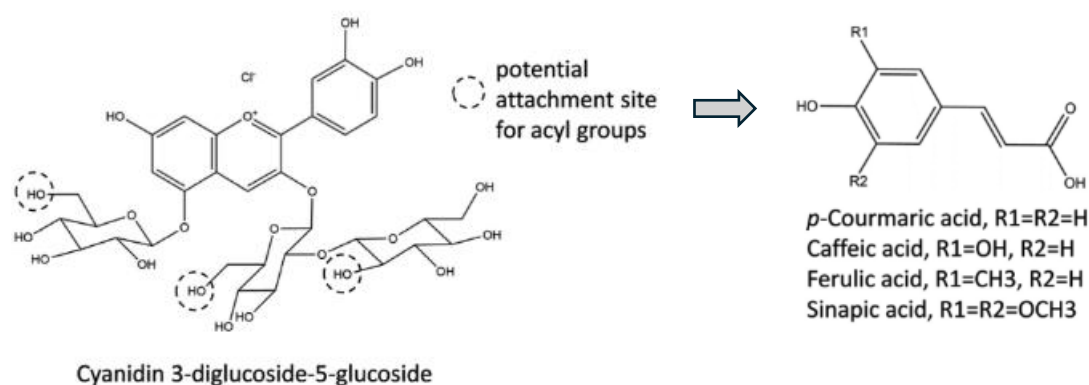
Εικόνα 4: Οι χημικές δομές των κυριότερων ανθοκυανινών (Oladzadabbasabadi et al., 2022).

Όταν μεταβάλλεται το pH του μέσου στο οποίο περιέχονται ανθοκυανίνες, αυτές αλλάζουν δομή και ταυτόχρονα χρώμα. Γενικά, σε pH 2 – 3 έχουν έντονο κόκκινο χρώμα, σε pH 5 – 5,5 το χρώμα τους μεταβάλλεται σε ροζ – μωβ, ενώ σε pH > 7 σε πράσινο (Janseerat et al., 2024; Thottathil Nazar et al., 2023). Ακόμη, το χρώμα των ανθοκυανινών μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με την πηγή εκχύλισής τους.

1.6.3.2 Ανθοκυανίνες κόκκινου λάχανου (*Brassica oleraceae*)

Το κόκκινο λάχανο (*Brassica oleraceae*) αποτελεί μια εξαιρετική πηγή βιταμινών (K, C), ιχνοστοιχείων καθώς και ανθοκυανινών συγκριτικά με άλλα φρούτα και λαχανικά. Η περιεκτικότητα των ανθοκυανινών σε αυτό εξαρτάται από την ποικιλία του λάχανου,

τις γεωργικές πρακτικές και το χρόνο ωρίμανσής του. Σε εκχυλίσματα κόκκινου λάχανου έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 30 διαφορετικές ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι ακυλιωμένα ή μη παράγωγα του κυανιδιν-3-διγλυκοζίτη-5-γλυκοζίτη (cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside). Οι συνήθεις ομάδες ακυλίου είναι αρωματικά οξέα όπως το *p* – κουμαρικό, το φερουλικό κ.α., ενώ στην πλειονότητά τους τα ακυλιωμένα παράγωγα εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα (υψηλότερη θερμική και φωτο – σταθερότητα, αντιοξειδωτική ικανότητα) έναντι των μη ακυλιωμένων παραγώγων (Ghareaghajlou et al., 2021; Wiczowski et al., 2013).

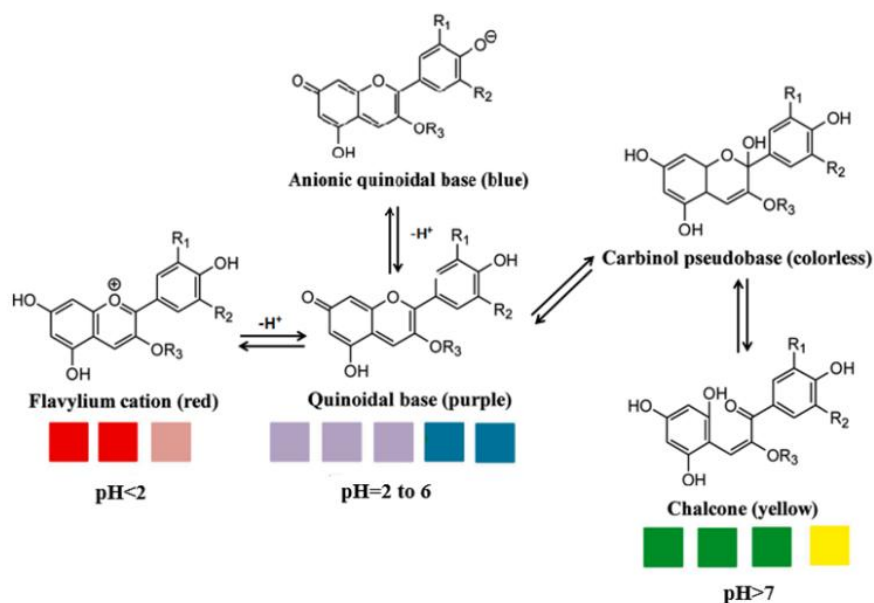


Εικόνα 5: Χημική δομή της βασικής ανθοκυανίνης του κόκκινου λάχανου (Zhang & Jing, 2022).

Στην Εικόνα 6 φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο μεταβάλλεται το χρώμα του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο συναρτήσει του pH. Συγκεκριμένα, σε pH < 2 λόγω παρουσίας του κατιόντος φλαβυλίου (flavylium cation) κυριαρχεί το έντονο κόκκινο χρώμα, ενώ σε pH 2 – 6 το χρώμα τους μεταβάλλεται σε μωβ / μπλε λόγω σχηματισμού μιας κινωειδούς βάσης (quinoidal base). Στη συνέχεια, καθώς αυξάνεται το pH σχηματίζεται μια ψευδοβάση καρβινόλης (carbinol pseudobase) η οποία είναι άχρωμη, ενώ σε pH > 7 προκαλείται μείωση της σταθερότητας των ανθοκυανινών και σχηματισμός χαλκόνης (chalcone), συνεπώς το χρώμα μεταβαίνει αρχικά σε πράσινο και στη συνέχεια σε κίτρινο (Abedi-Firoozjah et al., 2022).

Παρόλο που οι ανθοκυανίνες είναι ευρέως διαθέσιμες, μη τοξικές, δρουν ως αντιοξειδωτικά – μειώνουν το οξειδωτικό στρες και είναι βιοαποικοδομίσιμες, αποικοδομούνται εύκολα υπό την επίδραση του φωτός, των ενζύμων, του οξυγόνου, του pH, της θερμοκρασίας κ.α. Μελέτες έχουν δείξει πως οι ανθοκυανίνες που λαμβάνονται από εκχύλιση κόκκινου λάχανου είναι πιο ανθεκτικές και δεν

αποσυντίθενται τόσο εύκολα όσο αυτές άλλων εκχυλίσματων (Ghareaghajlou et al., 2021).



Εικόνα 6: Αλλαγές χρωμάτων των ανθοκυανινών εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου συναρτήσει του pH (Abedi-Firoozjah et al., 2022).

Συνεπώς, για να χρησιμοποιηθούν οι ανθοκυανίνες του κόκκινου λάχανου ως χρωματομετρικοί δείκτες σε έξυπνες συσκευασίες τροφίμων θα πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι και τρόποι που να ενισχύουν τη σταθερότητά τους. Έρευνες έχουν δείξει πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανθοκυανινών με πολυσακχαρίτες, αυξάνουν τη σταθερότητα των πρώτων, πιθανώς λόγω των σχηματισθέντων δεσμών υδρογόνου, των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή και των $\pi - \pi$ συζευγμένων συστημάτων, μέσω των οποίων ενισχύεται περαιτέρω το χρώμα τους. Ακόμη, αναφέρεται ότι προτιμάται η εκχύλιση των ανθοκυανινών να γίνεται με οξύ και αιθανόλη χωρίς επιπλέον διαδικασίες καθαρισμού, διότι οι ακατέργαστες ανθοκυανίνες περιέχουν πολυσακχαρίτες ή φαινολικά οξέα, τα οποία ενισχύουν τη σταθερότητά τους (Ma et al., 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: MEMBRANES

2.1 Εδώδιμες μεμβράνες

Τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται όλο και πιο συχνά λόγος για την ανάπτυξη εδώδιμων μεμβρανών (edibles films) και επικαλύψεων (coatings), ως μια εναλλακτική συσκευασία τροφίμων. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη τεχνολογία προϋπήρχε από τους προϊστορικούς ακόμα χρόνους, όπου οι άνθρωποι είχαν παρατηρήσει την ευεργετική επίδραση των μεμβρανών στη συντήρηση των τροφίμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κάλυψη των θηραμάτων τους είτε με το δέρμα τους είτε με φύλλα. Σύντομα ανακάλυψαν τον πηλό και την τεχνική της ανόπτησης (annealing) ώστε να τον σχηματοποιούν και έτσι κατασκεύαζαν διάφορους περιέκτες για τα τρόφιμά τους, ενώ αργότερα εφηύραν διάφορες τεχνικές λαμιναρίσματος των επιφανειών των περιεκτών με φύλλα μετάλλου ή κηρούς βελτιώνοντας αισθητά τις ιδιότητές τους.

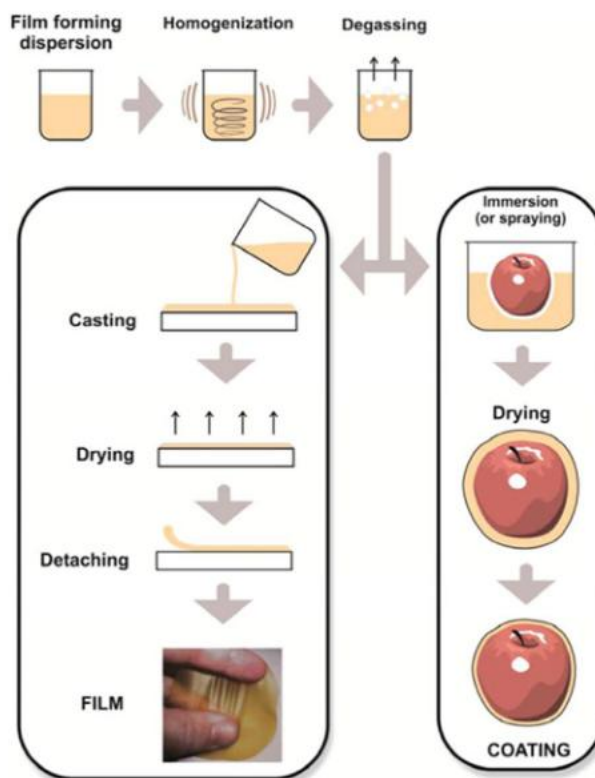
Στα Βυζαντινά χρόνια (330 – 1453 μ.Χ.) έγιναν οι πρώτες καταγραφές ανάπτυξης μεμβρανών (φιλμ) πάνω σε τρόφιμα. Συγκεκριμένα, εκείνη την περίοδο χρησιμοποιούνταν διάφορα φυσικά συστατικά που ήταν εύκολο να μορφοποιηθούν ώστε να πάρουν το σχήμα του τροφίμου και να σχηματίσουν ένα φιλμ πάνω σε αυτό. Στην πλειονότητά τους, επιλέγονταν υλικά που να μπορούν πρώτα απ' όλα να σχηματίσουν φιλμ αλλά και να έχουν υψηλό φραγμό στο οξυγόνο και γενικότερα στον αέρα που αλλοίωνε τα τρόφιμα. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονταν διάφορα κεριά ή μελιτώδη υλικά (π.χ. ρετσίνι), τα οποία επαλείφονταν ως επί το πλείστον σε φρούτα, τυριά και κρέατα, μειώνοντας κατά πολύ τη διαπερατότητα του αέρα και αποκλείοντας την επαφή αυτού με την επιφάνεια του τροφίμου και κατά επέκταση με την αλλοίωσή του (Μοδίτση, 2012).

Έχουν δοθεί διάφοροι ορισμοί για τις εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις. Σύμφωνα με τους Dehghani et al., (2018) οι δύο έννοιες φαίνεται να είναι πανομοιότυπες, παρόλα αυτά τις χαρακτηρίζει μια σημαντική διαφορά:

- **Εδώδιμη ή βρώσιμη μεμβράνη:** ορίζεται ως οποιοδήποτε είδος ενός λεπτού στρώματος υλικού που χρησιμοποιείται για την επικάλυψη ενός τροφίμου, ώστε να παραταθεί η διάρκεια ζωής του τροφίμου. Οι εδώδιμες μεμβράνες αποτελούν προσχηματισμένες, ανεξάρτητες δομές που μπορούν να

τοποθετηθούν εξωτερικά ή / και ανάμεσα από τα συστατικά ενός τροφίμου. Ακόμη, είναι επιτρεπτή η κατανάλωση της μεμβράνης μαζί με το τρόφιμο εφόσον είναι επιθυμητή από τον καταναλωτή.

- **Εδώδιμη επικάλυψη:** ορίζεται ως ένα λεπτό φύλλο από φυσικά πολυμερή που σχηματίζεται απευθείας στην επιφάνεια του τροφίμου μέσω της τεχνικής της εμβάπτισης ή του ψεκασμού, ενώ η κατανάλωση της μεμβράνης γίνεται αναγκαστικά μαζί με το τρόφιμο.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση παραγωγής εδώδιμων μεμβρανών (αριστερά) και επικαλύψεων (δεξιά) (Mohamed et al., 2020).

Έως τη δεκαετία του 1990 οι βιομηχανίες τροφίμων δεν εκμεταλλεύονταν επαρκώς τα οφέλη των εδώδιμων μεμβρανών ώστε να αυξήσουν τη διατήρηση της ποιότητας και της ασφάλειας διαφόρων τροφίμων. Σήμερα, λόγω των αυξημένων συστημάτων διανομής, μεταφοράς και αποθήκευσης και εξαιτίας του γεγονότος ότι τα τρόφιμα δεν καταναλώνονται άμεσα από τον καταναλωτή, οι βρώσιμες μεμβράνες χρησιμοποιούνται ευρέως για αύξηση της διατηρησιμότητάς τους.

2.2 Είδη εδωδιμων μεμβρανών

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των εδωδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες (Umaraw & Verma, 2017):

1. Υδροκολλοειδή (όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, αλγινικά άλατα)
2. Λιπίδια (όπως λιπαρά οξέα, ακυλογλυκερόλη, κερί)
3. Σύνθετα υλικά (μεμβράνες που παρασκευάζονται από τόσο από υδροκολλοειδή όσο και από λιπίδια)

Τα υδροκολλοειδή είναι πολυμερή με μακρά ανθρακική αλυσίδα, τα οποία έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη συνεκτικότητα του αρχικού υλικού, αυξάνοντας το ιξώδες του. Στα θετικά χαρακτηριστικά των εδωδιμων μεμβρανών από υδροκολλοειδή συμπεριλαμβάνονται ο υψηλός φραγμός στο οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα, τα λιπίδια καθώς και οι καλές μηχανικές ιδιότητες, ενώ στα αρνητικά ο χαμηλός φραγμός στο νερό, εφόσον τόσο οι πρωτεΐνες όσο και οι πολυσακχαρίτες είναι υδατοδιαλυτές ενώσεις. Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των εδωδιμων μεμβρανών που παρασκευάζονται από υδροκολλοειδή είναι οι εξής (Hammam, 2019; Kumar et al., 2022; Matloob et al., 2023; Umaraw & Verma, 2017):

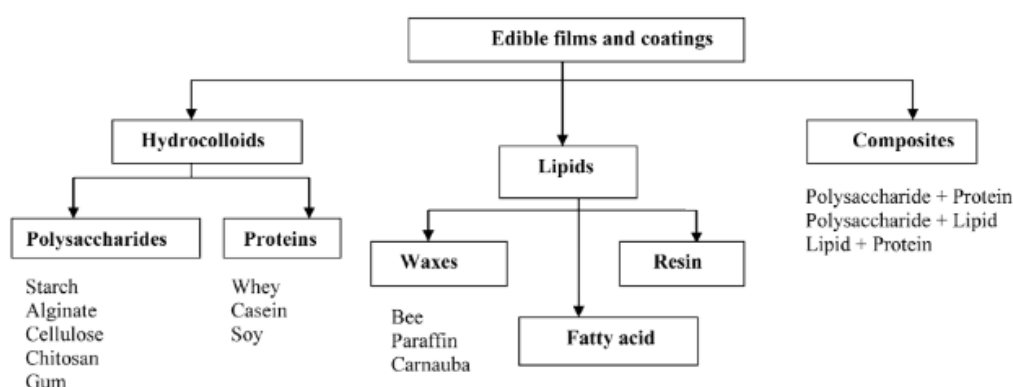
- Πρωτεΐνες: έρευνες έχουν δείξει πως οι μεμβράνες που παρασκευάζονται από πρωτεΐνες εμφανίζουν αυξημένη συνοχή, γεγονός που οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Βασική προϋπόθεση για να συμβεί αυτό είναι να μετουσιωθεί η πρωτεΐνη, δηλαδή να διαλυθεί η τεταρτοταγής και η τριτοταγής δομή της, ώστε οι πλέον μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να αλληλοεπιδράσουν τόσο μεταξύ τους όσο και με το διαλύτη, μέσω δυνάμεων van der Waals, ιοντικών ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ή σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Οι κυριότερες πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται είναι το κολλαγόνο ή η ζελατίνη, η καζεΐνη, πρωτεΐνες από γάλα, από ασπράδι αυγού, από καλαμπόκι, σόγια, γλουτένη σίτου, καθώς και πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης (μπιζέλια, κολοκύθια κ.α.).
- Πολυσακχαρίτες: πρόκειται για υδροκολλοειδή υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία είναι υδρόφιλες ενώσεις και έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το νερό (διαλύτης) δημιουργώντας πηκτή. Εξαιτίας αυτού, οι

μεμβράνες που παράγονται έχουν αρκετή ελαστικότητα και εμφανίζουν άριστες μηχανικές και δομικές ιδιότητες. Οι πιο χρησιμοποιούμενοι πολυσακχαρίτες είναι η κυτταρίνη και τα παράγωγά της (μεθυλοκυτταρίνη, καρβοξυ-μεθυλοκυτταρίνη, υδροξυπροπυλ-μεθυλοκυτταρίνη), η χιτοζάνη, το άμυλο, η πηκτίνη, η καραγεννάση, η πουλλουλάνη και τα αλγινικά άλατα. Γενικά οι γραμμικοί πολυσακχαρίτες σχηματίζουν καλύτερες εδώδιμες μεμβράνες, με αυτές της κυτταρίνης και των παραγώγων της να παρουσιάζουν τον υψηλότερο φραγμό στους υδρατμούς και το οξυγόνο έναντι των υπολοίπων. Επιπλέον, η μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα των πολυσακχαριτών, το χαμηλό κόστος και το γεγονός ότι δεν εμφανίζουν καμία τοξικότητα, ενισχύουν τη θέληση των βιομηχανιών τροφίμων να χρησιμοποιήσουν τέτοιου είδους εδώδιμες μεμβράνες για τη συσκευασία των προϊόντων τους.

Τα λιπίδια είναι υδρόφοβες ενώσεις, οπότε οι μεμβράνες που σχηματίζουν διαθέτουν υψηλό φραγμό στην υγρασία. Η τεχνική επικάλυψης του κρέατος με λιπαρές ύλες προϋπάρχει από τον 16^ο αιώνα, όπου λαρδί επιστρώνονταν στην επιφάνεια του κρέατος για να προληφθεί η συρρίκνωση και η αλλοίωση αυτού, λόγω αλληλεπίδρασης με την ατμοσφαιρική υγρασία. Αργότερα άρχισαν να χρησιμοποιούνται και άλλες πηγές λιπιδίων, όπως κεριά, παραφίνη και διάφορα φυτικά έλαια. Στα μειονεκτήματα των εδώδιμων μεμβρανών από λιπίδια, περιλαμβάνονται η χαμηλή αντοχή και ελαστικότητά τους. Γι' αυτό τον λόγο η χρήση τους σε καθαρή μορφή είναι περιορισμένη (Kumar et al., 2022; Umaraw & Verma, 2017).

Η ανάγκη παρασκευής σύνθετων βρώσιμων υλικών συσκευασίας προέκυψε με σκοπό τη δημιουργία μεμβρανών που να έχουν τις επιθυμητές ιδιότητες, ανάλογα με το προϊόν που πρόκειται να συσκευαστεί. Αναφορικά με τη συσκευασία του νωπού κρέατος, η μεμβράνη πρέπει να έχει χαμηλή διαπερατότητα στους υδρατμούς, μεσαίο φραγμό στο οξυγόνο (ώστε να επικρατεί η μορφή της οξυμυογλοβίνης και να παρεμποδιστεί η παραγωγή μεταμυογλοβίνης), ενώ στο μαγειρεμένο κρέας και στα παστά απαιτείται υψηλός/απόλυτος φραγμός στο οξυγόνο. Τα αλλαντικά, πέρα από υλικά συσκευασίας με μηδαμινή διαπερατότητα στο οξυγόνο, πρέπει να περιβάλλονται από αδιαφανείς μεμβράνες, διότι αλλοιώνονται πολύ εύκολα υπό την επίδραση του φωτός. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα υδροκολλοειδή (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες) αποτελούν εξαιρετικές πρώτες ύλες για παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών με καλές μηχανικές ιδιότητες και υψηλό φραγμό στο οξυγόνο και στα αέρια, ενώ τα λιπίδια

σχηματίζουν λιγότερο ανθεκτικές μεμβράνες με χαμηλή διαπερατότητα στους υδρατμούς. Επομένως ένα σύνθετο υλικό με βάση κάποια πρωτεΐνη ή πολυσακχαρίτη και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μιας λιπαρής ουσίας θα έδινε την κατάλληλη εδώδιμη μεμβράνη για τη συσκευασία νωπού κρέατος. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πολυστρωματικά υλικά για την επίτευξη των επιθυμητών ιδιοτήτων, τα οποία όμως δεν έχουν τόσο καλές μηχανικές ιδιότητες, όσο τα σύνθετα υλικά που παρασκευάζονται με την υγρή μέθοδο (έγχυση διαλύματος σε τρυβλία και εξάτμιση διαλύτη) (Hammam, 2019; Kumar et al., 2022; Matloob et al., 2023; Schumann & Schmid, 2018; Umaraw & Verma, 2017).



Εικόνα 8: Κατηγοριοποίηση των εδώδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων βάσει των συστατικών τους (Amrita Poonia, 2017).

2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα εδώδιμων μεμβρανών

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD), το 40% των πλαστικών αποβλήτων παγκοσμίως προέρχεται από τις συσκευασίες. Ειδικότερα, σύμφωνα με την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency, EPA), οι συσκευασίες τροφίμων και ποτών αντιπροσωπεύουν το 83% των πλαστικών απορριμμάτων ([url: https://ourworldindata.org/data-insights/packaging-is-the-source-of-40-of-the-planets-plastic-waste](https://ourworldindata.org/data-insights/packaging-is-the-source-of-40-of-the-planets-plastic-waste)).

Παρά τις προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας και των βιομηχανιών τροφίμων τις τελευταίες δεκαετίες, να χρησιμοποιούνται όσο το δυνατόν περισσότερα εδώδιμα και γενικά βιοαποικοδομήσιμα υλικά συσκευασίας, με σκοπό τη μείωση των περιβαλλοντικών συνεπειών από τα πλαστικά απορρίμματα, η χρήση τους συνεχίζει να είναι περιορισμένη.

Τα πλεονεκτήματα των εδώδιμων μεμβρανών είναι πολυάριθμα, με κυριότερο ότι δεν μολύνουν το περιβάλλον, λόγω γρήγορης αποσύνθεσής τους, εφόσον πρόκειται για πλήρως βιοαποικοδομήσιμα υλικά, ενώ κάποια από αυτά μπορούν να καταναλωθούν μαζί με το προϊόν χωρίς να αφήνουν καθόλου απόβλητα. Επιπλέον παράγονται από εδώδιμες/ανανεώσιμες πρώτες ύλες, είναι δυνατόν να ενσωματωθούν σε αυτά ουσίες όπως αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά κ.α. βελτιώνοντας τη διάρκεια συντήρησης των τροφίμων, τη θρεπτική τους αξία ή / και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Μέσω των εδώδιμων μεμβρανών, μπορεί να πραγματοποιηθεί ενθυλάκωση διαφόρων ουσιών και ενσωμάτωση αυτών σε τροφές, με αποτέλεσμα τη σταδιακή και ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους κατά την παραγωγική διαδικασία ή τη συντήρησή των προϊόντων. Τέλος, η διαδικασία παρασκευής τους είναι αρκετά απλή και οι πρώτες ύλες είναι διαθέσιμες και οικονομικές (Fennema et al., 1994; Miller & Krochta, 1997; Šuput et al., 2015).

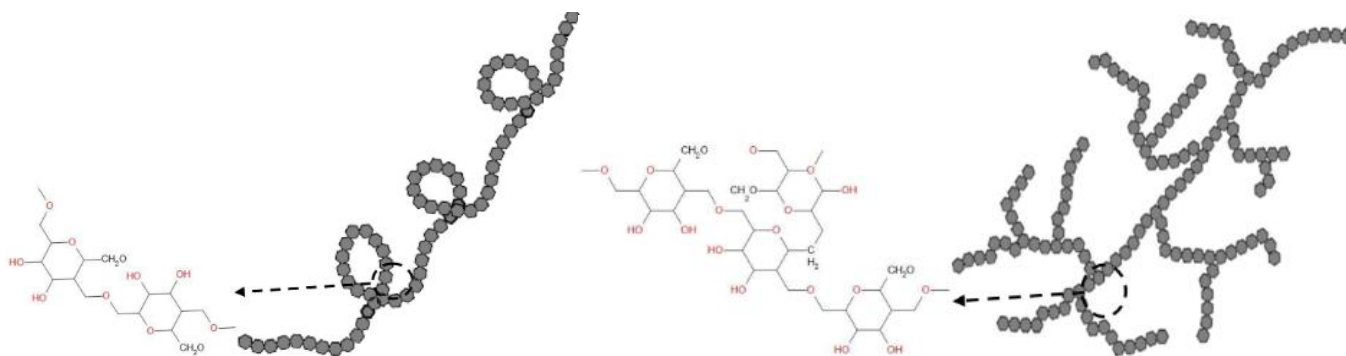
Στα μειονεκτήματα των εδώδιμων μεμβρανών περιλαμβάνεται το γεγονός ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό τους, χαρακτηρίζονται από καλές ιδιότητες φραγμού αερίων, οπότε μπορεί να προκληθεί στο τρόφιμο αναερόβια αναπνοή, ενώ υλικά που παρασκευάζονται από υδροκολλοειδή είναι υγροσκοπικού χαρακτήρα, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στη μικροβιακή ανάπτυξη.

Συνοψίζοντας, τα πλεονεκτήματα των εδώδιμων μεμβρανών υπερτερούν έναντι των μειονεκτημάτων τους, όμως απαιτείται λεπτομερής μελέτη και έρευνα ώστε να βρεθεί η κατάλληλη επικάλυψη για ένα συγκεκριμένο προϊόν, λαμβάνοντας υπόψιν τη βιοχημεία του τροφίμου καθώς και τυχόν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις των συστατικών του με αυτά της μεμβράνης.

2.4 Μεμβράνη από άμυλο καλαμποκιού

Το άμυλο είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης και αποτελεί ένα εκ των τριών βασικών συστατικών (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη) της ανθρώπινης διατροφής, ενώ περιέχεται σε τρόφιμα όπως το ρύζι, η πατάτα, το καλαμπόκι, το σιτάρι κ.α. τα βιοπολυμερή που απαρτίζουν το άμυλο είναι η αμυλόζη και η πηκτίνη σε ποσοστά 20-25% και 75-80% αντίστοιχα. Η αμυλόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από 200 μονομερή D-γλυκόζης, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με α-(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό σε γραμμική διάταξη. Σύμφωνα με μελέτες ανά 6 μόρια γλυκόζης,

η δομική αλυσίδα της αμυλόξης διπλώνεται και σχηματίζει πηνία (Εικόνα 9, αριστερά), χωρίς όμως να επηρεάζει τη συνολική γραμμικότητα του μορίου. Η αμυλοπηκτίνη έχει την ίδια χημική δομή με την αμυλόξη, απαρτίζεται από 300 – 400 μόρια D-γλυκόζης, με τη διαφορά ότι αυτά συνδέονται με α -(1,6) γλυκοζιτικό δεσμό, δημιουργώντας έτσι ένα μόριο με διακλαδώσεις. Η αναλογία αμυλόξης/αμυλοπηκτίνης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του αμύλου (Panou & Karabagias, 2023; Wang et al., 2022).



Εικόνα 9: Δομή της αμυλόξης (αριστερά) και της αμυλοπηκτίνης (δεξιά) (Wang et al., 2022).

Περίπου το 65% των απαιτήσεων της παγκόσμιας βιομηχανίας αμύλου, καλύπτεται από άμυλο καλαμποκιού, ενώ τις αμέσως επόμενες θέσεις καλύπτουν η γλυκοπατάτα ($\approx 13\%$) και η κασάβα ($\approx 11\%$). Από τα παραπάνω, το άμυλο καλαμποκιού είναι αυτό που χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή βιοδιασπώμενων και εδώδιμων μεμβρανών. Οι μεμβράνες που παράγονται είναι ημιδιαφανείς ή διαφανείς, άοσμες και άγευστες, έχουν υψηλό φραγμό σε αέρια και σχετικά καλές μηχανικές ιδιότητες. Στα μειονεκτήματα αυτών των μεμβρανών περιλαμβάνονται η ευαισθησία τους στο νερό (υψηλή διαπερατότητα στους υδρατμούς) και η ευθραυστότητά τους. Για δημιουργία πιο εύκαμπτων φιλμ χρησιμοποιούνται φυσικοί πλαστικοποιητές όπως η γλυκερόλη, η σορβιτόλη και η ξυλιτόλη (Mohamed et al., 2020; Panou & Karabagias, 2023; Wang et al., 2022).

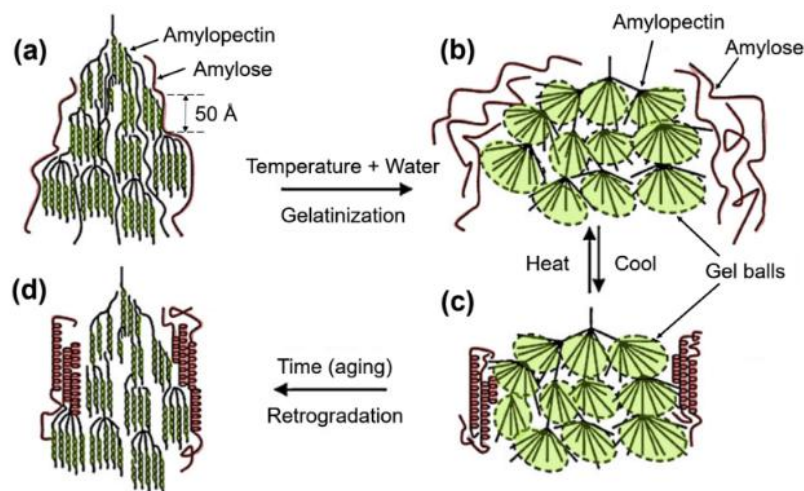
Το άμυλο κατά την προσθήκη του σε νερό υφίσταται ζελατινοποίηση, δηλαδή πραγματοποιείται μη αντιστρεπτή διόγκωση των κόκκων αμύλου, κατά τη θέρμανση πάνω από μια κρίσιμη θερμοκρασία, οδηγώντας σε μέγιστη κοκκώδη διόγκωση, «έκρηξη» του κόκκου και σχηματισμού πηκτής. Η ζελατινοποίηση του αμύλου πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Ojogbo et al., 2020; Wang et al., 2022):

- 1^ο στάδιο: τα μόρια του αμύλου μπορούν να απορροφήσουν νερό αναστρέψιμα σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 20 – 60 °C. Η μοριακή δομή του αμύλου δεν επηρεάζεται από αυτή τη θερμική επεξεργασία και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου εξακολουθούν να υπάρχουν.
- 2^ο στάδιο: καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται (60 – 90 °C), συμβαίνει αποκόλληση των επιμέρους συστατικών του αμύλου, της αμυλόζης από την αμυλοπηκτίνη, διότι οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου σπάνε. Έτσι τα μόρια του νερού μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις ελεύθερες πλέον υδροξυλομάδες του αμύλου και να αρχίσει ο σχηματισμός της πηκτής.

Στην Εικόνα 10 απεικονίζεται σχηματικά η διαδικασία ζελατινοποίησης του αμύλου:

(a) → Αρχικά φαίνεται η δομή των κόκκων αμύλου και η διάταξη της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης σε αυτό.

(b) → Στη συνέχεια, με προσθήκη νερού και αύξηση της θερμοκρασίας, αρχίζουν να διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου, προσροφώνται μόρια νερού, πραγματοποιείται διόγκωση των κόκκων καθώς και διαχωρισμός/μεταφορά της αμυλόζης προς το διάλυμα. Έτσι σχηματίζεται η πηκτή αμύλου.



Εικόνα 10: Ζελατινοποίηση και αναδιάταξη του αμύλου (Ojogbo et al., 2020).

(c) → Όταν η θερμοκρασία πέσει τα μόρια της αμυλόζης επαναδιατάσσονται, αφού έχουν πάρει μια μορφή «πηνίου».

(d) → Τέλος κατά την αποθήκευση γίνεται ανακρυστάλλωση των μορίων αμυλοπηκτίνης, με αποβολή/εξάτμιση των μορίων νερού.

Η θερμοκρασία ζελατινοποίησης εξαρτάται από το ποσοστό αμυλόζης/αμυλοπηκτίνης του αμύλου. Η αμυλόζη, ως γραμμικό μόριο, έχει πιο εκτεταμένους δεσμούς υδρογόνου, οπότε απαιτείται περισσότερη ενέργεια για τη διάσπασή τους και την επίτευξη σχηματισμού gel. Συνεπώς, άμυλο με υψηλότερη περιεκτικότητα σε αμυλόζη απαιτεί μεγαλύτερη θερμοκρασία για ζελατινοποίηση, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το άμυλο με αναλογία 70/30 σε αμυλόζη/αμυλοπηκτίνη, το οποίο ζελατινοποιείται σε θερμοκρασίες γύρω στους 160 – 170 °C.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά και θερμοκρασία ζελατινοποίησης διαφόρων πηγών αμύλου (Ojogbo et al., 2020; Olkku & Rha, 1978; Zhu, 2015).

Πηγή αμύλου	% αμυλόζη	% αμυλοπηκτίνη	Θερμοκρασία ζελατινοποίησης (°C)
Καλαμπόκι	28	72	62 – 72
Ρύζι	20 – 30	80 – 70	55 – 79
Πατάτα	23 – 31	77 – 69	60 – 65
Κασάβα	16 – 25	84 – 75	60 – 80
Σιτάρι	30	70	58 – 64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΡΕΑΣ

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) Αριθ. 853/2004, ως κρέας ορίζονται τα εδώδιμα μέρη των ζώων και συγκεκριμένα των οικόσιτων βοοειδών, των χοίρων, των αιγοπροβάτων, των πουλερικών καθώς και των άγριων και εκτρεφόμενων θηραμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του αίματος. Ως νωπό κρέας ορίζεται το κρέας που δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία συντήρησης πέρα από την ψύξη, την κατάψυξη ή την ταχεία κατάψυξη, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που είναι συσκευασμένο σε κενό αέρος (vacuum) ή σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (MAP) (Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, 2004). Επιπλέον, σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών ως κρέας χαρακτηρίζονται τα αυτοτελή σώματα ή τμήματα θερμόαιμων ζώων ή πτηνών που είναι κατάλληλα για την ανθρώπινη διατροφή και διατίθενται στην αγορά ως έχουν, χωρίς να έχουν υποστεί καμία επιπλέον διεργασία εκτός της ψύξης.

3.1 Είδη κρέατος

Ανάλογα με την ποσότητα της μυοσφαιρίνης που περιέχεται στους ιστούς τους, τα κρέατα χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα κόκκινα (βοδινό, χοιρινό, αιγοπρόβειο) και τα λευκά κρέατα (πουλερικά, κουνέλια). Συγκεκριμένα:

- **Βοδινό κρέας:** προέρχεται από μοσχάρια ή από νεαρά βοοειδή μέγιστου βάρους 342 κιλών. Τα βοοειδή, ανάλογα με την ηλικία του ζώου διακρίνονται σε μόσχους γάλακτος (4 μηνών έως 1 έτους), μόσχους στάβλου (1 έως 2 ετών) και δαμάλια (2 έως 3 ετών).
- **Χοιρινό κρέας:** προέρχεται από χοίρους ηλικίας 6-7 μηνών (80-110 κιλά), ενώ το μεγαλύτερο μέρος του χρησιμοποιείται για την παραγωγή ζαμπόν, μπέικον και λουκάνικων.
- **Αρνίσιο κρέας:** προέρχεται κυρίως από πρόβατα ηλικίας 7-8 μηνών (≈55 κιλά), ενώ μπορούν να σφαγιαστούν και ζώα μεγαλύτερης ηλικίας, των οποίων το κρέας είναι λιγότερο τρυφερό.

- **Κρέας πουλερικών:** προέρχεται από κοτόπουλα, κόττες, ή κόκορες. Μεταξύ αυτών, οι κόκορες είναι αρσενικά πουλερικά με σκληρό και σκούρο χρώμα κρέατος, ενώ οι κόττες είναι θηλυκά με πιο τρυφερό κρέας συγκριτικά με αυτό των κοκόρων. Τα κοτόπουλα έχουν ανοιχτό χρώμα κρέατος και ζυγίζουν περίπου 2 κιλά.
- **Κρέας κουνελιού:** υπάρχουν δυο είδη κουνελιού, το νεαρό και το ώριμο. Με τον 1^ο όρο χαρακτηρίζεται το κουνέλι ηλικίας 12 εβδομάδων το οποίο ζυγίζει περίπου από 700 γραμμάρια έως 1,6 κιλά. Έχει σάρκα απαλή, χρώματος ανοιχτού ροζ και μαλακή υφή. Το «ώριμο» κουνέλι έχει βάρος περίπου 2 κιλά με ηλικία μεγαλύτερη των 8 μηνών. Η σάρκα του είναι σκληρή, σφικτή και σκούρου χρώματος

3.2 Παράγοντες αλλοίωσης του κρέατος

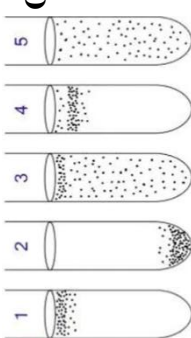
Το κρέας αποτελεί μια από τις πιο ευάλωτες κατηγορίες τροφίμων, διότι κατά την αποθήκευση, αναπτύσσονται διάφοροι μικροοργανισμοί και ενδογενή ένζυμα, τα οποία προκαλούν μεταβολές στη χημική σύσταση του τροφίμου. Υπάρχουν τέσσερις κύριοι μηχανισμοί αλλοίωσης του κρέατος, συμπεριλαμβανομένου της μικροβιολογικής αλλοίωσης λόγω μικροβιακής προσβολής του υποστρώματος, της ενζυμικής autolysis καθώς και της οξείδωσης των λιπαρών και των πρωτεϊνών.

3.2.1 Μικροβιολογική αλλοίωση

Γενικά, για να αναπτυχθεί κάθε είδους μικροοργανισμός χρειάζεται μια πηγή ενέργειας για τον σχηματισμό των πρωτεϊνών, των οργανιδίων και των μεμβρανών τους. Στις πηγές ενέργειας συμπεριλαμβάνονται η ηλιακή ενέργεια καθώς και διάφορες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Επιπλέον, ο άνθρακας, το άζωτο, το νερό και κάποια ιόντα είναι ουσίες απαραίτητες για τη διατροφή των βακτηρίων. Οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ως πηγή αζώτου ανόργανα αζωτούχα άλατα, ως πηγή άνθρακα το ατμοσφαιρικό CO₂, ενώ τα ετερότροφα βακτήρια καταβολίζουν οργανικές ενώσεις για να καλύψουν τις ανάγκες τους σε N και C. Πέρα από τις χημικές απαιτήσεις, υπάρχουν και κάποιοι φυσικοί παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως η θερμοκρασία, το pH, η ύπαρξη οξυγόνου στον περιβάλλοντα χώρο. Οι

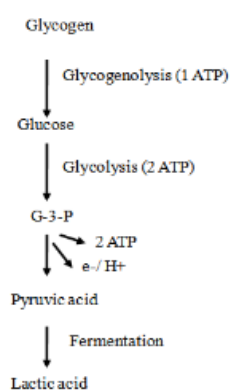
ονομασίες των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες φαίνονται στον Πίνακα 4. Η μικροβιολογική αλλοίωση του κρέατος εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα της γλυκόζης, του γαλακτικού οξέος, των αμινοξέων όπως και άλλων αζωτούχων ενώσεων. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν αυτές τις ενώσεις από το υπόστρωμα ως πηγή ενέργειας, για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Από τις παραπάνω ενώσεις, η γλυκόζη είναι αυτή που καταβολίζεται κατά την πρώτη φάση της μικροβιακής ανάπτυξης, υπό αερόβιες, είτε υπό αναερόβιες συνθήκες συντήρησης του τροφίμου. Μετά την εξάντληση των αποθεμάτων γλυκόζης, ως βασική πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται το γαλακτικό οξύ.

Πίνακας 4: Κατηγορίες μικροοργανισμών βάση των συνθηκών ανάπτυξής τους (Αγγελής, 2017).

Παράγοντας	Ονομασία μικροοργανισμών	Συνθήκες ανάπτυξης
Θερμοκρασία	Ψυχρόφιλοι	Αληθώς ψυχρόφιλοι $T < 15^{\circ}\text{C}$
		Ψυχότροφοι $20^{\circ}\text{C} < T < 30^{\circ}\text{C}$
	Μεσόφιλοι	$25^{\circ}\text{C} < T < 40^{\circ}\text{C}$
	Θερμόφιλοι	$T_{\text{βέλτιστη}} = 37^{\circ}\text{C}$ $50^{\circ}\text{C} < T < 60^{\circ}\text{C}$
	Εξαιρετικά θερμόφιλοι $T > 80^{\circ}\text{C}$	
pH	Οξεόφιλοι	$0,1 < \text{pH} < 5,4$
	Ουδετερόφιλοι	$5,4 < \text{pH} < 8,5$
	Αλκαλόφιλοι	$7 < \text{pH} < 12$
O₂ 	1. Υποχρεωτικά αερόβιοι	παρουσία O ₂
	2. Υποχρεωτικά αναερόβιοι	O ₂ < 0,05%
	3. Δυνητικά αναερόβιοι	Αναπτύσσονται είτε με παρουσία O ₂ είτε χωρίς
	4. Μικροαερόφιλοι	O ₂ < 21%
	5. Αεροανεκτικοί	Αναερόβιοι, οι οποίοι δεν επηρεάζονται από το O ₂

Το γαλακτικό οξύ παράγεται κατά τη ζύμωση/διάσπαση του γλυκογόνου μέσω αναερόβιας γλυκολυτικής οδού (Εικόνα 11), οπότε όταν τα αποθέματα γλυκογόνου στους μύες των ζώων εξαντλούνται, επηρεάζεται το pH και επέρχεται η μικροβιακή αλλοίωση του νωπού κρέατος.

Μελέτες έδειξαν ότι ο υποσιτισμός και το στρες πριν τη σφαγή ενός ζώου προκαλούν μείωση του γλυκογόνου άρα και η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι χαμηλότερη, με αποτέλεσμα το αρχικό pH του κρέατος να είναι υψηλό (pH 6,0-6,8) και να επέρχεται άμεση μικροβιακή ανάπτυξη. Ακόμη, το νωπό κρέας με υψηλό pH έχει σκούρο χρώμα, είναι σκληρό και ξηρό και γενικά χαρακτηρίζεται από ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Mutwakil, 2011; Ponnampalam et al., 2017).



Εικόνα 11: Παραγωγή γαλακτικού οξέος (Mutwakil, 2011).

Αν και το κοτόπουλο κατηγοριοποιείται στα πιο υγιεινά είδη κρέατος, συνδέεται με διάφορες τροφογενείς παθογένειες των βακτηρίων *Salmonella* και *Campylobacter*, που αν προσβάλουν τον άνθρωπο του προκαλούν συμπτώματα όπως πυρετό, ναυτία, έμετο και οξεία διάρροια/γαστρεντερίτιδα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι κυριότεροι μικροοργανισμοί αλλοίωσης στα πουλικά είναι ψευδομονάδες (*P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. psychrophile*), τα εντεροβακτήρια, ο *Brochothrix thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια κυρίως του γένους *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* και *Lactococcus* (Tsafrakidou et al., 2021). Οι ενώσεις που χρησιμοποιούν οι παραπάνω μικροοργανισμοί ως πηγή ενέργειας, καθώς και τα προϊόντα αλλοίωσής τους φαίνονται στον Πίνακα 5.

Αρκετοί μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένου των *Pseudomonas*, *Photobacterium*, και *Vibrionaceae*, παράγουν αμμωνία και μεθυλαμίνες (μεθυλαμίνη, διμεθυλαμίνη,

τριμεθυλαμίνη) με αποτέλεσμα να αυξάνουν τα επίπεδα των πτητικών ενώσεων αζώτου (TVB-N) και το pH του κρέατος, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην αλλοίωσή του (Lu et al., 2019).

Συνοψίζοντας, η έκταση της μικροβιακής ανάπτυξης στα τρόφιμα, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες συντήρησης (O₂, υγρασία, pH, θερμοκρασία), ενώ μεγάλη σημασία έχει και το είδος του κρέατος, διότι ανάλογα με τη σύστασή του μπορούν να αναπτυχθούν και διαφορετικοί μικροοργανισμοί.

Πίνακας 5: Προϊόντα των μικροοργανισμών αλλοίωσης στο κρέας (Bekhit et al., 2021).

Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα που καταβολίζεται από τα βακτήρια	Προϊόν αλλοίωσης
<i>Pseudomonas</i>	Γλυκόζη, αμινοξέα, 6-φωσφορική γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, γλυκονικό οξύ, κιτρικό οξύ	Κυστεΐνη, μεθειονίνη, μεθυλαμίνη, διμεθυλαμίνη, τρυμεθυλαμίνη, αιθυλ-εστέρες
<i>Enterobacteriaceae</i>	Λυσίνη, οξειδίο τριμεθυλαμίνης (trimethylamine oxide, TMAO)	HS, μεθυλσουλφίδιο, διμεθυλσουλφίδιο, υποξανθίνη, καδαβερίνη, πουτρεσκίνη, ισταμίνη, τριμεθυλαμίνη (TMA)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Γλυκόζη, αμινοξέα, ριβόζη, γλυκερόλη, αζωτούχες ενώσεις	3-μεθυλβουτανόλη, ακετοΐνη, οξικό οξύ, μεθυλ-σουλφίδια, εστέρες
<i>Lactobacillus</i>	Γλυκόζη	H ₂ O ₂
<i>Carnobacterium</i>	Ριβόζη, γλυκονικό οξύ, κιτρικό οξύ	Γαλακτικό οξύ, ακετοΐνη, 1-οκτεν-3-όλη, βουτανοϊκό οξύ
<i>Leuconostoc</i>	Γλυκόζη, αμινοξέα	Φορμικό οξύ, βουτυρικό οξύ, προπιονικό οξύ, γαλακτικό οξύ, H ₂ O ₂

3.2.2 Ενζυμική αλλοίωση

Αρκετά ενδογενή ένζυμα παραμένουν ενεργά μετά το θάνατο του ζώου και συμμετέχουν σε διάφορες βιοχημικές αλλαγές στους μύες πριν και μετά τη νεκρική ακαμψία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενδογενών ενζύμων είναι οι πρωτεάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ποιότητα του κρέατος κατά την αποθήκευση, οι καλπαΐνες (calpains) που συμβάλλουν στην τρυφερότητα αυτού και οι αμινοπεπτιδάσες στη γεύση του (Bhat et al., 2018).

Επιπλέον, έχει αναφερθεί σε έρευνες ότι η παραγωγή πτητικών ενώσεων αζώτου σε ψάρια σχετίζεται άμεσα με τις ενζυμικές δραστηριότητες και ειδικότερα με αυτές των πρωτεασών, εφόσον η δράση τους είναι να καταλύουν την πρωτεόλυση, δηλαδή να διασπούν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών προς παραγωγή μικρότερων πολυπεπτιδίων ή και αμινοξέων. Υποστηρίζεται ακόμη, ότι η φυσική αλλοίωση που επέρχεται στους μύες του κρέατος ορισμένο χρόνο μετά τη σφαγή, διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν ενώσεις θείου, αμμωνία, καθώς και πτητικές ή μη βάσεις (TVB-N). Αναφορικά με το κόκκινο και το λευκό κρέας, δεν έχουν διεξαχθεί επαρκείς παρόμοιες μελέτες επίδρασης των ενδογενών ενζύμων στην αλλοίωση του, οπότε δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις που να συνδέουν τα παραπάνω, μιας και τα θαλασσινά με τα υπόλοιπα είδη κρέατος εμφανίζουν αρκετές δομικές και βιοχημικές διαφοροποιήσεις (Bekhit et al., 2021).

3.2.3 Οξείδωση λιπιδίων

Ως οξείδωση λιπιδίων χαρακτηρίζεται η αντίδραση ακόρεστων λιπαρών οξέων (Unsaturated Fatty Acids, UFA) με μοριακό οξυγόνο, που έχει ως αποτέλεσμα την τάγγιση ή την αλλοίωση των λιπαρών. Υπάρχουν τρεις κύριοι μηχανισμοί οξείδωσης, συμπεριλαμβανομένου της αυτοοξείδωσης, της φωτοοξείδωσης και της ενζυμικής υδρόλυσης. Τα ένζυμα που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην οξείδωση των λιπιδίων είναι η λιπάση, η λιποξυγενάση και η κυκλοξυγενάση. Τα ένζυμα αυτά εκκρίνονται από βακτήρια και ενδέχεται να εμπλέκονται στην οξείδωση του κρέατος κατά την αποθήκευση (Bekhit et al., 2021). Παρόλα αυτά, στα προϊόντα κρέατος η οξείδωση των λιπιδίων επέρχεται κυρίως μέσω μη-ενζυμικών οδών, ενώ σύμφωνα με μελέτες η λιποξυγενάση είναι αυτή που συμβάλλει σε μικρότερο βαθμό στην οξείδωση (Papuc et al., 2017).

3.2.4 Οξείδωση πρωτεϊνών

Η οξείδωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες αντιδρούν με οξειδωτικά μόρια (όπως δραστικές οξειδωτικές ρίζες, ROS) και υφίστανται διάφορες χημικές και δομικές αλλαγές. Η οξείδωση ξεκινά όταν ένα δραστικό οξειδωτικό μόριο (υπεροξειδικές ROO· ή υδροξυλικές OH· ρίζες) προσλαμβάνει ένα άτομο υδρογόνου από την

πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος στην πρωτεΐνη, δημιουργώντας μια πρωτεϊνική ρίζα με ένα αδρανές άτομο άνθρακα. Αυτή η πρωτεϊνική ρίζα μπορεί να αντιδράσει με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, σχηματίζοντας μία υπεροξειδική ρίζα. Με τον ίδιο τρόπο μπορούν να παραχθούν και άλλες δραστικές ρίζες, μεταβάλλοντας τη δομή της αρχικής πρωτεΐνης. Στις δομικές αλλαγές περιλαμβάνεται α) ο σχηματισμός καρβονυλικών ομάδων, όπου κάποια αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, προλίνη) οξειδώνονται προς καρβονυλικά κατάλοιπα, β) οι διασταυρούμενες συνδέσεις, που μπορεί να δημιουργηθούν μεταξύ των πρωτεϊνών κατά την οξείδωσή τους, τροποποιώντας την τριτοταγή δομή και τη λειτουργικότητά της, και γ) η απώλεια ομάδων θειόλης σε αμινοξέα όπως η κυστεΐνη, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση της πρωτεΐνης (Lund et al., 2011).

Όσο αφορά το κρέας, η οξείδωση των πρωτεϊνών προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη θρεπτική του αξία (π.χ. μειωμένη πέψη πρωτεϊνών, απώλεια αμινοξέων) καθώς και στις λειτουργικές (ικανότητα δέσμευσης νερού, διαλυτότητα, αδρανοποίηση ενζύμων κ.α.) και οργανοληπτικές (χρώμα, υφή, γεύση/οσμή) του ιδιότητες. Κατά την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από μικροβιακές και ενδογενείς πρωτεάσες, σε ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία καταβολίζονται από τους παραχθέντες αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, παράγονται πτητικές ενώσεις που σχετίζονται άμεσα με την απώλεια φρεσκάδας του προϊόντος (Πίνακας 6).

Όποιος και αν είναι ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να λάβει χώρα η πρωτεϊνική οξείδωση, είτε στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων είτε στο «κέντρο» του πρωτεϊνικού πλέγματος, το σημαντικό είναι η επίδραση στην ανθρώπινη υγεία λόγω κατανάλωσης προϊόντων που έχουν υποστεί τέτοιου είδους οξείδωση.

ο Αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία:

Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να μειώσει την πεπτικότητά τους και να οδηγήσει σε απώλεια αμινοξέων, επηρεάζοντας την ποιότητα της διατροφής. Ορισμένα αδιάλυτα πρωτεϊνικά υπολείμματα μπορεί να καταλήξουν στο έντερο, όπου υφίστανται ζύμωση από την εντερική μικροχλωρίδα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει προβλήματα υγείας λόγω της αδυναμίας του πεπτικού συστήματος να σπάσει τις συγκεντρωμένες πρωτεΐνες/αμινοξέα και λόγω του σχηματισμού υδρο-υπεροξειδίων πρωτεϊνών. Αυτά τα υπολείμματα μπορούν να συμβάλουν σε φλεγμονές και προβλήματα στην εντερική

μικροχλωρίδα, αυξάνοντας τον κίνδυνο για διαταραχές όπως αυτές του ευερέθιστου εντέρου, της ελκώδους κολίτιδας και του καρκίνου του παχέος εντέρου (Bekhit et al., 2021; Rowland, 2000).

Πίνακας 6: Μεταβολικά προϊόντα αποικοδόμησης αμινοξέων (Paczkowski & Schütz, 2011).

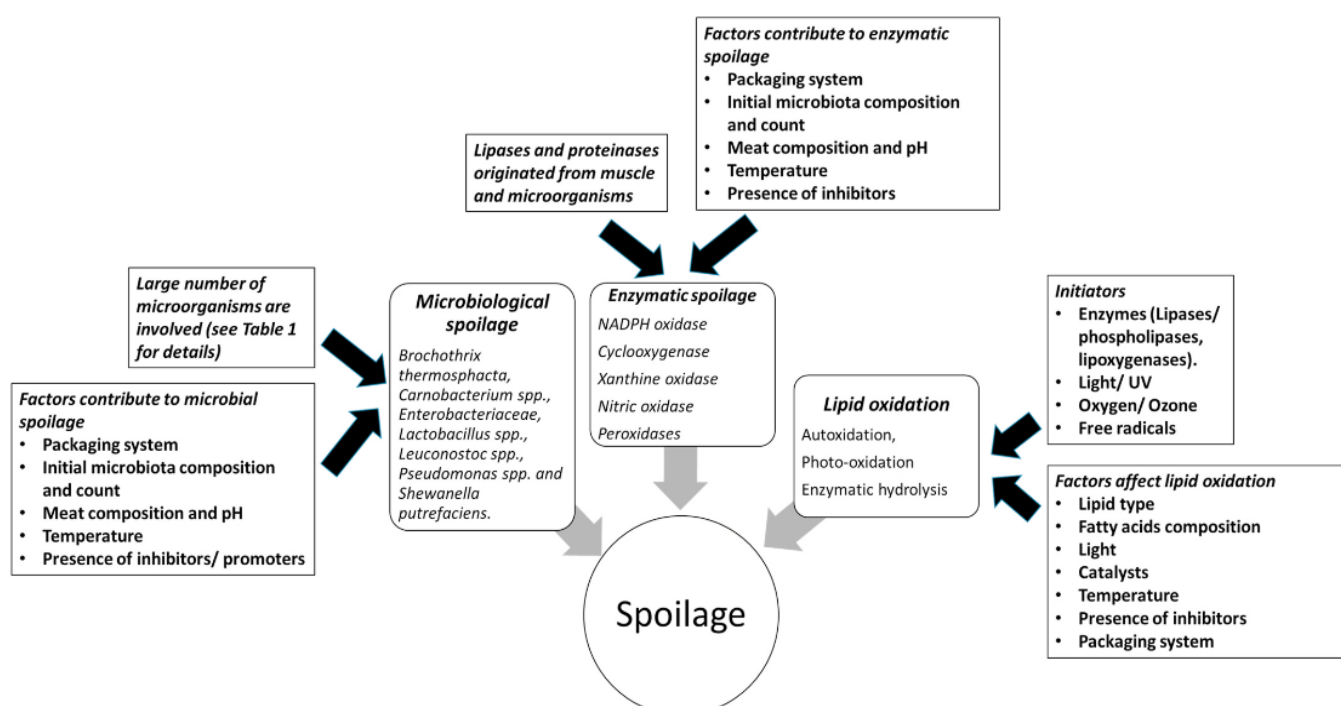
Αμινοξύ	Μεταβολικά προϊόντα
Λευκίνη (Leu)	1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-βουτανάλη, 3-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ
Ισολευκίνη (Ile)	1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, 1-πεντανόλη
Θρεονίνη (Thr)	1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, 1-πεντανόλη
Αργινίνη (Arg)	Πουτρεσκίνη
Λυσίνη (Lys)	Καδαβερίνη
Τυροσίνη (Tyr)	4-μεθυλ-φαινόλη
Φαινυλαλανίνη (Phe)	2-φαινυλ-αιθανόλη, φαινυλ-ακεταλδεΐδη, φαινυλ-οξικό οξύ, φαινυλ-προπιονικό οξύ, βενζαλδεΐδη, 2-υδροξυβενζαλδεΐδη, βενζονιτρίλιο, οξικός βενζυλεστέρας κ.α.
Τρυπτοφάνη (Trp)	Ινδόλη, ινδοϋλο-οξικό οξύ, ινδοϋλο-προπανοϊκό οξύ
Κυστεΐνη (Cys)	Θείο, υδρόθειο, διμέθυλο σουλφίδιο, διμέθυλο δισουλφίδιο, διμέθυλο τρισουλφίδιο, διμέθυλο τετρασουλφίδιο
Μεθειονίνη (Met)	Μεθανοθειόλη, διμέθυλο σουλφίδιο, διμέθυλο δισουλφίδιο, διμέθυλο τρισουλφίδιο

ο Θετικές επιπτώσεις στην υγεία:

Σύμφωνα με κάποιες έρευνες, οι μεταβολικές διεργασίες που συμβαίνουν κατά τη ζύμωση των αδιάλυτων πρωτεϊνών στο έντερο, μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή λιπαρών οξέων με μικρή ανθρακική αλυσίδα (Short-Chain Fatty Acids, SCFA), που έχουν νευροδιαβιβαστική δράση μεταξύ εντέρου και εγκεφάλου, ενισχύοντας την καλή ψυχική υγεία και λειτουργία του εγκεφάλου. Ακόμη έχει παρατηρηθεί παραγωγή λιπαρών οξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα (ισοβουτυρικό, ισοβαλερικό, 2-μεθυλβουτυρικό οξύ), τα οποία θεωρούνται ωφέλιμα για την υγεία, καθώς φαίνεται να συμβάλουν στην εντερική υγεία και να δρουν έναντι διαφόρων φλεγμονών. Τέλος, τα

μικρά πεπτίδια που παράγονται κατά την πρωτεϊνική διάσπαση εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και μπορούν να εξουδετερώσουν πιθανές ελεύθερες ρίζες (Bekhit et al., 2021).

Συμπερασματικά, παρά τις θετικές επιπτώσεις που έχουν αναφερθεί, η οξείδωση των πρωτεϊνών του κρέατος προκαλεί αλλοίωση αυτού και είναι θεμιτή η κατανάλωσή του πριν επέλθει η συγκεκριμένη διαδικασία.



Εικόνα 12: Παράγοντες αλλοίωσης του κρέατος (Bekhit et al., 2021).

3.3 Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N) στο κρέας

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 1.5.2 το σύνολο των πρωτοταγών, δευτεροταγών, τριτοταγών αμινών καθώς και διαφόρων τοξικών ενώσεων αζώτου, χαρακτηρίζεται ως ολικό πτητικό άζωτο (Total Volatile Basic Nitrogen, TVB-N). Οι ενώσεις αυτές παράγονται είτε μέσω αμίνωσης / τρανσαμίνωσης αλδεϋδών και κετονών, είτε μέσω αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων. Πρόκειται για ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, υψηλής πτητικότητας, συμπεριλαμβανομένου της αμμωνίας (NH_3), της διμεθυλαμίνης (DMA), της τριμεθυλαμίνης (TMA) καθώς και διαφόρων βιογενών αμινών.

Αναφορικά με τις βιογενείς αμίνες, υπάρχουν ως φυσικά συστατικά ζωικών και φυτικών πρώτων υλών σε χαμηλές συγκεντρώσεις που είναι μη επιβλαβείς για τον άνθρωπο και την υγεία του. Η αύξηση της συγκέντρωσής τους στα τρόφιμα οφείλεται στη δραστηριότητα των ενδογενών ενζύμων ή στη μικροβιακή αποκαρβοξυλίωση ελεύθερων αμινοξέων κατά την ελεγχόμενη ή αυθόρμητη ζύμωση, επεξεργασία, αποθήκευση και διανομή των τροφίμων. Αν η συγκέντρωσή τους στο σώμα υπερβεί κάποια ανώτατα όρια, μπορούν να εμφανιστούν συμπτώματα όπως δυνατός πονοκέφαλος, υπέρταση, κοιλιακό άλγος, ταχυκαρδία, αλλεργιογόνες αντιδράσεις κ.α. Πρόκειται για αλειφατικές (μεθυλαμίνη, αιθυλαμίνη, σπερμιδίνη, σπερμίνη, καδαβερίνη, αγματίνη, πουτρεσκίνη), αρωματικές (β-φαινυλαιθυλαμίνη, τυραμίνη) ή ετεροκυκλικές (ισταμίνη, τρυптаμίνη) ενώσεις. Οι αλειφατικές αμίνες είναι συστατικά των ζώντων κυττάρων και συμμετέχουν σε αρκετές φυσικές και βιοχημικές διαδικασίες. Προέρχονται είτε από ενδογενή βιοσύνθεση από μικροοργανισμούς του εντέρου, είτε εισέρχονται στο σώμα μέσω της τροφής. Οι αρωματικές αμίνες ανήκουν στην τάξη των νευροδιαβιβαστών, γνωστών ως κατεχολαμίνες, που αποτελούνται από το χαρακτηριστικό κατεχολικό δακτύλιο και την πλευρική αλυσίδα αμίνης. Τέλος, οι ετεροκυκλικές αμίνες υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στον γαστρεντερικό βλεννογόνο, στους μύες, στο δέρμα, στο ήπαρ, στους πνεύμονες και στα λευκοκύτταρα (Durak-Dados et al., 2020). Ακόμη, διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς βιογενείς αμίνες. Στις ενδογενείς περιλαμβάνονται νευροδιαβιβαστές που παράγονται από ιστούς όπως οι κατεχολαμίνες (ντοπαμίνη, επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη), οι ινδολαμίνες (σεροτονίνη, μελατονίνη, 5-υδροξυτρυптаμίνη) και οι ισταμίνες. Ανιχνεύονται στο κρέας, στα ψάρια και στα φρούτα ενώ ο βασικός τους ρόλος στο σώμα είναι να δρουν ως νευροδιαβιβαστές. Οι εξωγενείς αμίνες παράγονται από αποκαρβοξυλίωση των αντίστοιχων αμινοξέων (Wójcik et al., 2021) και συνήθως το όνομά τους προέρχεται από τα εκάστοτε ελεύθερα αμινοξέα, εκτός από τις περιπτώσεις που πραγματοποιούνται περισσότερες αντιδράσεις για το σχηματισμό τους (π.χ. παραγωγή πουτρεσκίνης από αργινίνη – μηχανισμός 2 σταδίων) (Ladero et al., 2016).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε φρέσκο χοιρινό και μοσχάρι κρέας, υπάρχουν φυσικά παρούσες πολυαμίνες όπως η σπερμίνη και η σπερμιδίνη, ενώ κατά την αποθήκευση ή την επεξεργασία, παράγεται ισταμίνη, πουτρεσκίνη, τυραμίνη, τρυптаμίνη, β-φαινυλαιθυλαμίνη και καδαβερίνη. Στα πουλερικά ανιχνεύτηκαν οι ίδιες

βιογενείς αμίνες εκτός της τρυπταμίνης και της β-φαινυλαιθυλαμίνης (Balamatsia et al., 2007; Patsias et al., 2006).

Μετά τη σφαγή ενός ζώου και την αποθήκευση αυτού, ορισμένοι από τους μεταβολίτες, όπως η TMA, το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) και άλλες ενώσεις των μυών (χολίνη, βεταΐνη, καρνιτίνη) συμβάλλουν στη δημιουργία και την ανάπτυξη TVB-N. Τα μεταθανάτια επίπεδα TVB-N εξαρτώνται από τη συχνότητα μικροβιακών και ενζυμικών δραστηριοτήτων, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε αλλοίωση του προϊόντος. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση των TVB-N χρησιμοποιείται ως δείκτης φρεσκάδας του κρέατος.

3.3.1 Βιοσύνθεση των TVB-N στο κρέας

Οι TVB-N αρχίζουν να σχηματίζονται ακόμη και πριν τη σφαγή των ζώων, όπου μεταβολίτες που περιέχουν άζωτο, βιοσυντίθενται στο έντερο ή άλλους ιστούς και μεταφέρονται στους μύες, όπου και συσσωρεύονται μετά το θάνατο του ζώου, αυξάνοντας σταδιακά τη συγκέντρωση των TVB-N κατά την αποθήκευση. Έρευνες έχουν δείξει πως οι κύριες πηγές δημιουργίας TVB-N είναι η αποικοδόμηση του TMAO σε TMA, DMA, φορμαλδεΰδη και η απαμίνωση των νουκλεοτιδίων αδενίνης. Η TMA και το TMAO συντίθεται συνήθως ενδογενώς ή λαμβάνονται μέσω της τροφής. Οι βιοχημικές πορείες που εμπλέκονται στο σχηματισμό των παραπάνω ενώσεων είναι ο μεταβολισμός της χολίνης, της L-καρνιτίνης και της βεταΐνης (Bekhit et al., 2021; Hopkins et al., 2020).

➤ Σχηματισμός TMA/TMAO μέσω της L-καρνιτίνης

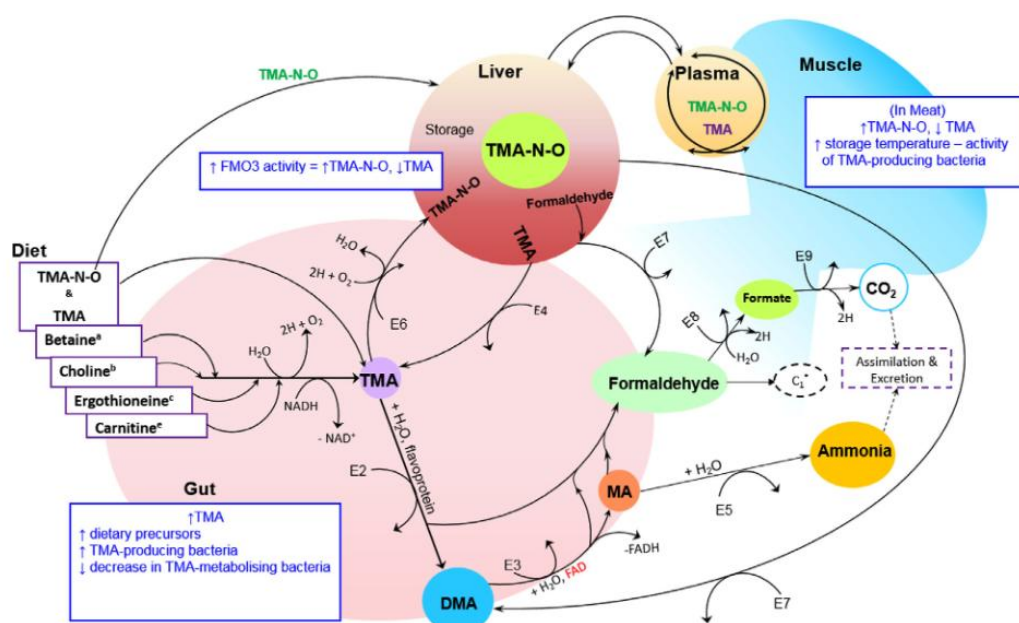
Η καρνιτίνη αποτελεί συστατικό του πλάσματος των θηλαστικών, παράγεται στο ήπαρ και βρίσκεται στους καρδιακούς και σκελετικούς μύες. Η σύνθεση της L-καρνιτίνης στα ζώα ξεκινά από την N-τριμεθυλλυσίνη (που προέρχεται από την υδρόλυση πρωτεϊνών όπως η μυοσίνη, οι ιστόνες, το κυτόχρωμα c κ.α.), ενώ δρα ως συμπαράγοντας της τρανσφεράσης ακέτυλο-CoA καρνιτίνης, που παίρνει μέρος στη β-οξείδωση, μεταφέροντας τα ενεργοποιημένα λιπαρά οξέα μέσω των μιτοχονδριακών μεμβρανών στις θέσεις οξειδωτικής αποικοδόμησης. Η μικροχλωρίδα του εντέρου των ζώων μετατρέπει την L-καρνιτίνη σε TMA με τη βοήθεια του ενζύμου μονοξυγενάση

της καρνιτίνης (CntA), η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται σε TMAO μέσω των φλαβινικών μονοοξυγενασών (ηπατικά ένζυμα FMO1, FMO3). Τα επίπεδα καρνιτίνης εξαρτώνται από το είδος και τα μέρη του σφάγιου. Υψηλότερες συγκεντρώσεις L-καρνιτίνης σχετίζονται με υψηλότερη περιεκτικότητα σε μυοσφαιρίνη, γι' αυτό και το ποσοστό παραπάνω της ένωσης είναι μεγαλύτερο στο κόκκινο κρέας συγκριτικά με το λευκό (Bekhit et al., 2021; Hopkins et al., 2020).

➤ Σχηματισμός TMA/TMAO μέσω μεταβολισμού της χολίνης

Η χολίνη υπάρχει σε όλα τα φυτά, οπότε μέσω της τροφής μεταφέρεται στα ζώα. Είναι απαραίτητο στοιχείο για τα ζώα, διότι δρα ως πηγή άμινο-τμημάτων, που είναι πρόδρομα συστατικά των φωσφολιπιδίων, της σφιγγομυελίνης κ.α., απαραίτητα για τη σύνθεση των δομικών μεμβρανών. Χολίνη μπορεί να απελευθερωθεί και από φωσφολιπίδια μέσω ενζυμικής υδρόλυσης.

Η TMA σχηματίζεται από τη χολίνη μέσω μιας μικροβιακής μεταβολικής διεργασίας που λαμβάνει χώρα στο έντερο, κυρίως υπό αναερόβιες συνθήκες. Ουσιαστικά, η χολίνη μετατρέπεται σε TMA και ακεταλδεΐδη με τη βοήθεια του ενζύμου λύασης της χολίνης (CutC). Η παραγόμενη TMA απορροφάται και μεταφέρεται στο ήπαρ, όπου οξειδώνεται από το ένζυμο TMAOse (μονοοξυγενάση της TMA) σε TMAO. Επομένως βασικό ρόλο για το σχηματισμό TMA μέσω της χολίνης, διαδραματίζει η εντερική μικροχλωρίδα των ζώων (Bekhit et al., 2021; Hopkins et al., 2020).



Εικόνα 13: Βιοσύνθεση και μεταβολισμός TMA (Bekhit et al., 2021).

➤ Σχηματισμός TMA/TMAO μέσω μεταβολισμού της δ-βαλεροβεταΐνης

Η δ-βαλεροβεταΐνη είναι ένα παράγωγο της γλυκίνης και πρόδρομη ένωση σχηματισμού TMAO. Δρα ως ωσμορυθμιστής στα ζώα, προστατεύοντας τα κύτταρα από το ωσμωτικό στρες. Παράγεται από τη μικροβιακή χλωρίδα του κοιλιακού συστήματος, μέσω αποικοδόμησης της N-τριμεθυλ-λυσίνης ή/και της γλυκίνης. Ο σχηματισμός TMA με πρόδρομη ένωση τη βεταΐνη γίνεται μέσω ενζυμικών αντιδράσεων. Συγκεκριμένα η βεταϊνική αλδεϋδη (ενδιάμεσο προϊόν) μετατρέπεται σε TMA μέσω ενζύμων του εντέρου (π.χ. αλδεϋδική αφυδρογονάση). Η TMA στη συνέχεια μπορεί να οξειδωθεί και να παραχθεί TMAO (Bekhit et al., 2021; Hopkins et al., 2020).

3.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό TVB-N στο κρέας

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό των TVB-N στα κρέατα είναι πολυάριθμοι και εξαρτώνται από το είδος του ζώου, τη σύνθεση των μυών, το pH του κρέατος καθώς και η μικροβιακή δραστηριότητα κατά την αποθήκευση. Παρακάτω αναφέρεται αναλυτικά η επίδραση του καθενός εκ των παραγόντων (Bekhit et al., 2021):

i. Διατροφή των ζώων

Η διατροφή των ζώων έχει σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των TVB-N στα κρέατα. Η πρόσληψη ενώσεων όπως η L-καρνιτίνη, η χολίνη και η βεταΐνη (που είναι πρόδρομες ενώσεις των μεθυλιωμένων αμινών, όπως η DMA, TMA, TMAO) επηρεάζει τα επίπεδα των TVB-N στους ιστούς των ζώων. Διαφορετικά είδη ζώων (βοδινό, χοιρινό, αρνί, κοτόπουλο κ.α.) παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στην ποσότητα των πρόδρομων αυτών ενώσεων λόγω της διαφορετικής σύνθεσης της μικροβιακής μικροχλωρίδας τους. Επιπλέον, η σύνθεση του μυϊκού ιστού του ζώου επηρεάζει την τελική ποιότητα του κρέατος. Έρευνες έχουν δείξει ότι η φυσιολογική δραστηριότητα του μυϊκού ιστού επηρεάζει το τελικό pH του κρέατος και την ποσότητα των προαναφερθέντων πρόδρομων ενώσεων των TVB-N.

ii. Προετοιμασία του ζώου πριν τη σφαγή

Ανάλογα με το στρες και τις συνθήκες στις οποίες υπόκεινται το ζώο πριν τη σφαγή του, μπορεί να επηρεαστεί άμεσα το pH του νωπού προϊόντος, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει τη μικροβιακή και ενζυμική δραστηριότητα στο κρέας. Ταχεία αύξηση των TVB-N μπορεί να συμβεί λόγω των αρχικών χαμηλών συγκεντρώσεων του κρέατος σε γλυκογόνο οπότε και σε γλυκόζη και γαλακτικό οξύ, συνεπώς οι μικροοργανισμοί αρχίζουν να καταβολίζουν πρωτεΐνες για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Με αυτό τον τρόπο αποικοδομούνται οι πρωτεΐνες σε πολυπεπίδια ή αμινοξέα, τα οποία επιδέχονται επιπλέον διάσπαση κατά την αποθήκευση παράγοντας βιογενείς αμίνες και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις.

iii. Επίδραση του pH

Το κανονικό pH του κρέατος που δεν έχει υποστεί στρες κατά τη σφαγή κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 5,5 – 5,7. Οι διεργασίες αποικοδόμησης κατά την αποθήκευση, έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενώσεων αζώτου ή θείου, οπότε αυξάνεται και το pH. Η μεταβολή αυτή επιταχύνει το ρυθμό των βιοχημικών διαδικασιών και παρέχει καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών στο κρέας. Σε διάφορες μελέτες, έχει προταθεί μεταξύ άλλων η προσθήκη εκχυλισμάτων με αντιμικροβιακές ιδιότητες (όπως εκχύλισμα γλιστρίδας), με σκοπό τη διατήρηση χαμηλών τιμών pH και την καθυστέρηση ανάπτυξης μικροοργανισμών αλλοίωσης καθώς και TVB-N.

iv. Μικροβιακή δραστηριότητα

Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί είναι αυτοί που παίζουν τον καθοριστικό ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος. Όμως κατά την παρατεταμένη αποθήκευση, τα αναερόβια μικρόβια αρχίζουν να αποικοδομούν τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα παράγοντας διάφορες αμίνες και άλλες πτητικές ενώσεις. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζεται άμεσα από το pH του κρέατος, καθώς όσο υψηλότερη είναι η τιμή του δημιουργούνται ευνοϊκότερες συνθήκες μικροβιακής ανάπτυξης. Συνεπώς, οι ενδογενείς και μικροβιακοί ενζυμικοί μηχανισμοί μπορούν να δράσουν σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους όπως τα αμινοξέα, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο αύξηση της αποδόμησης αζωτούχων ενώσεων και της συγκέντρωσης των TVB-N.

Πέρα από τα παραπάνω, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη TVB-N διαδραματίζουν και οι συνθήκες αποθήκευσης των προϊόντων κρέατος. Απαιτείται σωστή θερμοκρασία καθώς και % ποσοστό υγρασίας στους θαλάμους συντήρησης, ανάλογα με το είδος κρέατος. Τα επιτρεπτά όρια TVB-N έχουν καθιερωθεί μόνο για τα ψάρια από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ για τα υπόλοιπα είδη κρέατος αυτές οι ποσότητες υπολογίστηκαν πειραματικά, λαμβάνοντας υπόψιν και τους υπόλοιπους βασικούς δείκτες αλλοίωσης, όπως το pH και τη μικροβιολογική ανάλυση. Στον Πίνακα 7 φαίνονται τα επιτρεπτά όρια TVB-N σε νωπά προϊόντα κρέατος.

Πίνακας 7: Επιτρεπτά όρια TVB-N σε νωπά προϊόντα κρέατος (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2074/2005; Balamatsia et al., 2006; Bekhit et al., 2021; Hopkins et al., 2020).

Είδος κρέατος	TVB-N (mg/100g)
Βόειο	15 - 15
Χοιρινό	20 – 25
Κοτόπουλο	28 – 30
Ψάρι	25 – 35

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η παραγωγή μια έξυπνης συσκευασίας με τεχνολογία δεικτών φρεσκάδας για άμεση παρακολούθηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών προϊόντων κρέατος, η οποία θα έχει ως βάση φυσικά προϊόντα. Ουσιαστικά, η σύνθεση εδωδιμων μεμβρανών που να δρουν και σαν δείκτες, ώστε να πληροφορείται ο καταναλωτής εάν το τρόφιμο που πρόκειται να εφοδιαστεί είναι ή όχι κατάλληλο για κατανάλωση.

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν τις πιο κοινές φυσικές χρωστικές, είναι ευρέως διαθέσιμες, μη τοξικές και δρουν ως αντιοξειδωτικά. Όμως αποικοδομούνται εύκολα υπό την επίδραση του φωτός, των ενζύμων, του οξυγόνου, του pH, της θερμοκρασίας κ.α. Μελέτες έχουν δείξει πως οι ανθοκυανίνες που λαμβάνονται από εκχύλιση κόκκινου λάχανου σε όξινο περιβάλλον είναι πιο ανθεκτικές και δεν αποσυντίθενται τόσο εύκολα όσο αυτές άλλων εκχυλισμάτων, καθώς και ότι η σταθερότητα των ανθοκυανινών αυξάνεται κατά την αλληλεπίδρασή τους με πολυσακχαρίτες. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το κόκκινο λάχανο ως πηγή λήψης των ανθοκυανινών και το άμυλο καλαμποκιού, ως βασικό υπόστρωμα για την παρασκευή εδωδιμων μεμβρανών.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στα Εργαστήρια Χημείας Τροφίμων και Μικροβιολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στο πρώτο μέρος έλαβε χώρα η εκχύλιση των ανθοκυανινών, ενώ στη συνέχεια (δεύτερο μέρος) παρασκευάστηκαν τόσο μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού όσο και εμπλουτισμένες με εκχύλισμα κόκκινου λάχανου. Ακολούθησε η μέτρηση του πάχους τους, η μελέτη των μηχανικών τους ιδιοτήτων, ο προσδιορισμός υγρασίας και διαλυτότητας των μεμβρανών όπως και η αντιοξειδωτική τους δράση. Στο τρίτο μέρος, αυτές οι μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες σε συσκευασίες με δείγματα κιμά κοτόπουλου, τα οποία μελετήθηκαν φυσικοχημικά και μικροβιολογικά ώστε να εξακριβωθεί εάν η χρωματική μεταβολή των μεμβρανών αντιπροσωπεύει την πραγματική αλλοίωση του τροφίμου και αν εν τέλει μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια έξυπνη συσκευασία.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΑΠΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΛΑΧΑΝΟ, ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

1.1 Εκχύλιση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών έγινε σύμφωνα με τις μεθόδους των Demirdöven et al. (2015) και Prietto et al. (2017) με μικρές παραλλαγές. Συγκεκριμένα σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 10 g αλεσμένου σε μπλέντερ κόκκινου λαχάνου (από τοπικό μανάβικο), μαζί με 30 mL οξινισμένης αιθανόλης [85 mL καθαρής αιθανόλης (Ethanol 99%, Fisher Chemical, Loughborough, UK) και 15 mL HCl 1,5 N (Hydrochloric Acid 37%, Sigma-Aldrich, Austria)] και αυτό τοποθετήθηκε στους υπέρηχους, στο σκοτάδι για 1 h στους 30 °C. Μετά το πέρας των 60 min ακολούθησε διήθηση με πτυχωτό ηθμό και το υπερκείμενο διάλυμα αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο. Πραγματοποιήθηκε και δεύτερη εκχύλιση του στερεού υπολείμματος με 20 mL οξινισμένης αιθανόλης υπό τις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω και λήφθηκε ξανά το υπερκείμενο διάλυμα στο ίδιο φιαλίδιο. Τα ενωμένα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη, στους - 20 °C έως να χρησιμοποιηθούν.

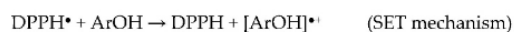
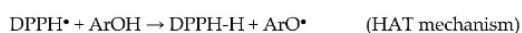
1.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας και φαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου

1. Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH, η οποία βασίζεται στην αναστολή της δράσης της ελεύθερης ρίζας DPPH· (μωβ χρώμα) με προσθήκης σε αυτήν ενός ηλεκτρονίου (ή μιας ρίζας H·) από κάποιο αντιοξειδωτικό. Έτσι, σχηματίζεται το ηλεκτρονιακά ουδέτερο μόριο DPPH (κίτρινο χρώμα). Το DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-διφαινυλο-1-

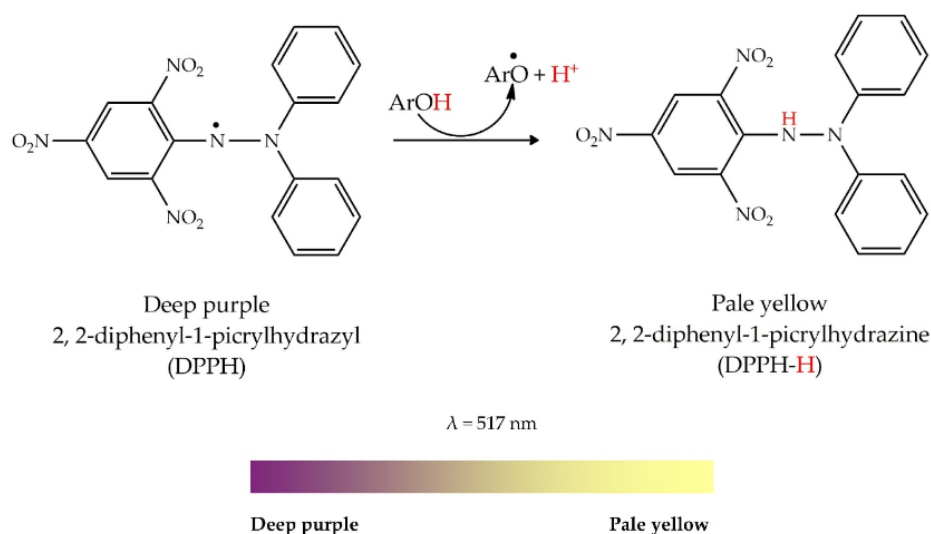
πικρυλυδραζίδιο) είναι μία σταθερή ρίζα, λόγω του απεντοπισμού του μονήρους ηλεκτρονίου σε ολόκληρο το μόριο, που χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την αποτίμηση δέσμευσης ελευθέρων ριζών ή αλλιώς για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας. Το DPPH ανάγεται προς υδραζίνη όταν αντιδρά με δότες υδρογόνου, όπως αντιοξειδωτικά, και αποχρωματίζεται (από πορφυρό χρώμα σε υποκίτρινο). Μετράται η μείωση του χρώματος με μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm, η οποία εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Όσο μικρότερη η απορρόφηση, δηλαδή όσο περισσότερο εξασθενεί το πορφυρό χρώμα και επικρατεί το κίτρινο, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του αντιοξειδωτικού.

Chemical reactions:



where ArOH: phenolic AO

Mechanism of reaction: HAT



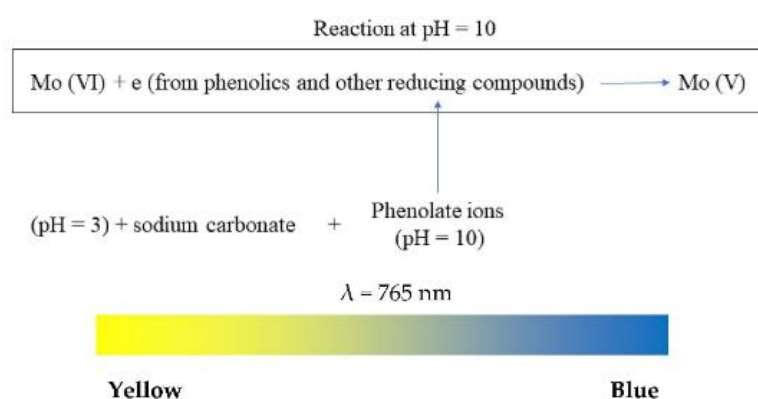
Εικόνα 14: Μηχανισμός αντίδρασης της ρίζας DPPH με κάποιο αντιοξειδωτικό (Sadeer et al., 2020).

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της % αναστολής της ρίζας DPPH. Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH 0,1 mM (TCI Europe N.V, Zwijndrecht, Belgium) σε μεθανόλη (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) και μετρήθηκε η απορρόφηση αυτού στα 517 nm με τη χρήση του UV-Vis φασματοφωτόμετρου (Infinite M Nano, Tecan, Switzerland). Σε πλαστική κυψελίδα των 3,5 mL προστέθηκαν 0,1 mL εκχυλίσματος και 2,9 mL διαλύματος

DPPH 0,1 mM και αφέθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm έναντι τυφλού μεθανόλης. Η % αναστολή της ρίζας DPPH προέκυψε από τη σχέση $\% \text{RSA} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$ όπου A_0 : απορρόφηση καθαρού DPPH και A_s : η απορρόφηση του δείγματος μετά από 30 min αναμονής στο σκοτάδι (Ademoyegun et al., 2013). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

2. Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου

Η μέθοδος προσδιορισμού του φαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον από το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu που είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφοβολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα του εκχυλίσματος οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μίγμα κυανών οξειδίων του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}) και του βολφραμίου (W_8O_{23}). Η ένταση του κυανού χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), το οποίο υποβοηθά την οξειδοαναγωγική αντίδραση.



Εικόνα 15: Μηχανισμός αντίδρασης των φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Sadeer et al., 2020).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών στα δείγματα γίνεται με χάραξη και χρήση της πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Η μέθοδος Folin - Ciocalteu είναι μία απλή, ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος προσδιορισμού ολικών

φαινολικών συστατικών. Το μειονέκτημά της, όμως, έγκειται στο γεγονός ότι δεν προσδιορίζει μόνο τα φαινολικά συστατικά αλλά και τις πρωτεΐνες, που περιέχουν στο μόριό τους φαινολική υδροξυλομάδα. Επίσης, τα σάκχαρα, τα νουκλεϊκά οξέα, οι αρωματικές αμίνες, αλλά και ενώσεις όπως η βενζαλδεϋδη, το αμινοβενζοϊκό οξύ και η γλυκίνη αντιδρούν με το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu.

➤ Για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς ακολουθήθηκε η εξής πειραματική πορεία:

Αρχικά παρασκευάστηκε ένα stock διάλυμα γαλλικού οξέος (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) 1000 ppm, με διάλυση κατάλληλης μάζας γαλλικού οξέος σε διάλυμα μεθανόλης/νερού (60/40). Έπειτα σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL προστέθηκαν 0,2 mL γαλλικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων κάθε φορά (20, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 ppm που παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις από το αρχικό stock διάλυμα γαλλικού οξέος 1000 ppm), 2,4 mL απιονισμένου H₂O, 0,2 mL αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) και αφέθηκε σε σκοτεινό μέρος για 5 min. Ακολούθως προστέθηκαν 0,4 mL Na₂CO₃ 20% (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) και συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο H₂O. Τα διαλύματα αφέθηκαν στο σκοτάδι για 2 ώρες και μετρήθηκε η απορρόφηση αυτών στα 765 nm έναντι τυφλού διαλύματος με τη χρήση του UV-Vis φασματοφωτόμετρου (Infinite M Nano, Tecan, Switzerland). Το τυφλό παρασκευάστηκε σύμφωνα με την πορεία που προαναφέρθηκε όμως αντί για διάλυμα γαλλικού οξέος προστέθηκε αντίστοιχος όγκος απιονισμένου H₂O (do Nascimento Alves et al., 2021; Oviasogie et al., 2009).

Για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων ακολουθήθηκε η παραπάνω πειραματική πορεία, όμως αντί για γαλλικό οξύ προστέθηκαν 0,2 mL αραιωμένου κατά 4 φορές εκχυλίσματος με διαλύτη H₂O. Η αραιώση αυτή βρέθηκε ως η κατάλληλη μετά από εργαστηριακές δοκιμές, ώστε οι λαμβάνουσες απορροφήσεις να βρίσκονται εντός της προκύπτουσας καμπύλης αναφοράς. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

1.3 Έλεγχος μεταβολής του χρώματος του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου συναρτήσει του pH

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα:

- $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COONa}$ (Acetic Acid 100%, Merck kGaA, Darmstadt, Germany) ($K_{\text{aCH}_3\text{COOH}} = 1,8 \cdot 10^{-5}$, $\text{pH} = 4,74$) σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, με προσθήκη 50 mL CH_3COOH 1 N και 25 mL NaOH 1 N και ο όγκος συμπληρώθηκε με απιονισμένο H_2O μέχρι τη χαραγή,
- $\text{NH}_3 / \text{NH}_4\text{Cl}$ (Ammonia Solution 25%, Merck kGaA, Darmstadt, Germany) ($K_{\text{bNH}_3} = 1,8 \cdot 10^{-5}$, $\text{pH} = 9,26$) σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, με προσθήκη 50 mL NH_3 1M και 25 mL HCl 1N και ο όγκος συμπληρώθηκε με απιονισμένο H_2O μέχρι τη χαραγή.

Στη συνέχεια με προσθήκη κατάλληλων όγκων οξέος (CH_3COOH , HCl) ή βάσης (NaOH , NH_3) στα αρχικά ρυθμιστικά διαλύματα, παρασκευάστηκαν διαφορετικά stock διαλύματα για καθεμία από τις τιμές της κλίμακας pH 1 έως 12.

Ακολούθως, σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 100 μL εξουδετερωμένου εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου, το οποίο προέκυψε με προσθήκη NaOH 1,5 M (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) έως $\text{pH} = 7$ και 300 μL από κάθε stock διάλυμα διαφορετικού pH, ώστε να γίνει έλεγχος της μεταβολής του χρώματος του αρχικού εκχυλίσματος.

* Η εξουδετέρωση του εκχυλίσματος κρίθηκε απαραίτητη μετά από εργαστηριακές δοκιμές ώστε να παρατηρηθεί μεταβολή του χρώματός του, διότι σε αντίθετη περίπτωση, η προσθήκη διαλυμάτων διαφορετικού pH στο εκχύλισμα δεν προκαλούσε χρωματικές μεταβολές λόγω του ισχυρά όξινου περιβάλλοντος του εκχυλίσματος.

2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΑΜΥΛΟ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟ ΦΥΣΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΑΠΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΛΑΧΑΝΟ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΚΟΚΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥΣ

2.1 Παρασκευή μεμβρανών

I. Παρασκευή μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού

Οι μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού παρασκευάστηκαν με την τεχνική της χύτευσης. Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 5 g άμυλο καλαμποκιού σε μορφή σκόνης (άμυλο αραβοσίτου, MANNA, ΑΦΟΙ ΚΕΡΑΜΑΡΗ) και 100 mL απεσταγμένου H₂O. Το ποτήρι ζέσεως με το διάλυμα τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα (VELP SCIENTIFICA, AREX Heating Magnetic Stirrer) και αφέθηκε υπό ανάδευση για 20 min. Ακολούθως, προστέθηκαν 1,5 g γλυκερόλης (Glycerol $\geq$ 99%, Fisher Chemical, Loughborough, UK), η οποία δρα ως πλαστικοποιητής και συνεχίστηκε η ανάδευση υπό θέρμανση για τουλάχιστον 40 min και έως ότου η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει στους 85 ± 5 °C. Τέλος 38 mL από το διάλυμα αμύλου επιστρώθηκαν σε πλαστικά τρυβλία διαμέτρου d=14,1 cm, ποσότητα κατάλληλη βάσει δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν εντός εργαστηρίου. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (WTB BINDER, Labortechnik GmbH, Tuttlingen Germany) στους 40 °C για 48 h έως πλήρους ξήρανσής τους. Μετά το πέρας των 48 h οι μεμβράνες αποκολλήθηκαν από τα τρυβλία και αποθηκεύτηκαν σε σακούλες PA/PE υπό κενό, μέχρι τη στιγμή όπου πραγματοποιήθηκε μελέτη των ιδιοτήτων τους (Prietto et al., 2017).

II. Παρασκευή μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού και εκχύλισμα από κόκκινο λάχανο

Οι μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο εκχύλισμα από κόκκινο λάχανο, παρασκευάστηκαν με παρόμοιο τρόπο όπως και οι απλές μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού. Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 5 g άμυλο καλαμποκιού, 100 mL

απεσταγμένου H₂O και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα και αφέθηκε υπό ανάδευση για 20 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1,5 g γλυκερόλης και συνεχίστηκε η ανάδευση υπό θέρμανση για τουλάχιστον 40 min και έως ότου η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει στους 85 ± 5 °C. Όταν επήλθε αυτή η θερμοκρασία στο διάλυμα, σταμάτησε εντελώς η θέρμανση αυτού μέχρις ότου η θερμοκρασία έπεσε στους 50 °C. Ακολούθως προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου (το οποίο είχε προηγουμένως εξουδετερωθεί με NaOH 1,5 M μέχρι την τιμή pH = 5) και προέκυψαν διαλύματα περιεκτικότητας 10% και 20% σε εκχύλισμα (φυσικός δείκτης). Τα διαλύματα αφέθηκαν υπό ανάδευση για 10 min και τέλος 38 mL αυτών επιστρώθηκαν σε πλαστικά τρυβλία διαμέτρου d=14,1 cm και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (WTB BINDER, Labortechnik GmbH, Tuttlingen Germany) στους 40 °C για 48 h έως πλήρους ξήρανσής τους. Μετά το πέρας των 48 h οι μεμβράνες αποκολλήθηκαν προσεκτικά με τη βοήθεια μεταλλικής λαβίδας από τα τρυβλία και αποθηκεύτηκαν σε σακούλες PA/PE υπό κενό, μέχρι τη στιγμή όπου πραγματοποιήθηκε μελέτη των ιδιοτήτων τους (Prietto et al., 2017).

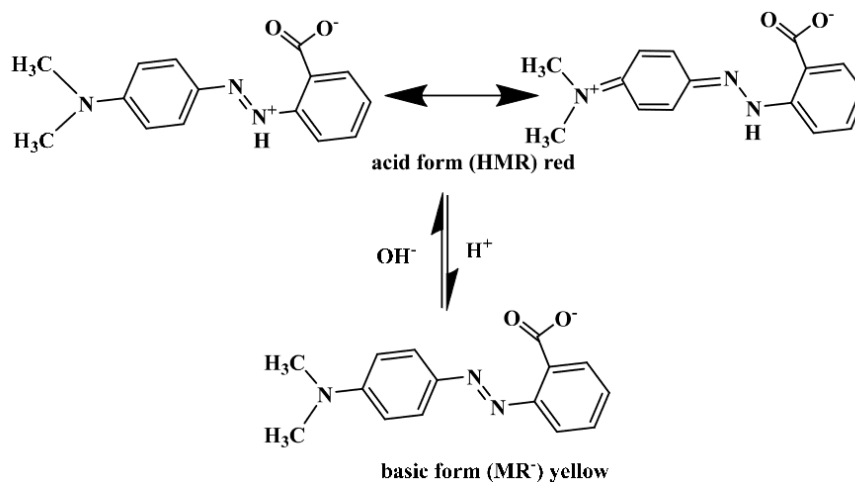
* Η εξουδετέρωση του εκχυλίσματος (αρχικού pH<2) με NaOH 1,5M έως pH = 5 πριν την προσθήκη αυτού στο διάλυμα, είχε ως σκοπό οι τελικές μεμβράνες να είναι κοντά στην τιμή pH του νωπού κρέατος, ώστε κατά την αλλοίωση αυτού ($\uparrow$ pH) να γίνει άμεσα αισθητή η χρωματική τους διαφορά.

III. Παρασκευή μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού και ενσωματωμένο δείκτη κόκκινο του μεθυλίου

Οι μεμβράνες με το χημικό δείκτη κόκκινο του μεθυλίου παρασκευάστηκαν ως μάρτυρες για τη γρηγορότερη ανίχνευση της αλλοίωσης των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου μέσω αύξησης της συγκέντρωσης των πτητικών αμινών και επακόλουθα και του pH τους, διότι οι χημικοί δείκτες είναι πιο ευαίσθητοι σε μεταβολές pH συγκριτικά με τους φυσικούς δείκτες.

Παρασκευάστηκαν μεμβράνες με περιεκτικότητα 5% σε δείκτη κόκκινο του μεθυλίου (Merck kGaA, Darmstadt, Germany). Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια πειραματική πορεία με την παρασκευή μεμβρανών με ενσωματωμένο εκχύλισμα, με τη μόνη

διαφορά ότι όταν η θερμοκρασία έπεσε στους 50 °C αντί για εκχύλισμα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα χημικού δείκτη.



Εικόνα 16: Χημική δομή του δείκτη κόκκινο του μεθυλίου σε όξινο και βασικό περιβάλλον (Khadka & Bhattarai, 2021).

2.2 Μελέτη των παρασκευασθέντων μεμβρανών

2.2.1 Μέτρηση πάχους μεμβρανών

Διάφορες μεμβράνες που ήταν αποθηκευμένες σε σακούλες PA/PE αφαιρέθηκαν από αυτές και μετρήθηκε το πάχος τους με φορητό ψηφιακό παχύμετρο (Electronic Outside Micrometer, IS 13109 INSIZE CO., LTD, Japan), σε 6 – 10 διαφορετικά σημεία της επιφάνειάς τους.

2.2.2 Μέτρηση μηχανικών ιδιοτήτων μεμβρανών

Για τη μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων των μεμβρανών, κόπηκαν 5 έως 10 δοκίμια από το κάθε υλικό συσκευασίας πλάτους 1,5 cm και μήκους ~ 10cm. Η μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας ένα δυναμόμετρο Instron μοντέλου 4411 (Instron Engineering Corp., Canton, MA). Στη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε η απόσταση των μεγγενών ήταν 5cm και η ταχύτητα μετακίνησης των μεγγενών ήταν 15mm/min.

Οι τιμές που λαμβάνονται από τη μέτρηση των μηχανικών ιδιοτήτων είναι:

- ο Αντοχή στο όριο θραύσης (τιμή load ή F): αντιπροσωπεύει την δύναμη σε kN που ασκείται μέχρι τη θραύση,
- ο % επιμήκυνση στο όριο θραύσης (% elongation at break): αναφέρεται στην παραμόρφωση του δοκιμίου μέχρι την κατάρρευση,
- ο αντοχή στον εφελκυσμό (tensile strength, stress): εκφράζει την τάση που ασκείται στο δοκίμιο έως το όριο θραύσης και έχει μονάδα μέτρησης το MPa,
- ο συντελεστής Young (συντελεστής ελαστικότητας, Young Modulus): προκύπτει από την εφαπτόμενη της αρχικά σχηματιζόμενης ευθείας $\text{stress} = f(\text{strain})$ και δηλώνει την ακαμψία του υλικού, έχει μονάδα μέτρησης το MPa.

2.2.3 Προσδιορισμός ποσοστού υγρασίας και διαλυτότητας μεμβρανών

Ο προσδιορισμός του ποσοστού υγρασίας (Moisture Content, MC) και διαλυτότητας (Water Solubility, WS) των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με σταθμική ανάλυση.

➤ Προσδιορισμός υγρασίας μεμβρανών:

Από κάθε είδος μεμβράνης κόπηκαν τρία τετράγωνα κομμάτια διαστάσεων 2*2 cm και λήφθηκε η μάζα τους (M_1) με τη χρήση αναλυτικού ζυγού. Στη συνέχεια το κάθε κομμάτι μεμβράνης τοποθετήθηκε σε ύαλο ωρολογίου και σε πυριαντήριο που ήταν ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 105 °C για 2 ώρες, προς ξήρανση αυτού. Μετά το πέρας των 2 ωρών ακολούθησε ξανά ζύγιση των μεμβρανών (M_2). Το ποσοστό υγρασίας κάθε είδους μεμβράνης υπολογίστηκε από την εξίσωση (1) (Z. Zhang et al., 2023).

$$MC (\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (1)$$

➤ Προσδιορισμός διαλυτότητας μεμβρανών:

Τα δείγματα των μεμβρανών που ξηράθηκαν και λήφθηκαν οι μάζες τους (M_2) κατά τον προσδιορισμό υγρασίας, τοποθετήθηκαν σε ποτήρια ζέσεως που περιείχαν 50 mL απιονισμένο H_2O , για 2 ώρες υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθως, αφού ενυδατώθηκαν αφαιρέθηκαν με μεταλλική λαβίδα από το H_2O και τοποθετήθηκαν ξανά σε υάλους

ωρολογίου και στο πυριαντήριο σε θερμοκρασία 105 °C για 2 ώρες. Αφού πέρασε το προαναφερθέν χρονικό διάστημα καταγράφηκε η νέα μάζα των μεμβρανών (M₃). Το ποσοστό διαλυτότητας κάθε είδους μεμβράνης υπολογίστηκε από την εξίσωση (2) (Z. Zhang et al., 2023).

$$WS (\%) = \frac{M_2 - M_3}{M_2} \times 100 \quad (2)$$

2.2.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικού περιεχομένου μεμβρανών

Οι συγκεκριμένοι προσδιορισμοί έχουν λόγο να πραγματοποιηθούν μόνο για τις απλές μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού και τις μεμβράνες με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο διότι μόνο αυτές περιέχουν ανθοκυανίνες. Παρόλα αυτά, για να φανούν οι διαφορές από τη θετική επίδραση του προστιθέμενου εκχυλίσματος μελετήθηκαν και οι μεμβράνες με τον χημικό δείκτη κόκκινο του μεθυλίου.

1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης μεμβρανών

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των μεμβρανών ακολουθήθηκε η μέθοδος των Wang et al. (2022) με κάποιες τροποποιήσεις. Αρχικά από κάθε είδος μεμβράνης κόπηκαν κομμάτια μάζας 30 mg και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους στη συνέχεια προστέθηκαν 4,5 mL διαλύματος DPPH 0,1 mM και αφέθηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm έναντι τυφλού μεθανόλης με τη χρήση του UV-Vis φασματοφωτόμετρου (Infinite M Nano, Tecan, Switzerland). Η % αναστολή της ρίζας DPPH προέκυψε από την εξίσωση $\% RSA = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$, όπου A₀: απορρόφηση καθαρού DPPH και A_s: η απορρόφηση του δείγματος μετά από 30 min αναμονής στο σκοτάδι. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

2. Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου μεμβρανών

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου των μεμβρανών ακολουθήθηκε η μέθοδος των Wang et al. (2022) με κάποιες τροποποιήσεις. Από κάθε είδος μεμβράνης κόπηκε κομμάτι μάζας 250 mg και τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικούς σωλήνες, στους οποίους στη συνέχεια προστέθηκαν 5 mL μεθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15 min, στους 20°C στις 3000 rpm. Έπειτα, σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL προστέθηκαν 0,2 mL από το υπερκείμενο διάλυμα που λήφθηκε μετά τη φυγοκέντρωση, 2,4 mL απιονισμένο H₂O, 0,2 mL αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu και παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 5 min. Τέλος προστέθηκαν 0,4 mL Na₂CO₃ 20% και συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο H₂O. Τα διαλύματα αφέθηκαν στο σκοτάδι για 2 ώρες και μετρήθηκε η απορρόφηση αυτών στα 765 nm έναντι τυφλού διαλύματος με τη χρήση του UV-Vis φασματοφωτόμετρου (Infinite M Nano, Tecan, Switzerland) (C. Wang et al., 2022).

3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ MEMBRANΩΝ ΣΕ ΚΙΜΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ

3.1 Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων από κιμά κοτόπουλο

Συσκευασμένος κιμάς κοτόπουλο (50% στήθος, 50% μπούτι), ο οποίος προμηθεύτηκε από τη βιομηχανία «ΠΙΝΔΟΣ Α.Ε.», που εδρεύει στην περιοχή των Ιωαννίνων, μεταφέρθηκε άμεσα στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό ψύξη σε ισοθερμικό σακίδιο.

Ο κιμάς χωρίστηκε σε μερίδες των 150 g, οι οποίες σχηματίστηκαν σε σχήμα μπιφτεκιού. Στη συνέχεια, τα μπιφτεκια τοποθετήθηκαν σε δισκάκια πολυστυρολίου (PS, διαστάσεων 270×170×45 mm) και δίπλα από αυτά προσαρμόστηκαν ορθογώνια κομμάτια των παρασκευασθέντων μεμβρανών αμύλου καλαμποκιού (με 10% και 20% εκχύλισμα κόκκινου λάχανου και 5% δείκτη κόκκινο του μεθυλίου), ώστε να διαπιστωθεί εάν η μικροβιακή αλλοίωση του κιμά συνάδει με την αλλαγή χρώματος των μεμβρανών και εάν εν τέλει αυτές οι μεμβράνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως

έξυπνη συσκευασία. Τέλος, τα δισκάκια εισήχθησαν σε σακούλες PA/PE, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλό φραγμό στις πτητικές ενώσεις, ώστε να εγκλωβιστούν οι πτητικές αμίνες που παράγονται κατά την αλλοίωση του κρέατος και να παρατηρηθεί ευκολότερα η χρωματική μεταβολή. Η αποθήκευση στις σακούλες PA/PE ήταν αερόβια, δηλαδή δεν πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του αέρα και συσκευασία υπό κενό (vacuum).

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 0, 3, 5, 7 και ως εκ τούτου ετοιμάστηκαν 4 δισκάκια με μπιφτέκια και τις μεμβράνες με τους δείκτες. Κάθε ημέρα δειγματοληψίας λαμβάνονταν δείγμα για φυσικοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις από διαφορετικό δισκάκι ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) μέχρι την αντίστοιχη ημέρα δειγματοληψίας.

3.2 Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε βάσει των επισήμων μεθόδων ανάλυσης της International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF et al., 1986). Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις που αφορούν μικροοργανισμούς οι οποίοι απαντώνται συχνά σε προϊόντα κρέατος και συγκεκριμένα σε κοτόπουλο. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν τα ακόλουθα είδη:

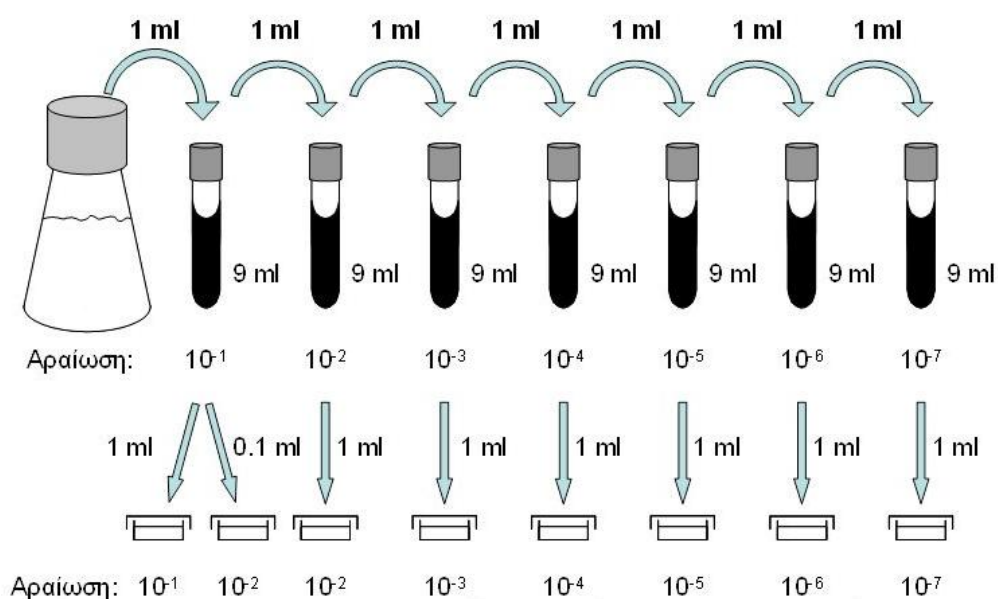
- | | | |
|---|---|---------------------------------|
| α) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.) | } | Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης |
| β) Ζύμες-Μύκητες | | |
| γ) <i>Brochothrix Thermosphacta</i> | | |
| δ) Ψευδομονάδες (<i>Pseudomonas</i> spp.) | | |
| ε) Εντεροβακτηριοειδή (<i>Enterobacteriaceae</i>) | } | Τεχνική ενσωμάτωσης |
| στ) Γαλακτικά Βακτήρια (<i>Lactic Acid Bacteria, LAB</i>) | | |

- ❖ Τα θρεπτικά άγαρ για την ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονταν στην εκάστοτε συσκευασία (πλήρης

διαλυτοποίηση του στερεού άγαρ → αποστείρωση αυτού στις περιπτώσεις που χρειάζονταν → επίστρωση τρυβλίων Petri → αναμονή έως πλήρους πήξης για την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης ή ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος σε ρευστό θρεπτικό άγαρ).

Δειγματοληψία

Ποσότητα 10 g κιμά κοτόπουλο η οποία λήφθηκε από όλη τη μάζα των συσκευασμένων δειγμάτων, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε σακούλα Stomacher (Seward Medical, Worthing, West Sussex, UK) που περιείχε 90 mL αποστειρωμένου πεπτονούχου διαλύματος (peptone water) συγκέντρωσης 0,1% w/v και ομογενοποιήθηκε για 120 sec σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με τη χρήση Lab Blender Stomacher (Seward Medical, London, UK). Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (1:10) από το αρχικό ομογενοποιημένο διάλυμα σε πεπτονούχο διάλυμα συγκέντρωσης 0,1 % w/v όπως φαίνεται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17: Διαδικασία διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων από το αρχικό ομογενοποιημένο δείγμα σε πεπτονούχο διάλυμα συγκέντρωσης 0,1 % w/v (Μικροβιολογία Τροφίμων Ι Ενότητα 3, n.d.).

Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης

Ποσότητα 0,1 mL βακτηριακού εναιωρήματος από την κατάλληλη, ανά περίπτωση, δεκαδική αραιώση ενοφθαλμίστηκε κι εξαπλώθηκε ομοιόμορφα στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος με τη βοήθεια υάλινου τριγώνου το οποίο αποστειρωνόταν πριν από την κάθε επίστρωση (πέρασμα από διάλυμα αιθανόλης 70% και ακολούθως από φλόγα). Έπειτα από επώαση σε κατάλληλες θερμοκρασιακές συνθήκες σχηματίστηκαν ευδιάκριτες αποικίες οι οποίες καταμετρήθηκαν με τη βοήθεια του οργάνου για τη μέτρηση αποικιών (Colony Counter, Gallenkamp).

α) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.): Χρησιμοποιήθηκε το μη επιλεκτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA, NEOGEN Culture Media, CODE NCM0010A, Heywood, UK) και η καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση στους 30 °C για 48 h.

β) Ζύμες-Μύκητες: Χρησιμοποιήθηκε το μη επιλεκτικό υπόστρωμα Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (RBCA, NEOGEN Culture Media, CODE LAB036, Heywood, UK) με την προσθήκη αντιβιοτικού Chloramphenicol (NEOGEN Culture Media, Code NCM4051-0.5, Heywood, UK) και η καταμέτρηση των αποικιών των ζυμών πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση στους 30 °C για 48 h, ενώ των μυκήτων μετά από επώαση στους 30 °C για 5 ημέρες.

γ) *Brochothrix Thermosphacta*: Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα Streptomycin Thallous Acetate- Actidione (STAA) Agar Base (OXOID, Code CM0881, Basingstoke, England) με τη προσθήκη αντιβιοτικού (STA Selective Supplement SR0162E, OXOID, Basingstoke, England) το οποίο επώαστηκε σε θερμοκρασία 30°C για 48 h.

δ) Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.): Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base (Oxoid, Code CM0559, Basingstoke, UK), με τη προσθήκη αντιβιοτικού (Pseudomonas C-N Supplement SR0102E, OXOID, Basingstoke, UK)

και η καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση στους 30 °C για 48 h.

Τεχνική ενσωμάτωσης

Ποσότητα 1 mL βακτηριακού εναιωρήματος από την κατάλληλη, ανά περίπτωση, δεκαδική αραίωση ενοφθαλμίστηκε σε κενό αποστειρωμένο τρυβλίο Petri και στη συνέχεια προστέθηκαν 10 – 15 mL ρευστού θρεπτικού υλικού (45 – 50 °C). Ακολούθησε ήπια ανάδευση με κυκλικές κινήσεις προκειμένου το εναιώρημα να εξαπλωθεί σε όλη την έκταση του τρυβλίου και το μίγμα αφέθηκε να πήξει. Μετά τη στερεοποίηση του υλικού προστέθηκε ένα επιπλέον στρώμα ρευστού θρεπτικού υλικού (10 – 15 mL) προκειμένου να εξασφαλιστούν αναερόβιες συνθήκες. Έπειτα από επώαση σε κατάλληλες θερμοκρασιακές συνθήκες σχηματίστηκαν ευδιάκριτες αποικίες οι οποίες καταμετρήθηκαν με τη βοήθεια του οργάνου για την μέτρηση αποικιών (Colony Counter, Gallenkamp).

α) Εντεροβακτηριοειδή (*Enterobacteriaceae*): Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, NEOGEN Culture Media, CODE NCM0041A, Heywood, UK), οι μικροοργανισμοί επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37° C για 24 h και στη συνέχεια καταμετρήθηκαν οι κοκκινωπές αποικίες που περιβάλλονταν από ρόδινο δακτύλιο.

β) Γαλακτικά Βακτήρια (*Lactic Acid Bacteria, LAB*): Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα de Man, Rogosa και Sharpe's (MRS, NEOGEN Culture Media, CODE NCM0190A, Heywood, UK) και η καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση στους 37 °C για 72 h.

Η καταμέτρηση των αποικιών για τον προσδιορισμό των πληθυσμών των αναπτυχθέντων μικροοργανισμών έγινε στα τρυβλία εκείνα που ο αριθμός των αποικιών ήταν μεταξύ 30 – 300 με ελάχιστες εξαιρέσεις που αφορούν τις πρώτες ημέρες δειγματοληψίας στις οποίες το μικροβιακό φορτίο ήταν σχετικά χαμηλό. Τα

αποτελέσματα εκφράστηκαν σε δεκαδικό λογάριθμο των αποικιών ανά γραμμάριο τροφίμου (Colony Forming Units/gram, CFU/g). Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση αυτών.

3.3 Δείκτες ποιότητας δειγμάτων

Η ποιότητα των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου μελετήθηκε τόσο φυσικοχημικά όσο και μικροβιολογικά σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του pH, του ολικού πτητικού αζώτου (TVB-N), μικροβιολογική ανάλυση καθώς και ανάλυση του πτητικού προφίλ (SPME-GC/MS) των δειγμάτων.

3.3.1 Προσδιορισμός pH

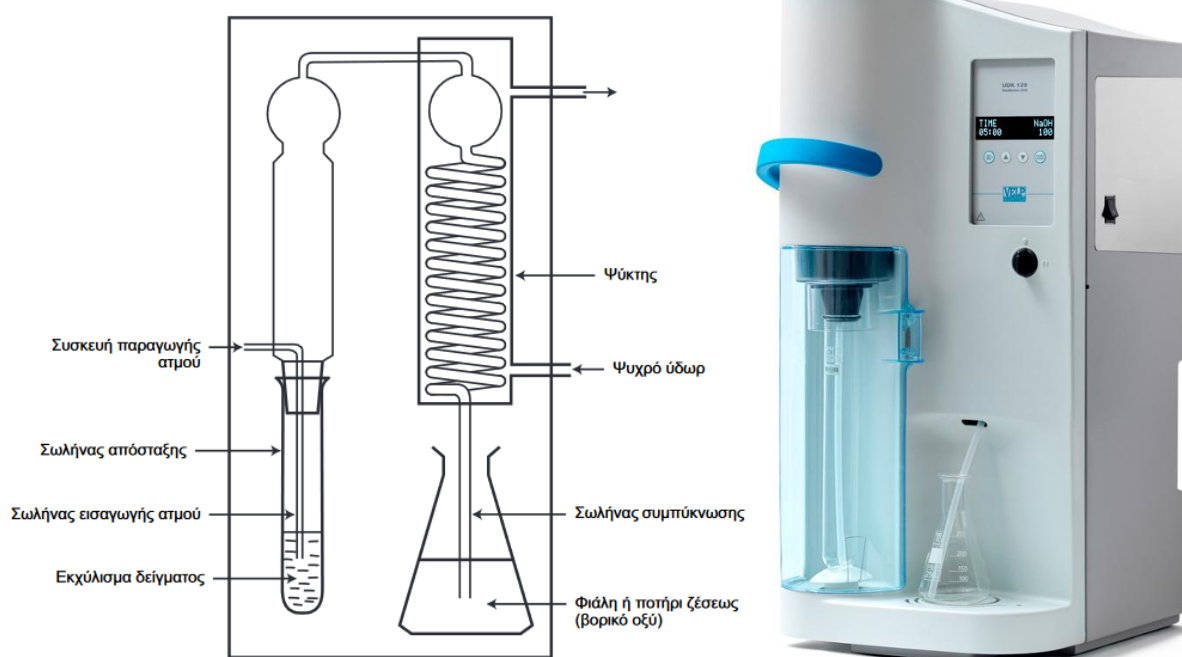
10 g κιμά κοτόπουλου ομογενοποιήθηκαν πλήρως με 90 mL απιονισμένου νερού και το μίγμα διηθήθηκε με πτυχωτό ηθμό. Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ηλεκτρονικού pH-μέτρου (pH-Z-METER, HD 3456.2, Delta OHM, Padova, Italy) μέσω εμβάπτισης του ηλεκτροδίου του pH-μέτρου στο διήθημα που προέκυψε. Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου, εις διπλούν και λήφθηκε ο μέσος όρος αυτών.

3.3.2 Προσδιορισμός ολικού πτητικού αζώτου

Ο προσδιορισμός του ολικού πτητικού αζώτου (TVB-N) πραγματοποιήθηκε μέσω απόσταξης μεθ' υδρατμών με χρήση της αποστακτικής στήλης (UDK 129 Distillation Unit, Velp Scientifica, Italy) της συσκευής Kjeldahl σύμφωνα με τους Assanti et al. (2021) και Sun et al. (2018) με κάποιες παραλλαγές.

Συγκεκριμένα, 10 g κιμά κοτόπουλου ομογενοποιήθηκαν πλήρως με 100 mL απιονισμένο νερό με τη βοήθεια γουδιού και το παραγόμενο εναιώρημα διηθήθηκε με πτυχωτό ηθμό προς λήψη του διηθήματος. Ακολούθως, 5 mL του διηθήματος αναμείχθηκαν με 5 mL MgO 5% σε φιάλη απόσταξης Kjeldahl, ενώ σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 10 mL H₃BO₃ 2% (στο οποίο προϋπήρχε το μίγμα δεικτών πράσινο της βρωμοκρεσόλης και κόκκινο του μεθυλίου σε αναλογία 3/2 αντίστοιχα και είχε

εξουδετερωθεί με NaOH 0,1 N έως το pH του διαλύματος να φτάσει στο 4,6 – 4,8). Στη συνέχεια ακολούθησε απόσταξη Kjeldahl για 5 min και το απόσταγμα που συλλέχθηκε στην κωνική φιάλη τιτλοδοτήθηκε με HCl 0,01 N, έως ότου το χρώμα του διαλύματος να μεταβεί από πράσινο σε ανοιχτό κόκκινο. Η τιτλοδότηση του τυφλού έγινε με την προαναφερθείσα διαδικασία, με τη μόνη διαφορά ότι αντί για 5 mL διηθήματος προστέθηκαν 5 mL ύδατος.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της απόσταξης μεθ' υδρατμών (αριστερά), σύγχρονη συσκευή απόσταξης Kjeldahl (δεξιά) (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2074/2005).

Η περιεκτικότητα σε TVB-N των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου σε διαφορετικές μέρες συντήρησης υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\text{TVB} - \text{N (mg/100g)} = \left[\frac{(V1 - V2) \times C \times 14}{m \times 0,05} \right] \times 100$$

όπου

- V1: όγκος HCl που καταναλώθηκε για την ογκομέτρηση του δείγματος
- V2: όγκος HCl που καταναλώθηκε για την ογκομέτρηση του τυφλού
- C: συγκέντρωση HCl (mol/L)

- m: μάζα του δείγματος
- 14: μοριακό βάρος του N₂
- 0,05: συντελεστής αναγωγής της περιεκτικότητας TVB-N από τα 5 mL του διηθήματος στα 100 mL αυτού

3.3.3 Προσδιορισμός Πτητικού Προφίλ με Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου σε συνδυασμό με Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (HS-SPME/GC-MS).

Για τον προσδιορισμό του πτητικού προφίλ των δειγμάτων έλαβε χώρα ανάλυση με την τεχνική της Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου σε συνδυασμό με Αέρια Χρωματογραφία – Φασματοσκοπία Μάζας (HS-SPME/GC-MS). Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο της εταιρίας Agilent, μοντέλου 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας της εταιρίας Agilent, μοντέλου 5973C. Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη Agilent DB-5MS (5% Pheny-methylpolysiloxane, 60m×0.320mm×1.00μm, Agilent Santa Clara, USA), ίνα Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) 85 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), και εσωτερικό πρότυπο 4-μέθυλο-2-πεντανόνη (Merck kGaA, Darmstadt, Germany).

Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με ρυθμό ροής 1,5 mL/min. Η θύρα έγχυσης ήταν εξοπλισμένη με επένδυση 0,75 mm i.d, (Supelco, Bellefonte, PA, USA) κατάλληλο για ανάλυση SPME σε λειτουργία split (λόγος split=2:1) στους 260 °C. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 40°C, ακολούθησε αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10°C/min έως τους 110°C, στη συνέχεια ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας μειώθηκε στους 5°C/min έως τους 160 °C και τέλος η θερμοκρασία αυξήθηκε έως τους 260°C με ρυθμό 10°C/min όπου διατηρήθηκε για 3 λεπτά (Πίνακας 8). Η θερμοκρασία διεπαφής (γραμμή μεταφοράς) ρυθμίστηκε τους 270°C. Το εύρος σάρωσης μαζών ήταν 29–350 m/z. Η θερμοκρασία της πηγής MS και τετραπόλου ήταν 230°C και 150°C αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης των εκλούμενων ενώσεων με εκείνες της βιβλιοθήκης Wiley Library (Wiley, 7-NIST 05, J. Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England) και με τον υπολογισμό των σχετικών δεικτών χρόνου κατακράτησης (RI). Έγινε ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων που

ανιχνεύτηκαν με χρήση του πρότυπου διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης (4-μεθυλο-2-πεντανόνη).

Πίνακας 8: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα του αέριου χρωματογράφου.

Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας (°C/min)	Θερμοκρασιακό επίπεδο (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
	40	0
10	110	0
5	160	0
10	260	3

Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, σε φιαλίδιο των 20 mL τοποθετήθηκαν 3 g κιμά κοτόπουλου και εσωτερικό πρότυπο (4-μέθυλο-2-πεντανόνη) συγκέντρωσης 26,67 ppb. Συγκεκριμένα, την ημέρα 0 προστέθηκαν 10 μ L εσωτερικού προτύπου, την 3^η ημέρα 20 μ L, την 5^η ημέρα 30 μ L ενώ την 7^η ημέρα 40 μ L 4-μέθυλο-2-πεντανόνης. Η προσθήκη αυξανόμενων όγκων εσωτερικού προτύπου κρίθηκε αναγκαία λόγω του ότι παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης των πτητικών ενώσεων κατά την πάροδο του χρόνου συντήρησης των δειγμάτων κιμά. Κατόπιν, το φιαλίδιο σφραγίστηκε αεροστεγώς με διάτρητο πώμα αλουμινίου το οποίο είχε διάφραγμα πολυτετραφθορο-αιθυλένιο (PTFE)/σιλικόνης. Το σφραγισμένο φιαλίδιο τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο στους 50 °C για 15 min ώστε να επιτευχθεί εξισορρόπηση της θερμοκρασίας και στη συνέχεια εισήχθη η ίνα εντός του φιαλιδίου. Με τη βοήθεια του ειδικού εμβόλου έγινε έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο (headspace) του δείγματος σε σταθερό ύψος μέσα στο φιαλίδιο για άλλα 15 min. Μετά το πέρας των 15 min, η ίνα επαναφέρθηκε εντός της σύριγγας, απομακρύνθηκε από το φιαλίδιο κι εισήχθη αμέσως στο θάλαμο εξαέρωσης (injection port) του αέριου χρωματογράφου, όπου κι εκτέθηκε για τουλάχιστον 10 min στον εγχυτή προκειμένου να εκροφηθούν πλήρως όλες οι πτητικές ενώσεις που είχαν προσροφηθεί από την ίνα. Οι παραπάνω συνθήκες δειγματοληψίας αποτελούν αποτέλεσμα βελτιστοποίησης.

Από τα δεδομένα της χρωματογραφικής ανάλυσης σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από τον φασματογράφο μάζας που προκύπτουν, και κρατώντας μόνο τις ενώσεις για

τις οποίες εμφανίζεται ποσοστό συμφωνίας μεγαλύτερο από 80% (Qualification>80) γίνεται ποιοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων του τροφίμου που αναλύθηκε.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Η πειραματική διάταξη (παρασκευή μεμβρανών κι εφαρμογή τους σε δείγματα κιμά κοτόπουλου) επαναλήφθηκε εις διπλούν ($n = 2 \times 2 = 4$). Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των δεδομένων από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (Mean Value $\pm$ Standard Deviation, MV $\pm$ SD).

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού στατιστικού πακέτου SPSS έκδοση 25.0 Statistics (IBM, Armonk, NY, USA). Η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε με μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (one-way ANOVA) και του τεστ πολλαπλής εμβέλειας Tuckey, το οποίο εξετάζει τις διαφορές των μέσων όρων. Βάσει του ελέγχου διακύμανσης (one-way ANOVA) διαπιστώθηκε αν η τιμή p είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη του 0,05.

Στην περίπτωση που $p > 0,05$ ισχύει η μηδενική υπόθεση, δηλαδή ότι οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους και κατά συνέπεια δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ στην περίπτωση που $p < 0,05$ ισχύει η εναλλακτική υπόθεση, δηλαδή ότι οι μέσοι όροι για τον συγκεκριμένο παράγοντα δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους και κατά συνέπεια υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΛΑΧΑΝΟΥ

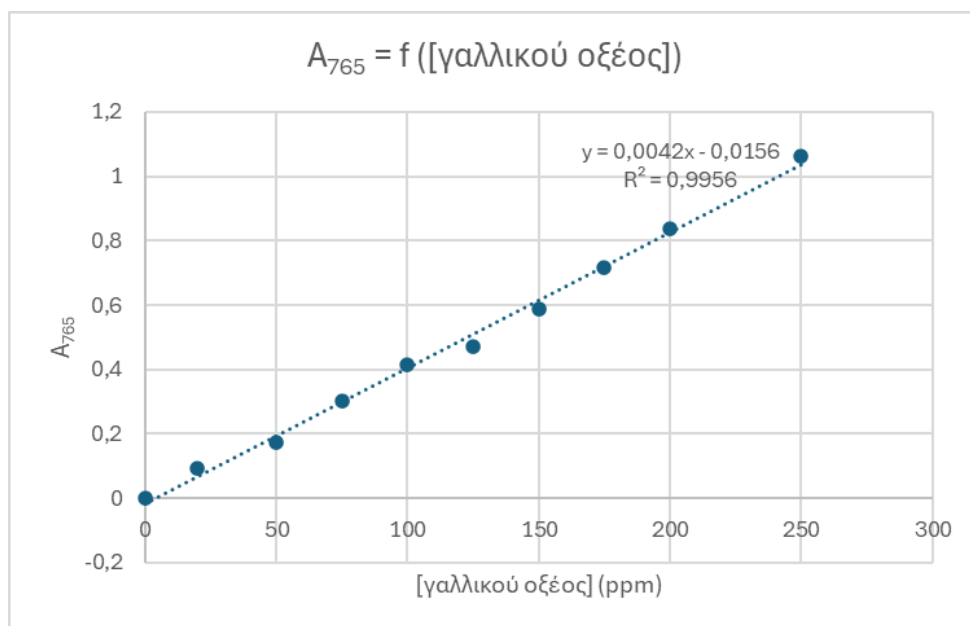
Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στο εκχύλισμα κόκκινου λάχανου πριν την ενσωμάτωσή του στις μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού.

1.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικού περιεχομένου

Τα πειραματικά αποτελέσματα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος καθώς και η διαγραμματική της απεικόνιση φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 9 και Διάγραμμα 1 αντίστοιχα).

Πίνακας 9: Πειραματικά δεδομένα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος.

[γαλλικού οξέος] (ppm)	A ₇₆₅
0	0
20	0,0942
50	0,1734
75	0,3013
100	0,4154
125	0,4698
150	0,5895
175	0,7166
200	0,8362
250	1,0633



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

Μέσω της εξίσωσης ευθείας της καμπύλης αναφοράς ($y = 0,0042x - 0,0156$) και των απορροφήσεων που λήφθηκαν από τα δείγματα εκχυλίσματος προέκυψε ότι στο αραιωμένο δείγμα η συγκέντρωση ήταν $118,05 \pm 1,72$ ppm γαλλικού οξέος. Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν $\frac{1}{4}$ άρα η συγκέντρωση του δείγματος είναι $472,19 \pm 6,87$ ppm γαλλικού οξέος.

Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίστηκε μετά τη λήψη των απορροφήσεων στα 517 nm και εφαρμογή αυτών στη σχέση $\% \text{RSA} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$. Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις για καθέναν προσδιορισμό (%RSA, φαινολικό περιεχόμενο) φαίνονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Αντιοξειδωτική δράση και φαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου.

Δείγμα	% RSA	Φαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος/100 g κόκκινου λάχανου)
Εκχύλισμα κόκκινου λάχανου	$48,20 \pm 3,96$	$236,10 \pm 3,43$

- Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αντιοξειδωτική ικανότητα (%RSA) του κόκκινου λάχανου κυμαίνεται κοντά στο 60% αμέσως μετά τη συγκομιδή, ενώ αυτό το ποσοστό ελαττώνεται κατά την αποθήκευση (Leja et al., 2010). Βεβαίως, η αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται άμεσα από την ποικιλία, τις καλλιεργητικές τεχνικές, το κλίμα, καθώς και τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν στην εκάστοτε περιοχή από όπου συλλέγεται το κόκκινο λάχανο. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στη μέγιστη διατήρηση αντιοξειδωτικών διαδραματίζουν και οι συνθήκες αποθήκευσης των συγκεκριμένων λαχανικών, σε περιβάλλον με συγκεκριμένη υγρασία, θερμοκρασία και όσο το δυνατόν λιγότερη έκθεση στο φως, ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των ανθοκυανινών που προσδίδουν και την αντιοξειδωτική δράση στο κόκκινο λάχανο.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κόκκινου λάχανου από το οποίο λήφθηκε το εκχύλισμα όπου μελετήθηκε υπολογίστηκε ίση με $\% \text{ RSA} = 48,20 \pm 3,96$, τιμή αρκετά κοντά στις βιβλιογραφικές εάν λάβουμε υπόψιν ότι πρόκειται για λάχανο από τοπικό ελληνικό κατάστημα το οποίο προφανώς αποθηκεύτηκε για κάποιο διάστημα μετά τη συγκομιδή του, μέχρι να διατεθεί προς πώληση.

Επομένως, συμπεραίνουμε πως η αντιοξειδωτική δράση του συγκεκριμένου λάχανου είναι αρκετά μεγάλη, καθώς και ότι οι συνθήκες συντήρησης του προϊόντος ήταν σωστές.

- Η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου σε φαινολικά, σύμφωνα με μελέτες των Chun et al. (2004) κυμαίνεται από $366,30 \pm 3,60$ έως $393,10 \pm 10,80$ mg γαλλικού οξέος / 100 g φρέσκου δείγματος. Στο δείγμα που αναλύθηκε, η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις βρέθηκε μικρότερη και συγκεκριμένα ίση με $236,10 \pm 3,43$ mg γαλλικού οξέος / 100 g κόκκινου λάχανου. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στην ποικιλία του λάχανου ή τις συνθήκες αποθήκευσής του, παραμέτρους που είναι δύσκολο να ελεγχθούν και να διαπιστωθεί εάν όντως είναι υπεύθυνες για τις παραπάνω αποκλίσεις.

Συμπερασματικά, τόσο η αντιοξειδωτική ικανότητα όσο και το φαινολικό περιεχόμενο του κόκκινου λάχανου είναι ικανοποιητικές, επομένως η ενσωμάτωσή του σε μεμβράνες θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων ενεργών συσκευασιών τροφίμων, οι οποίες θα προσδίδουν αντιοξειδωτική προστασία στο προϊόν.

1.2 Έλεγχος μεταβολής του χρώματος του εκχυλίσματος συναρτήσει του pH

Η μεταβολή του χρώματος του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου συναρτήσει του pH φαίνεται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19: Χρωματικές μεταβολές του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου συναρτήσει του pH.

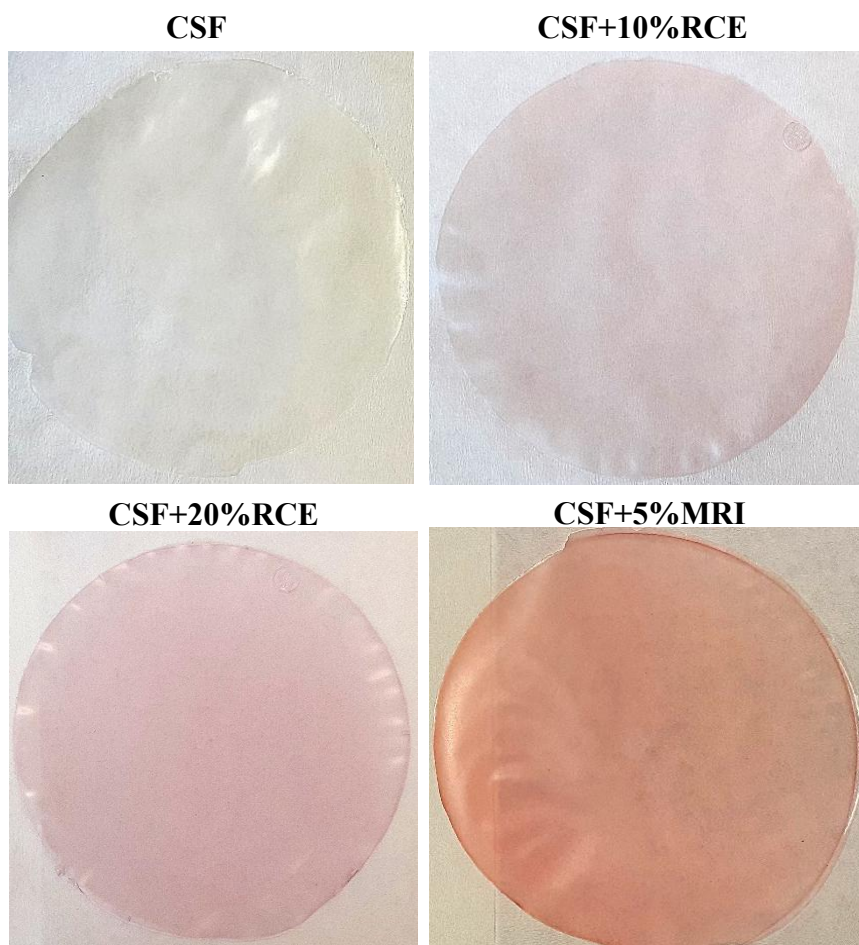
Οι παραπάνω χρωματικές διακυμάνσεις επιβεβαιώνουν όλα όσα προαναφέρθηκαν στο θεωρητικό μέρος για τις ανθοκυανίνες και τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται το χρώμα τους σε διαφορετικές συνθήκες pH.

Σε $\text{pH} < 2$ το χρώμα του εκχυλίσματος είναι κόκκινο λόγω σχηματισμού του κατιόντος φλαβυλίου, σε $\text{pH} 2 - 7$ κυριαρχεί η χημική δομή μιας κινοειδούς βάσης και το μωβ / γαλάζιο χρώμα, ενώ σε $\text{pH} > 7$ δημιουργείται χαλκόνη και το χρώμα μεταβαίνει σε πράσινο και κίτρινο (οι χημικές δομές των παραπάνω ενώσεων φαίνονται στην Εικόνα 7 του θεωρητικού μέρους).

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΘΕΝΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

2.1 Οπτική παρατήρηση των μεμβρανών

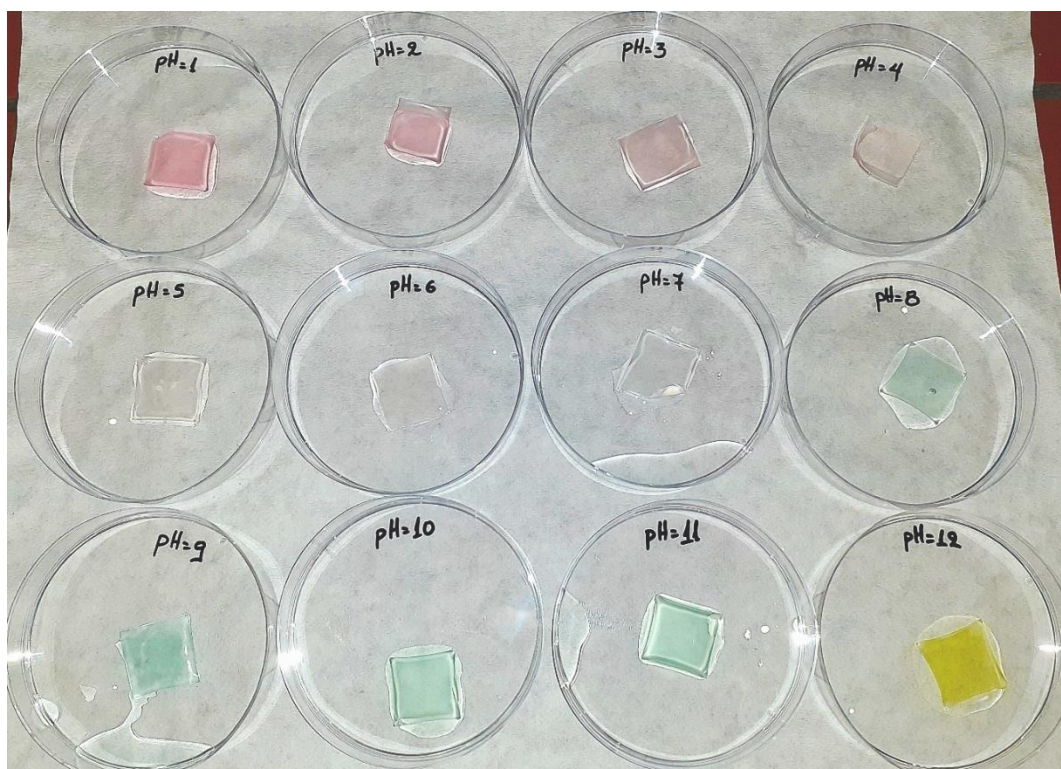
Οι παρασκευασθέντες μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού (Corn Starch Film, CSF) με προσθήκη εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου (RCE, Red Cabbage Extract) ως φυσικό δείκτη και κόκκινο του μεθυλίου (Methyl Red Indicator) ως χημικό δείκτη, φαίνονται στην Εικόνα 20.



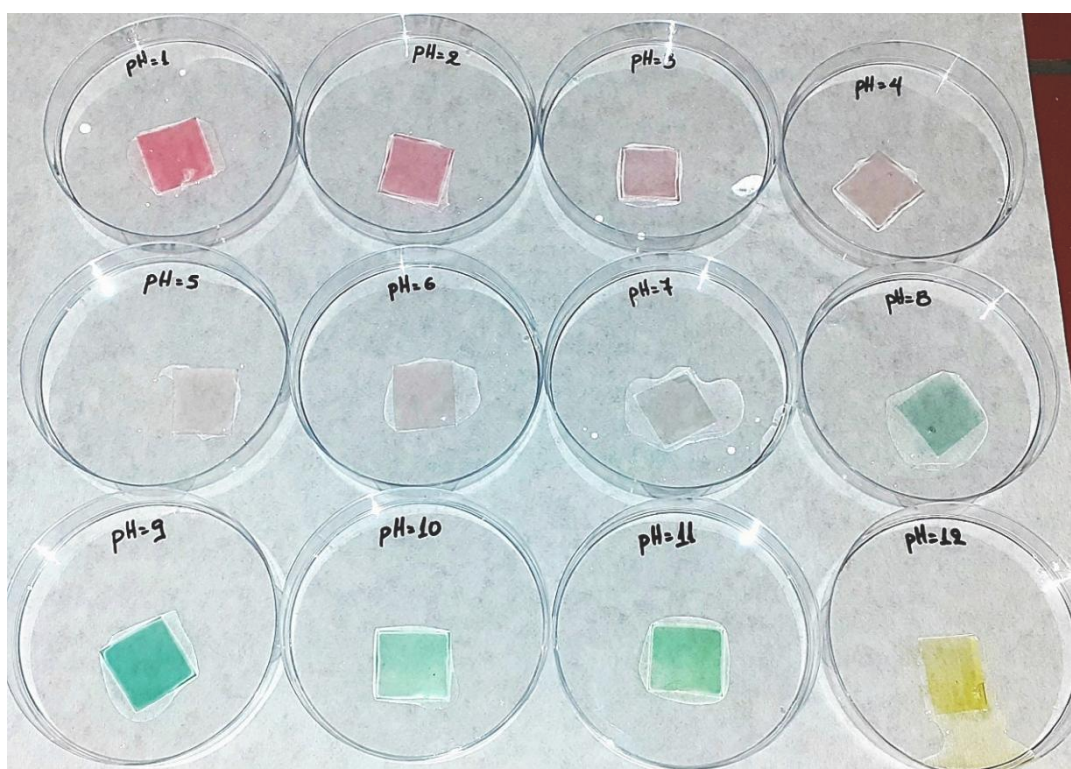
Εικόνα 20: Κυκλικές μεμβράνες από: άμυλο καλαμποκιού (CSF), άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο σε περιεκτικότητα 10% (CSF+10%RCE), άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο σε περιεκτικότητα 20% (CSF+20%RCE), άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη κόκκινο του μεθυλίου σε περιεκτικότητα 5% (CSF+5%MRI).

2.2 Έλεγχος μεταβολής του χρώματος των παρασκευασθέντων μεμβρανών σε συνθήκες διαφορετικού pH.

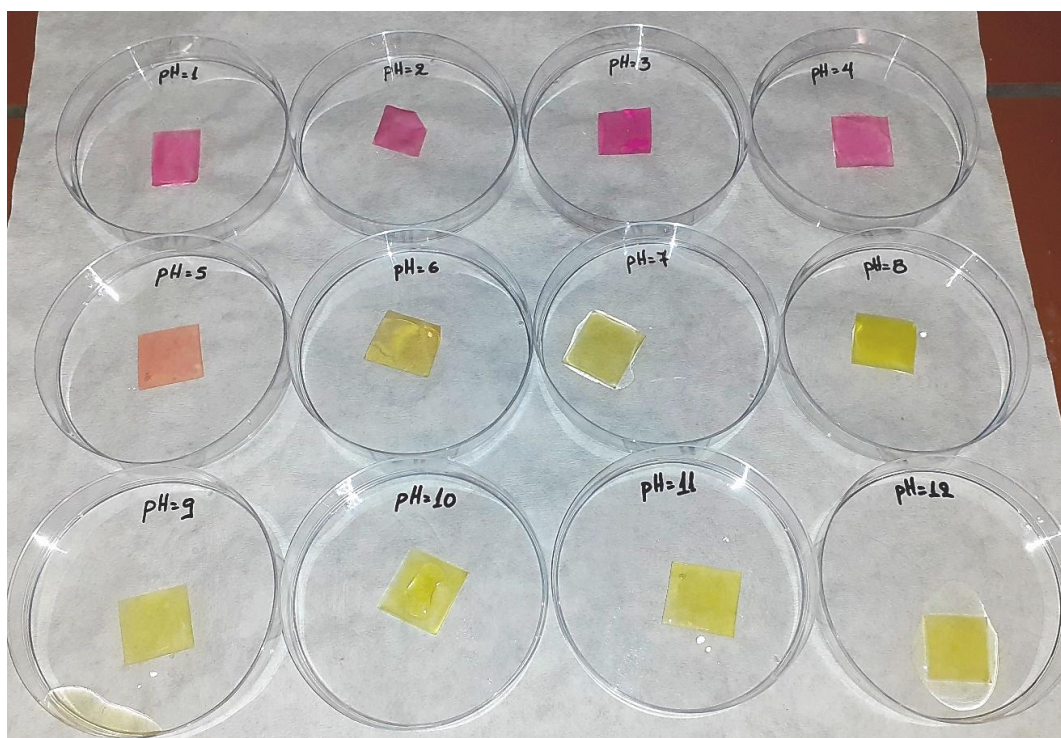
Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται οι χρωματικές μεταβολές των μεμβρανών στις οποίες έχουν ενσωματωθεί φυσικοί (εκχύλισμα κόκκινου λάχανου) και χημικοί (κόκκινο του μεθυλίου) δείκτες, συναρτήσει του pH.



Εικόνα 21: Μεταβολές χρωμάτων των μεμβρανών CSF+10%RCE συναρτήσει του pH.



Εικόνα 22: Μεταβολές χρωμάτων των μεμβρανών CSF+20%RCE συναρτήσει του pH.



Εικόνα 23: Μεταβολές χρωμάτων των μεμβρανών CSF+5%MRI συναρτήσει του pH.

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την παρατήρηση των παραπάνω χρωματικών μεταβολών των μεμβρανών είναι τα εξής:

- Οι χρωματικές μεταβολές συναρτήσει του pH, του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου (Εικόνα 19) και των παρασκευασθέντων μεμβρανών (Εικόνες 21, 22) διαφέρουν αρκετά. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση του εκχυλίσματος στις μεμβράνες προκάλεσε εξασθένηση των χρωμάτων τους, πιθανώς λόγω της θερμικής επεξεργασίας κατά το στάδιο παρασκευής των μεμβρανών και της διαδικασίας ξήρανσης αυτών σε θάλαμο υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσία O_2), στους 40°C. Επιπλέον, στο γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλλει και η δημιουργία συμπλέγματος μεταξύ του αμύλου και των ανθοκυανινών, επομένως το έντονο χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανινών μπορεί να ατονεί κατά το σχηματισμό του τελικού πολυμερούς.
- Μεταξύ των μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο σε διαφορετικές περιεκτικότητες (10% και 20%), οι χρωματικές μεταβολές που παρατηρούνται είναι οι ίδιες και στις δύο περιπτώσεις. Η μοναδική

διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο, είναι ότι στις μεμβράνες CSF+20%RCE τα χρώματα σε διαφορετικά περιβάλλοντα pH εμφανίζονται πιο έντονα, επομένως η συγκεκριμένη αναλογία πιθανώς να είναι καταλληλότερη για εφαρμογή σε έξυπνες συσκευασίες τροφίμων.

- Οι μεμβράνες CSF+10%RCE δεν εμφανίζουν αντιληπτή χρωματική διαφορά από pH = 5 σε pH = 6 – 7, όπου επέρχεται η αλλοίωση του κιμά. Σε αυτές τις συνθήκες οι συγκεκριμένες μεμβράνες είναι άχρωμες, οπότε η οπτική χρωματική μεταβολή καθίσταται αδύνατη. Οι μεμβράνες CSF+20%RCE εμφανίζουν σχετικά πιο έντονη χρωματική διαφορά σε αυτές τις τιμές pH όπου μας ενδιαφέρουν. Συγκεκριμένα, σε pH = 5 το χρώμα της μεμβράνης CSF+20%RCE είναι ελαφρώς ροζ, ενώ σε pH = 6 – 7 μεταβαίνει σε άχρωμο - γαλάζιο).
- Οι μεμβράνες με ενσωματωμένο χημικό δείκτη CSF+5%MRI παρουσιάζουν μικρότερη διακύμανση χρωματικού εύρους, όμως την πιο αισθητή διαφορά στις τιμές pH όπου επέρχεται η αλλοίωση των κρεάτων (pH > 6,3). Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στα δείγματα κιμά κοτόπουλου που μελετήθηκαν, ώστε να γίνει άμεσα αντιληπτή η συσσώρευση πτητικών αμινών στη συσκευασία κατά την αερόβια συντήρηση. Οι συγκεκριμένες μεμβράνες παρασκευάστηκαν μόνο για τον προαναφερθέντα λόγο και όχι για την εφαρμογή τους σε πραγματικές συσκευασίες τροφίμων, λόγω της έντονης ανησυχίας για φαινόμενα μετανάστευσης χημικών ουσιών σε προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Επομένως, οι CSF+20%RCE μεμβράνες είναι προτιμότερες για χρήση ως δείκτες σε έξυπνες συσκευασίες τροφίμων και ειδικότερα σε προϊόντα κρέατος, εξαιτίας της φυσικής προέλευσης του δείκτη και της αισθητής χρωματικής τους μεταβολής στις τιμές pH που αλλοιώνεται ο κιμάς.

2.3 Μέτρηση πάχους μεμβρανών

Τα αποτελέσματα μέτρησης του πάχους των διαφορετικών μεμβρανών παρουσιάζονται στον Πίνακα 11:

Πίνακας 11: Πάχος των διαφορετικών ειδών μεμβρανών.

Είδος μεμβράνης	Πάχος (μm)
CSF	81,37 ± 9,10 ^A
CSF+10%RCE	105,12 ± 7,36 ^B
CSF+20%RCE	114,00 ± 17,41 ^B
CSF+5%MRI	101,37 ± 13,02 ^B

* A, B: Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεμβρανών ($p < 0,05$).

Τα πάχη όλων των μεμβρανών (εκφρασμένα σε μm) είναι μέσα στα επιθυμητά όρια που πρέπει να έχει μια μεμβράνη, η οποία προορίζεται για συσκευασία τροφίμων (10 – 300 μm). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 11, η μεμβράνη από άμυλο καλαμποκιού (CSF) έχει το μικρότερο πάχος συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεμβράνες, οι οποίες παρασκευάστηκαν με προσθήκη κατάλληλων όγκων φυσικού (CSF+10%RCE, CSF+20%RCE) και χημικού δείκτη (CSF+5%MRI). Συνεπώς, η προσθήκη οποιασδήποτε επιπλέον ουσίας φαίνεται να αυξάνει το πάχος της τελικής μεμβράνης κατά τρόπο ανάλογο με την περιεκτικότητά του. Επιπλέον, φαίνεται πως το πάχος των CSF μεμβρανών παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) έναντι των υπολοίπων μεμβρανών, το πάχος των οποίων είναι παραπλήσιο ($p > 0,05$).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι Prietto et al. (2017) σε μελέτη τους, παρασκεύασαν μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού με ενσωματωμένο εκχύλισμα ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο. Το πάχος της απλής μεμβράνης με άμυλο καλαμποκιού κυμάνθηκε από 102 – 112 μm, ενώ με την προσθήκη εκχυλίσματος αυξήθηκε στα 112 – 126 μm. Ακόμη, οι Ghasemlou et al. (2013) παρασκεύασαν μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού και ενσωμάτωσαν σε αυτές διάφορα αιθέρια έλαια. Το πάχος του απλού φιλμ βρέθηκε ίσο με 151 ± 4 μm ενώ με την προσθήκη των ελαίων παρατηρήθηκε αύξηση του πάχους των μεμβρανών.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με την παρούσα μελέτη καθώς και τη βιβλιογραφία, σε κάθε είδος βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών, η προσθήκη επιπλέον συστατικών, όπως εκχυλισμάτων ή αιθέριων ελαίων, επιφέρει αύξηση του πάχους των μεμβρανών.

2.4 Έλεγχος μηχανικών ιδιοτήτων μεμβρανών

Οι μηχανικές ιδιότητες αποτελούν ένα σύνολο σημαντικών παραμέτρων για τις μεμβράνες και μας πληροφορούν για την αντοχή αυτών των υλικών στην παραμόρφωση. Στον Πίνακα 12 φαίνονται οι τιμές των παραμέτρων εφελκυσμού που λήφθηκαν από το δυναμόμετρο Instron, στα διάφορα δείγματα των παρασκευασθέντων μεμβρανών.

Πίνακας 12: Τιμές των παραμέτρων εφελκυσμού των δειγμάτων μεμβρανών.

Είδος μεμβράνης	Αντοχή (kN)	Επιμήκυνση (% strain)	Παραμόρφωση (stress, MPa)	Συντελεστής Young (MPa)
CSF	$0,0089 \pm 0,0025^A$	$37,21 \pm 7,66^B$	$7,323 \pm 2,062^B$	$373,45 \pm 75,75^B$
CSF+ 10%RCE	$0,0082 \pm 0,0016^A$	$70,25 \pm 7,12^C$	$5,206 \pm 0,996^A$	$142,66 \pm 37,44^A$
CSF+ 20%RCE	$0,0097 \pm 0,0011^A$	$78,06 \pm 5,48^C$	$5,678 \pm 0,655^{A,B}$	$115,87 \pm 16,23^A$
CSF+ 5%MRI	$0,0145 \pm 0,0021^B$	$26,52 \pm 5,06^A$	$9,551 \pm 1,352^C$	$589,07 \pm 92,80^C$

* A, B, C: Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεμβρανών ($p < 0,05$).

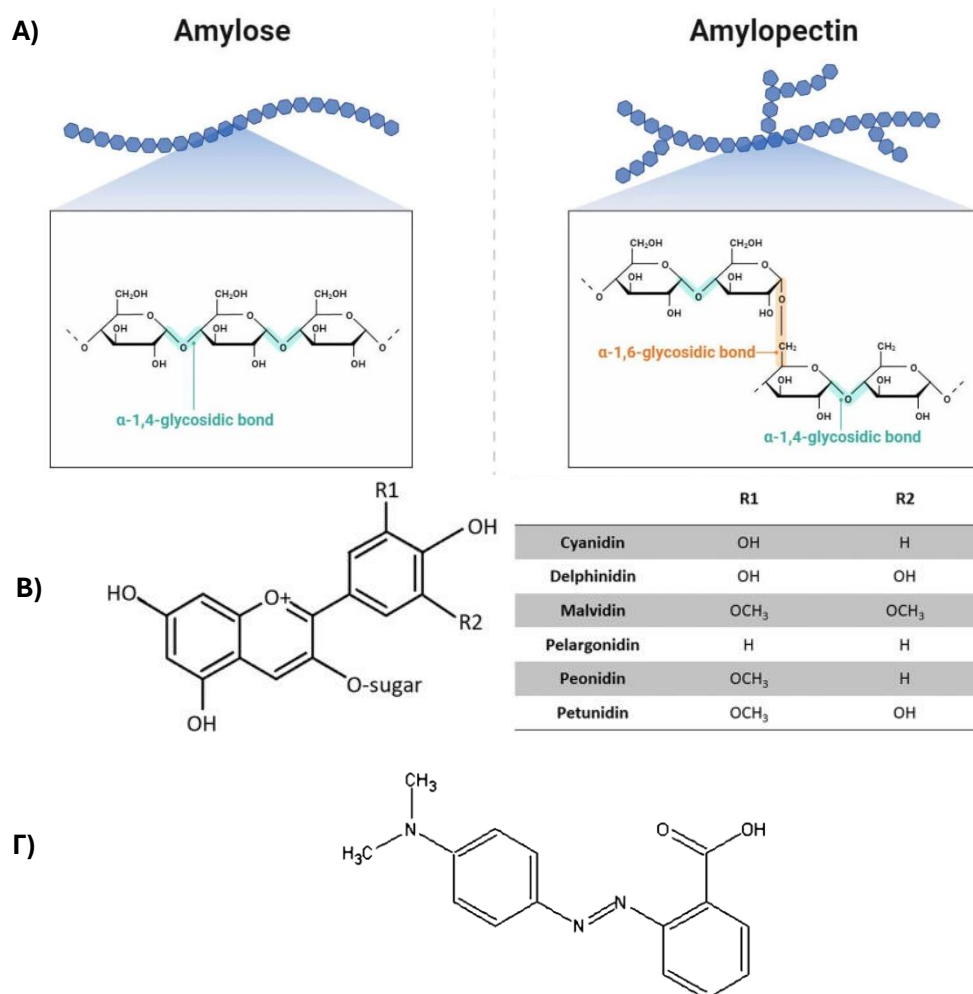
- Όσο αφορά την αντοχή του κάθε δοκιμίου, παρατηρείται παραπλήσια τιμή και στατιστικά μη σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) της ασκούμενης δύναμης για τη θραύση των δοκιμίων των απλών μεμβρανών με άμυλο καλαμποκιού (CSF) και με εκχύλισμα κόκκινου λάχανου (CSF+10%RCE, CSF+20%RCE). Αντίθετα, στη μεμβράνη CSF+5%MRI παρατηρήθηκε αυξημένη αντοχή στο όριο θραύσης, δηλαδή ασκήθηκε μεγαλύτερη δύναμη από το δυναμόμετρο έως ότου επέλθει η κατάρρευση αυτών των δοκιμίων.
- Σχετικά με την επιμήκυνση στο όριο θραύσης παρατηρούμε ότι η μεμβράνη με το χημικό δείκτη CSF+5%MRI ($26,52 \pm 5,06$ %) εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή, ενώ

ακολουθούν οι CSF ($37,21 \pm 7,66 \%$), CSF+10%RCE ($70,25 \pm 7,12 \%$) και CSF+20%RCE ($78,06 \pm 5,48\%$). Φαίνεται ότι η προσθήκη του δείκτη κόκκινο του μεθυλίου επιδρά αρνητικά στην ελαστικότητα της μεμβράνης, πιθανώς διότι η συγκεκριμένη ένωση δεν μπορεί να σχηματίσει ανθεκτικούς δεσμούς με το άμυλο καλαμποκιού. Αντίθετα, οι ανθοκυανίνες μπορούν να σχηματίσουν ευκολότερα δεσμούς H με τα μόρια γλυκόζης του αμύλου και έτσι δημιουργείται ένα ισχυρότερο και πιο συνεκτικό δίκτυο μεταξύ τους, προσδίδοντας μεγαλύτερη ελαστικότητα στη μεμβράνη. Για το λόγο αυτό οι CSF+20%RCE μεμβράνες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη επιμήκυνση, ακολουθούμενες από τις CSF+10%RCE και τέλος τις CSF.

Στην Εικόνα 24 φαίνονται οι χαρακτηριστικές χημικές δομές του αμύλου, των ανθοκυανινών και του κόκκινου του μεθυλίου. Όπως παρατηρείται οι ανθοκυανίνες έχουν περισσότερες υδροξυλικές ομάδες (-OH) που είναι ικανές να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του αμύλου, σε αντίθεση με το κόκκινο του μεθυλίου όπου διαθέτει πολύ λιγότερες δυνητικές θέσεις σχηματισμού τέτοιων διαμοριακών δυνάμεων.

- ο Η παραμόρφωση ή αλλιώς η αντοχή στον εφελκυσμό είναι μεγαλύτερη στις CSF+5%MRI μεμβράνες ($9,551 \pm 1,352$ MPa), ακολουθούμενη από τις CSF ($7,323 \pm 2,062$ MPa), CSF+20%RCE ($5,678 \pm 0,655$ MPa) και CSF+10%RCE ($5,206 \pm 0,996$ MPa) αντίστοιχα. Γενικά, υψηλότερη τιμή αντοχής στον εφελκυσμό συνεπάγεται και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ενός υλικού. Συνεπώς, η προσθήκη εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου μειώνει την αντοχή των μεμβρανών, ενώ η προσθήκη του κόκκινου του μεθυλίου καθιστά πιο ανθεκτική τη συγκεκριμένη μεμβράνη έναντι των άλλων. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι λόγω των αυξημένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αμύλου καλαμποκιού και των ανθοκυανινών, αυξάνεται η ελαστικότητα του υλικού προκαλώντας μικρότερη παραμόρφωση κατά την κατάρρευσή τους, ενώ για τη CSF+5%MRI μεμβράνη συμβαίνει το αντίθετο.
- ο Αναφορικά με το συντελεστή Young, η κατανομή των μεμβρανών ακολουθεί ακριβώς την ίδια σειρά όπως και στην παραμόρφωση. Συγκεκριμένα, τη χαμηλότερη τιμή εμφανίζουν οι περισσότερο ενισχυμένες μεμβράνες καλαμποκιού CSF+20%RCE ($115,87 \pm 16,23$ MPa), ακολουθούν οι CSF+10%RCE ($142,66 \pm$

37,44 MPa), οι CSF ($373,45 \pm 75,75$ MPa) και τέλος οι CSF+5%MRI ($589,07 \pm 92,80$ MPa). Υψηλή τιμή του συντελεστή Young φανερώνει και μεγαλύτερη ακαμψία του υλικού, ή μικρότερη ελαστικότητα. Επομένως, η CSF+5%MRI μεμβράνη είναι η πιο άκαμπτη. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η προσθήκη εκχυλίσματος ανθοκυανινών στις μεμβράνες αμύλου ενισχύουν την ελαστικότητά τους.



Εικόνα 24: Χημικές δομές του Α)αμύλου, Β)ανθοκυανινών και Γ)κόκκινο του μεθυλίου.

Συμπερασματικά, η προσθήκη εκχυλίσματος ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο βελτιστοποιεί τις μηχανικές ιδιότητες των μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού, αυξάνοντας την ελαστικότητα και μειώνοντας σημαντικά την παραμόρφωσή τους στο όριο θραύσης.

Οι Prietto et al. (2017) οι οποίοι παρασκεύασαν μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού και ενσωμάτωσαν σε αυτές εκχυλίσματα από μαύρα φασόλια (black bean) και κόκκινο λάχανο κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αντοχή στον εφελκυσμό μπορεί είτε να μειωθεί είτε να αυξηθεί ανάλογα με το είδος του προστιθέμενου εκχυλίσματος, ενώ η επιμήκυνση αυξάνεται (αν και όχι στατιστικώς σημαντικά) και στις δύο περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, για τη μεμβράνη ελέγχου η παραμόρφωση βρέθηκε ίση με $1,2 \pm 0,1$ MPa, ενώ όταν προστέθηκε εκχύλισμα φασολιού η τιμή της ελαττώθηκε στο $0,8 \pm 0,1$ MPa και αυξήθηκε στο $1,1 \pm 0,2$ MPa με το εκχύλισμα κόκκινου λάχανου. Αντίστοιχα, οι πειραματικές τιμές της % επιμήκυνσης ήταν οι εξής: $78,3 \pm 6,1$, $88,8 \pm 6,8$ και $91,0 \pm 7,1$. Επομένως, οι πειραματικές παράμετροι εφελκυσμού μπορεί να διαφέρουν αισθητά ακόμη και όταν πρόκειται για ίδιου είδους μεμβράνες, διότι μπορεί να διαφοροποιείται η ποσότητα του πλαστικοποιητή, η ποικιλία της πρώτης ύλης ή ακόμη και οι πειραματικές τεχνικές που ακολουθούνται κάθε φορά (χρόνος ξήρανσης μεμβρανών, θερμοκρασία κλπ.) (Prietto et al., 2017).

2.5 Έλεγχος του ποσοστού υγρασίας και διαλυτότητας των μεμβρανών

Γενικά, τόσο η υγρασία όσο και η διαλυτότητα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή μεμβρανών για τη συσκευασία τροφίμων, διότι ανάλογα με το εκάστοτε τρόφιμο πρέπει να γίνεται λεπτομερής έλεγχος και μελέτη εύρεσης του κατάλληλου υλικού που να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διαλυτότητα των μεμβρανών, όπου είναι επιθυμητός παράγοντας όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για ενθυλάκωση μιας ουσίας σε ένα τρόφιμο, ενώ αποτελεί μειονέκτημα όταν το τρόφιμο πρέπει να συσκευασθεί σε περιβάλλον με υψηλή σχετική υγρασία (%RH).

Το άμυλο καλαμποκιού, αποτελούμενο κυρίως από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη, έχει εκ φύσεως εξαιρετική ικανότητα να απορροφά και να συγκρατεί την υγρασία όταν έρχεται σε επαφή με κάποιο τρόφιμο πλούσιο σε αυτή. Ως εκ τούτου, δεν αποτελεί κυρίαρχη επιλογή για συσκευασία τέτοιου είδους τροφίμων, εκτός και αν τροποποιηθεί η σύνθεση της τελικής μεμβράνης με την προσθήκη υδρόφοβων ενώσεων, ώστε να μειωθεί η διαλυτότητά της (GhasemLou et al., 2013).

Το ποσοστό υγρασίας και διαλυτότητας των παρασκευασθέντων μεμβρανών φαίνεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: % υγρασία (MC) και % διαλυτότητα (WS) μεμβρανών.

Είδος μεμβράνης	MC (%)	WS (%)
CSF	10,92 ± 0,52 ^{A,B}	19,52 ± 1,51 ^{A,B}
CSF+10%RCE	11,05 ± 1,25 ^{A,B}	21,59 ± 1,03 ^B
CSF+20%RCE	12,58 ± 0,22 ^B	26,37 ± 1,18 ^C
CSF+5%MRI	9,64 ± 0,30 ^A	17,33 ± 0,65 ^A

* A, B, C; Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών συντήρησης ($p < 0,05$).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, τόσο η % υγρασία όσο και η % διαλυτότητα ακολουθούν τον ίδιο τρόπο μεταβολής. Ειδικότερα, φαίνεται ότι η προσθήκη του δείκτη κόκκινου του μεθυλίου προκαλεί μείωση της υγρασίας και της διαλυτότητας των μεμβρανών αμύλου καλαμποκιού, ενώ η προσθήκη του εκχυλίσματος ανθοκυανινών αυξάνει τους συγκεκριμένους δείκτες αναλογικά με την ενσωματωμένη ποσότητα αυτών στις μεμβράνες.

Η μεταβολή αυτή αντικατοπτρίζει και το είδος των προστιθέμενων ενώσεων κάθε φορά. Κατά την ενσωμάτωση των ανθοκυανινών μέσω του εκχυλίσματος από το κόκκινο λάχανο, αυξάνονται οι υδρόφιλες ενώσεις στο συνολικό μίγμα και επακόλουθα και τα ποσοστά υγρασίας και διαλυτότητας, με τη CSF+20%RCE μεμβράνη να εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές (%MC = 12,58 ± 0,22 και %WS = 26,37 ± 1,18). Αντίθετα, κατά την προσθήκη της λιγότερο υδρόφιλης ένωσης κόκκινο του μεθυλίου, μειώνεται η ικανότητα δέσμευσης υγρασίας και διαλυτότητας στο νερό, όπως αποδεικνύεται και από τις τιμές %MC = 9,64 ± 0,30 και %WS = 17,33 ± 0,65 των CSF+5%MRI μεμβρανών.

Οι Ghasemlou et al. (2013) σε έρευνά τους όπου παρασκεύασαν μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού και ενσωμάτωσαν αιθέρια έλαια θυμαριού και μέντας κατέληξαν σε διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα ανέφεραν ότι το ποσοστό υγρασίας και διαλυτότητας για τις απλές μεμβράνες ήταν 21,95 ± 1,69 % και 27,88 ± 2,01 % αντίστοιχα, ενώ καθώς πρόσθεταν μεγαλύτερες περιεκτικότητες από κάθε έλαιο αυτά τα ποσοστά μειώνονταν σημαντικά. Αυτή η αντίθεση με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, έχει να κάνει με το είδος της προστιθέμενης ουσίας στο αρχικό διάλυμα αμύλου καλαμποκιού. Στην περίπτωση των Ghasemlou et al. (2013)

ενσωματώθηκαν φυτικά αιθέρια έλαια, επομένως οι λιπόφιλες ενώσεις αυξήθηκαν και αυτό προκάλεσε τη μείωση του % MC και %WS.

2.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας και φαινολικού περιεχομένου των μεμβρανών

Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης και του φαινολικού περιεχομένου των παρασκευασθέντων μεμβρανών φαίνονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Αντιοξειδωτική ικανότητα και φαινολικό περιεχόμενο των μεμβρανών.

Είδος μεμβράνης	% RSA	Φαινολικό περιεχόμενο mg γαλλικού οξέος / g μεμβράνης
CSF	5,21 ± 0,37 ^B	3,68 ± 0,31 ^A
CSF+10%RCE	8,08 ± 0,24 ^C	4,36 ± 0,58 ^{A, B}
CSF+20%RCE	8,39 ± 1,21 ^C	5,66 ± 0,49 ^{B, C}
CSF+5%MRI	0,10 ± 0,01 ^A	5,83 ± 0,58 ^C

* A, B, C: Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών συντήρησης (p<0,05).

Αντιοξειδωτική δράση

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται κατά ένα σημαντικό ποσοστό στις μεμβράνες όπου ενσωματώθηκε εκχύλισμα κόκκινου λάχανου. Αυτό ήταν και το αναμενόμενο αποτέλεσμα, διότι το λάχανο συγκαταλέγεται στα τρόφιμα που είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά. Βέβαια, συγκριτικά με το καθαρό εκχύλισμα κόκκινου λάχανου, όπου η %RSA βρέθηκε ίση με 48,20 ± 3,96 (Πίνακας 10), παρατηρείται σημαντική μείωση του ποσοστού αυτού στις μεμβράνες. Η διαφορά αυτή οφείλεται πρωτίστως στο γεγονός ότι στις μεμβράνες CSF+10%RCE και CSF+20%RCE το κατά όγκο ποσοστό του εκχυλίσματος που προστέθηκε είναι μικρότερο σε σχέση με το αρχικό εκχύλισμα (100%RCE). Επιπλέον, τη μείωση αυτή πιθανώς να ενίσχυσε και η επεξεργασία στην οποία υποβλήθηκαν οι μεμβράνες μέχρι να φτάσουν στην τελική τους μορφή. Συγκεκριμένα, οι υψηλές θερμοκρασίες, η έκθεση σε αερόβιο περιβάλλον κατά την ξήρανση καθώς και στο φως για μικρά διαστήματα

έως την αποθήκευσή τους, μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση μέρους των αρχικών ανθοκυανινών, δηλαδή των χαρακτηριστικών ενώσεων που προσδίδουν τον αντιοξειδωτικό χαρακτήρα στο εκχύλισμα, μιας και ως γνωστόν αυτές είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στις παραπάνω συνθήκες. Τέλος, οι CSF+5%MRI μεμβράνες παρουσίασαν μηδαμινή αντιοξειδωτική δράση, εφόσον η πρόσθετη ουσία που χρησιμοποιήθηκε είναι ένας καθαρά χημικός δείκτης, με καμία ικανότητα αντιοξειδωσης.

Οι Cheng et al. (2022) παρασκεύασαν μεμβράνες από τροποποιημένο άμυλο και ενσωμάτωσαν εκχύλισμα κόκκινου λάχανου σε διαφορετικές περιεκτικότητες (0 – 40 %). Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν συνάδουν με όσα προαναφέρθηκαν, ότι δηλαδή όσο αυξάνονται οι ενώσεις που περιέχουν -OH ομάδες, όπως και οι ανθοκυανίνες που υπάρχουν στο εκχύλισμα, τόσο υψηλότερη είναι και η αντιοξειδωτική ικανότητα των τελικών μεμβρανών.

Οι Musso et al. (2019) ασχολήθηκαν με την παρασκευή μεμβρανών από ζελατίνη και ενσωμάτωσαν σε αυτές δύο διαφορετικά εκχυλίσματα κόκκινου λάχανου (με διαλυτή το νερό και την αιθανόλη αντίστοιχα). Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση αυτών των δύο ειδών μεμβρανών, φάνηκε ότι οι μεμβράνες στις οποίες προστέθηκε αλκοολικό εκχύλισμα ανθοκυανινών παρουσίασαν υψηλότερο %RSA συγκριτικά με αυτές που το εκχύλισμα ήταν υδατικό. Επομένως η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης είναι κυρίαρχης σημασίας για την τελική δυνητική αντιοξειδωτική ικανότητα των μεμβρανών.

Φαινολικό περιεχόμενο

Αναφορικά με το φαινολικό περιεχόμενο των μεμβρανών, παρατηρείται αύξηση αυτού στις μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού με εκχύλισμα κόκκινου λάχανου, λόγω των περιεχόμενων ανθοκυανινών που εντάσσονται στην ευρύτερη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων. Στις CSF+20%RCE μεμβράνες περιέχονται $5,66 \pm 0,49$ mg γαλλικού οξέος / g μεμβράνης, που είναι η υψηλότερη τιμή μεταξύ των απλών CSF και CSF+10%RCE μεμβρανών, προφανώς λόγω μεγαλύτερης περιεκτικότητας εκχυλίσματος στις πρώτες.

Απεναντίας, παρατηρώντας προσεκτικά την τιμή του φαινολικού περιεχομένου στις CSF+5%MRI μεμβράνες, προέκυψε το εξής παράδοξο, ότι η συνολική περιεκτικότητα αυτών είναι $5,83 \pm 0,58$ mg γαλλικού οξέος / g μεμβράνης και η μεγαλύτερη μεταξύ όλων των άλλων τιμών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μέθοδος Folin – Ciocalteu

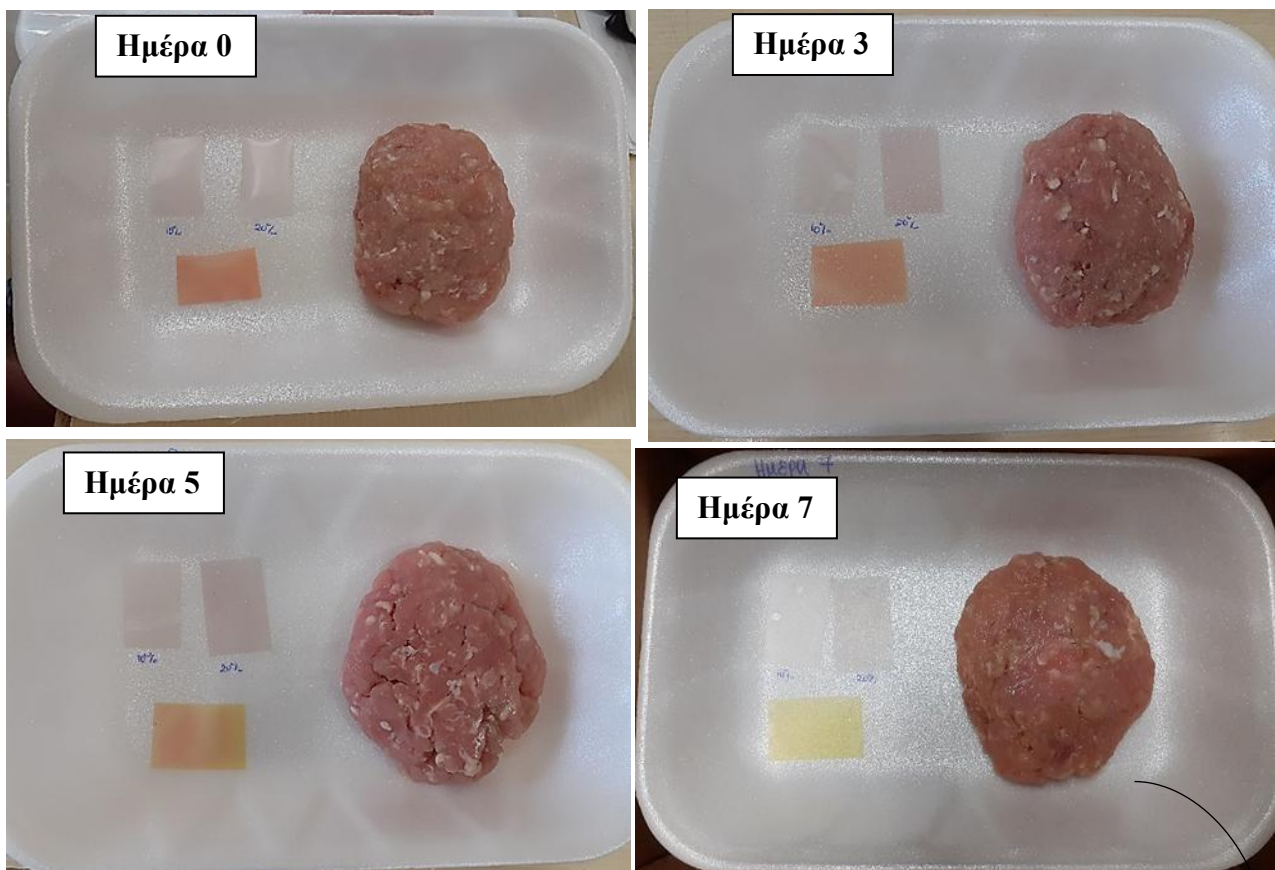
δεν είναι εκλεκτική ως προς τα φαινολικά συστατικά αλλά προσδιορίζει και τις πρωτεΐνες, που περιέχουν στο μόριό τους φαινολική υδροξυλομάδα, όπως και τα σάκχαρα, τα νουκλεϊκά οξέα, τις αρωματικές αμίνες, ενώσεις όπως η βενζαλδεΐδη, το αμινοβενζοϊκό οξύ και η γλυκίνη, οι οποίες αντιδρούν επίσης με το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Η χημική δομή του κόκκινου του μεθυλίου προσομοιάζει σε ένα διαζωνιακό άλας του αμινοβενζοϊκού οξέος, επομένως αυτή η αυξημένη τιμή στο φαινολικό περιεχόμενο των συγκεκριμένων μεμβρανών πιθανώς να εμφανίζεται λόγω συν προσδιορισμού των συγκεκριμένων ενώσεων. Ακόμη, το κόκκινο του μεθυλίου, όντας καθαρά χημική ένωση δεν επηρεάζεται στον ίδιο βαθμό από τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται κατά τη σύνθεση των μεμβρανών όπως οι ανθοκυανίνες του εκχυλίσματος, οπότε θα μπορούσε και η φύση της ένωσης να ευθύνεται για την υψηλότερη τιμή που καταγράφηκε στα αποτελέσματα του Πίνακα 14.

Οι Ribeiro Sanches et al. (2021) παρασκεύασαν μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού με ορό γάλακτος και εκχύλισμα από κόκκινο λάχανο σε διαφορετικές μεταξύ τους αναλογίες και μελέτησαν το φαινολικό τους περιεχόμενο. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως όσο μεγαλύτερο ήταν το ποσοστό του εκχυλίσματος (30 – 70 %) τόσο υψηλότερες ήταν και οι τιμές του φαινολικού περιεχομένου των μεμβρανών, οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 3,23 και 20,55 mg γαλλικού οξέος / g μεμβράνης.

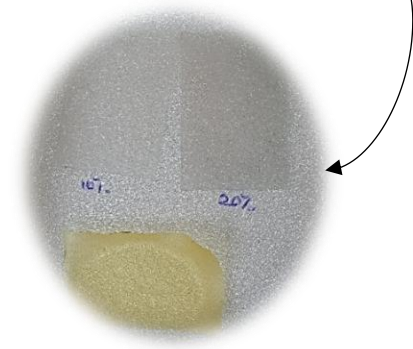
3. ΜΕΛΕΤΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ ΚΙΜΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ

3.1 Οπτικός έλεγχος μεταβολής του χρώματος των μεμβρανών κατά τις ημέρες συντήρησης

Οι χρωματικές μεταβολές των τριών ειδών μεμβρανών (CSF+10%RCE, CSF+20%RCE και CSF+5%MRI) που τοποθετήθηκαν αριστερά της συσκευασίας ως δείκτες ποιότητας του κιμά κοτόπουλου κατά τη συντήρησή του στους $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$, φαίνονται στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25: Μεταβολή χρωμάτων των μεμβρανών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης του κιμά κοτόπουλου.



Μετά από παρατήρηση των χρωματικών μεταβολών των μεμβρανών που φαίνεται στις παραπάνω εικόνες εξάγουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Κατά την ημέρα δειγματοληψίας (ημέρα 0), καθώς και την 3^η ημέρα συντήρησης του κιμά κοτόπουλο, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στο χρώμα των μεμβρανών. Συγκεκριμένα, οι δύο μεμβράνες (CSF+10%RCE, CSF+20%RCE) με εκχύλισμα κόκκινου λάχανου είχαν ροζ χρώμα, ενώ η CSF+5%MRI κόκκινο χρώμα.
- Κατά την 5^η ημέρα παρατηρήθηκε εμφανής αλλαγή μόνο στη CSF+5%MRI μεμβράνη, το χρώμα της οποίας στο δεξί άκρο της άρχισε να εμφανίζει κίτρινη χροιά.
- Την 7^η ημέρα συντήρησης παρατηρήθηκε χρωματική μεταβολή και στις 3 μεμβράνες. Η CSF+10%RCE μεμβράνη αποχρωματίστηκε, ενώ το χρώμα της CSF+20%RCE εμφάνισε μια άτονη γαλάζια χροιά. Στην Εικόνα 26 φαίνεται σαν να αποχρωματίστηκαν και οι δύο μεμβράνες με το ενσωματωμένο εκχύλισμα. Το χρώμα της CSF+5%MRI μεμβράνης μεταβλήθηκε εξ ολοκλήρου σε κίτρινο.

Όλες αυτές οι χρωματικές μεταβολές δίνουν μια πρώτη εκτίμηση για την ημέρα που ξεκίνησε η αλλοίωση του κιμά κοτόπουλου. Η αλλοίωση του κρέατος συνάδει με τη συσσώρευση πτητικών ενώσεων αζώτου και την επακόλουθη αύξηση του pH στο περιβάλλον συσκευασίας. Αυτή η χημική μεταβολή γίνεται αισθητή με την αλλαγή του χρώματος των μεμβρανών που δρουν σαν δείκτες. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η αλλοίωση του κιμά επήλθε μεταξύ της 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας συντήρησης, πιθανώς κατά την 6^η ημέρα.

Από τις παρακάτω χημικές αναλύσεις θα εξακριβωθεί εάν η χρωματική μεταβολή των μεμβρανών είναι αξιόπιστη και εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης σε έξυπνες συσκευασίες τροφίμων, δίχως να παραπλανά τον καταναλωτή με αναληθείς ενδείξεις.

3.2 Μικροβιολογική ανάλυση

Ανάλογα με το είδος του κρέατος και το μικροβιακό επιτρεπτό φορτίο του ώστε να καθίσταται κατάλληλο για βρώση από τους καταναλωτές, υπάρχουν συγκεκριμένες προδιαγραφές καθορισμένες τόσο από την Ευρωπαϊκή Ένωση όσο και από αρμόδιους φορείς όπως το Γενικό Χημείο του Κράτους (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών), οι οποίες πρέπει να τηρούνται ώστε κάποιο προϊόν να μπορεί να κυκλοφορήσει στην καταναλωτική αλυσίδα. Γενικά, ο κιμάς έχει αποδειχθεί ότι φέρει υψηλότερο μικροβιακό φορτίο (10-100 φορές) σε σχέση με τα τεμάχια κρέατος λόγω της μεγαλύτερης διαθέσιμης επιφάνειας για την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών που είναι και οι κύριοι υπεύθυνοι της αλλοίωσης του προϊόντος στις χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του κιμά σε λίπος αυξάνεται και το μικροβιακό του φορτίο, ενώ σημαντική πηγή μόλυνσης με κολοβακτηριοειδή, εντερόκοκκους, σταφυλόκοκκους και μικρόκοκκους, αποτελούν και τα μηχανήματα κοπής του κιμά.

Η εξέλιξη ανάπτυξης των μελετηθέντων μικροοργανισμών σε δείγματα κιμά κοτόπουλου φαίνεται τόσο στον Πίνακα 15, όσο και στο Διάγραμμα 4.

➤ Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ. ή TVC):

Ως ολική μεσόφιλη χλωρίδα ορίζεται ο πληθυσμός των αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες με τη χρήση μη εκλεκτικού υποστρώματος, σε ορισμένη θερμοκρασία και χρόνο επώασης. Γενικά η OMX δεν αφορά τη μέτρηση καθαρά παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι για να προσδιοριστούν χρειάζονται εκλεκτικό υπόστρωμα, αν και υπάρχει η πιθανότητα μέσα στον ολικό πληθυσμό της να υπάρχουν και κάποια παθογόνα βακτήρια, τα οποία όμως δεν μπορούν να διακριθούν από τις υπόλοιπες αποικίες. Σκοπός της καταμέτρησης των αποικιών της Ο.Μ.Χ. είναι η συνολική εκτίμηση της κατάστασης υγιεινής τροφίμων και ποτών, του σταδίου αλλοίωσης αυτών ή/και ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας διαφόρων μεθόδων συντήρησης τροφίμων (παστερίωση, χλωρίωση κλπ.).

Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, τα αποδεκτά όρια καταμετρηθέντων αποικιών Ο.Μ.Χ. σε δείγματα κιμά (οποιοδήποτε είδους κρέατος) είναι 5,70 – 6,70 log cfu/g, ενώ το ανώτατο αποδεκτό όριο είναι οι 7,00 log cfu/g.

Πίνακας 15: Μεταβολή των αναπτυχθέντων μικροοργανισμών (log cfu/g) του κιμά συναρτήσει των ημερών συντήρησης.

Ημέρα	0	3	5	7
Ο.Μ.Χ. (log cfu/g)	5,59 ± 0,01 ^A	6,82 ± 0,01 ^B	6,87 ± 0,03 ^B	7,82 ± 0,05 ^C
Εντεροβακτήρια (log cfu/g)	2,02 ± 0,09 ^A	3,10 ± 0,04 ^B	3,24 ± 0,07 ^B	3,81 ± 0,03 ^C
<i>B. thermosphacta</i> (log cfu/g)	5,13 ± 0,06 ^A	6,19 ± 0,12 ^B	6,20 ± 0,01 ^B	6,87 ± 0,02 ^C
Ψευδομονάδες (log cfu/g)	3,86 ± 0,07 ^A	5,05 ± 0,04 ^B	5,61 ± 0,01 ^C	6,65 ± 0,05 ^D
<i>LAB</i> (log cfu/g)	2,57 ± 0,06 ^A	2,64 ± 0,02 ^A	3,04 ± 0,01 ^B	3,38 ± 0,03 ^C
Ζυμομύκητες (log cfu/g)	3,34 ± 0,12 ^A	3,87 ± 0,03 ^B	4,43 ± 0,05 ^C	5,18 ± 0,06 ^D

* A, B, C, D: Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε σειρά υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών συντήρησης (p<0,05).

Ο αρχικός πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. στον κιμά κοτόπουλου, δηλαδή την ημέρα 0 όπου ο κιμάς μεταφέρθηκε από το εργοστάσιο στο εργαστήριο, ήταν 5,59 ± 0,01 log cfu/g. Η τιμή αυτή βρίσκεται κάτω από το κατώτατο όριο της Ε.Ε για τον κιμά οπότε το δείγμα θεωρείται φρέσκο και κατάλληλο για κατανάλωση. Σε διάφορες άλλες έρευνες που μελετήθηκε ο κιμάς κοτόπουλο, ο αρχικός πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. βρέθηκε χαμηλότερος. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Balamatsia et al. (2007) και Chouliara et al. (2007), ο αρχικός πληθυσμός σε Ο.Μ.Χ. ήταν 4,9 log cfu/g και 4,28 ± 0,35 log cfu/g αντίστοιχα. Αυτή η σημαντική απόκλιση μεταξύ των καταμετρηθέντων αποικιών Ο.Μ.Χ. πιθανώς να οφείλεται σε διαφορές μεταξύ της πρώτης ύλης, καθώς και του τρόπου εκτροφής και σφαγής του κοτόπουλου. Όπως αναμένεται, με την πάροδο των ημερών συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες, το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων

αυξήθηκε. Συγκεκριμένα, την 3^η και την 5^η ημέρα συντήρησης παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού της O.M.X. (από $6,82 \pm 0,01 \log \text{ cfu/g}$ σε $6,87 \pm 0,03 \log \text{ cfu/g}$), όχι όμως σε τέτοιο ποσοστό ώστε να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$). Την 7^η ημέρα, ξεπεράστηκε κατά πολύ το ανώτατο επιτρεπτό όριο των $7 \log \text{ cfu/g}$, επομένως συμπεραίνουμε πως η αλλοίωση του δείγματος επήλθε μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας συντήρησης.

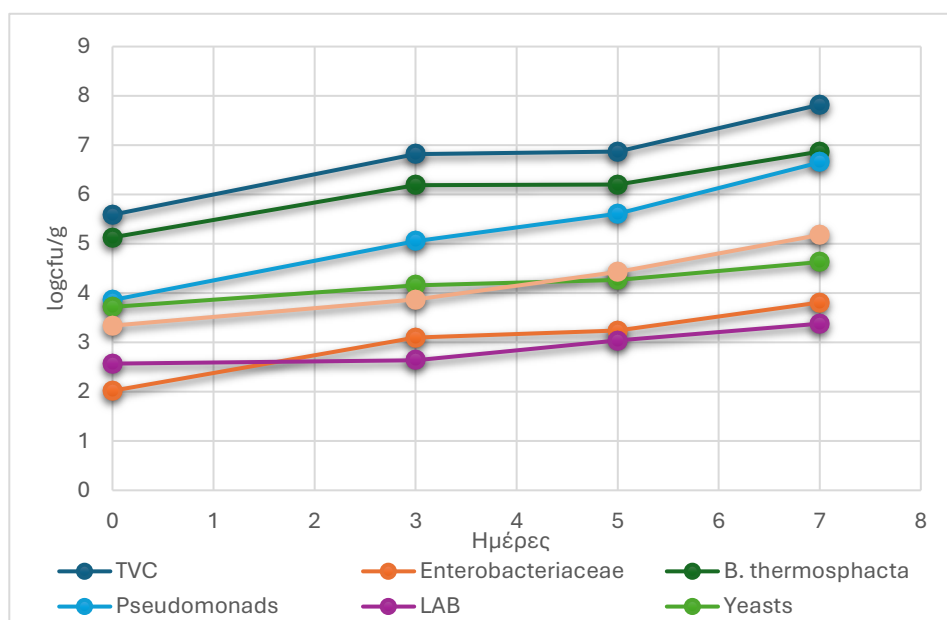
➤ Εντεροβακτηριοειδή (*Enterobacteriaceae*)

Τα εντεροβακτηριοειδή είναι οικογένεια αερόβιων ή προαιρετικά αναερόβιων Gram – αρνητικών βακτηρίων. Η ανάπτυξή τους σε αερόβιο περιβάλλον είναι εύκολη, ενώ σε αναερόβιο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των ζυμώσιμων σακχάρων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται και τα γένη *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. Τα εντεροβακτήρια διακρίνονται σε κολοβακτηριοειδή (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp.) που ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγουν αέριο και οξύ και μη κολοβακτηριοειδή (*Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp.) που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη. Τα εντεροβακτήρια χρησιμοποιούνται ως δείκτης υγιεινής στη διαδικασία παραγωγής των διαφόρων προϊόντων κρέατος (Assanti et al., 2021).

Σύμφωνα με τις συστάσεις του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (National Institutes of Health, NIH), ένας γενικός κανόνας που αφορά τα τρόφιμα είναι πως όταν ο αριθμός των αποικιών των εντεροβακτηρίων ξεπερνά τους $4 \log \text{ cfu/g}$ είναι αδιαμφισβήτητα ακατάλληλα για κατανάλωση. Ειδικότερα, εστιάζοντας στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005, τα αποδεκτά όρια καταμετρηθέντων αποικιών εντεροβακτηρίων σε σφάγια βοοειδών, προβάτων, αιγών και αλόγων είναι $1,5 - 2,5 \log \text{ cfu/cm}^2$ ενώ σε σφάγια χοίρων $2,0 - 3,0 \log \text{ cfu/cm}^2$. Για δείγματα κιμά (οποιοδήποτε είδους κρέατος) στο συγκεκριμένο κανονισμό αναφέρονται επιτρεπτά όρια για το γένος *Escherichia* και συγκεκριμένα για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. Coli*, τα οποία κυμαίνονται μεταξύ $1,70$ και $2,70 \log \text{ cfu/g}$. Επιπλέον, για τον κιμά κοτόπουλο η νομοθεσία είναι πιο αυστηρή λόγω της ευαίσθητης φύσης του προϊόντος και της πιθανότερης μόλυνσής του, με μέγιστο όριο των εντεροβακτηρίων τα $2 \log \text{ cfu/g}$. (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005; Kokkinakis et al, 2020; Lister & Barrow, 2008).

Αναφορικά με το κρέας που προέρχεται από κοτόπουλο, τα σημαντικότερα γένη παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να το προσβάλλουν είναι τα *Escherichia* και *Salmonella*. Ακολουθώς, εάν τέτοιου είδους μολυσμένο κρέας κυκλοφορήσει στην αγορά και καταναλωθεί από τους ανθρώπους, μπορεί να τους προκαλέσει διάφορες τροφογενείς ασθένειες όπως σαλμονέλλωση, γαστρεντερίτιδα, τυφοειδή πυρετό, κεφαλαλγία κ.α. (Lister & Barrow, 2008).

Την ημέρα 0 ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων που καταμετρήθηκε ήταν ίσος με $2,02 \pm 0,09 \log \text{cfu/g}$, γεγονός που καταδεικνύει την καλή κατάσταση του νωπού κρέατος. Άλλοι ερευνητές ανέφεραν αρχικούς πληθυσμούς ίσους με $2,27 \log \text{cfu/g}$ (Assanti et al., 2021), $2,3 \log \text{cfu/g}$ (Chouliara et al., 2007) και $2,23 \log \text{cfu/g}$ (Tsafrakidou et al., 2021), μετρήσεις πολύ κοντινές στις πειραματικές. Κατά την πάροδο των ημερών συντήρησης αυξάνονταν και ο αριθμός των αποικιών, με διαφορετικό βέβαια ρυθμό. Μεταξύ της 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας συντήρησης υπήρξε στατιστικά μη σημαντική ($p>0,05$) μικροβιακή αύξηση, ενώ κατά την 7^η ημέρα ο πληθυσμός των αποικιών ($3,81 \pm 0,03 \log \text{cfu/g}$) προσέγγισε το ανώτατο επιτρεπτό όριο σύμφωνα με τον ΝΙΗ, ενώ ξεπέρασε το μέγιστο όριο της ΕΕ για προϊόντα κρέατος όπως του κιμά. Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω η αλλοίωση του δείγματος επήλθε μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας αερόβιας συντήρησης βάσει των επιτρεπτών ορίων για τα εντεροβακτήρια.



Διάγραμμα 2: Μεταβολή των αναπτυχθέντων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου που είναι αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες.

➤ *Brochothrix thermosphacta*

Το γένος *Brochothrix* είναι το δεύτερο γένος της οικογένειας *Listeriaceae* και αποτελείται από δύο είδη, το *Brochothrix thermosphacta* και το *Brochothrix campestris*, εκ των οποίων το πρώτο είναι αυτό που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση του κρέατος, είτε υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες. Πρόκειται για ένα Gram – θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που χαρακτηρίζεται ως ο κύριος μικροοργανισμός αλλοίωσης σε προϊόντα κρέατος και ψαριών που συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP), λόγω της αντοχής του σε συνθήκες χαμηλού pH, χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι. Απουσία οξυγόνου ο *Brochothrix thermosphacta* παράγει ως τελικά μεταβολικά προϊόντα, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, καθώς επίσης και οξικό και μυρμηκικό οξύ. Υπό αποθήκευση σε αερόβιες συνθήκες παράγονται γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη, διακετύλιο, ακετοΐνη, 2-3-βουτανοδιόλη, ισοβουτυρικό οξύ, ισοβαλερικό οξύ και 2-μεθυλοβουτυρικό οξύ. Οι δυσάρεστες οσμές και η έντονη αλλοίωση προκύπτει κυρίως παρουσία οξυγόνου, είτε λόγω κακής εφαρμογής κενού ή MAP (Assanti et al., 2021; Stanborough et al., 2016).

Ο αρχικός πληθυσμός του *Brochothrix thermosphacta* στον κιμά κοτόπουλο ήταν $5,13 \pm 0,06 \log \text{cfu/g}$. Άλλες μελέτες έδειξαν πως ο αρχικές αποικίες του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε δείγματα κιμά κοτόπουλου ήταν $2,55 \log \text{cfu/g}$ (Balamatsia et al., 2007), $2,8 \log \text{cfu/g}$ (Patsias et al., 2006) και $1,47 \log \text{cfu/g}$ (Assanti et al., 2021), τιμές πολύ μικρότερες από τις πειραματικές. Αυτή η απόκλιση πιθανώς να οφείλεται σε συντήρηση του προϊόντος υπό υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου ή υπό κακές συνθήκες MAP. Μεταξύ 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των καταμετρηθέντων αποικιών ($6,19 \pm 0,12 \log \text{cfu/g}$ και $6,20 \pm 0,01 \log \text{cfu/g}$ αντίστοιχα, $p > 0,05$), ενώ κατά την 7^η ημέρα ο πληθυσμός των μικροοργανισμών έφτασε στη μέγιστη τιμή των $6,87 \pm 0,02 \log \text{cfu/g}$. Σύμφωνα με δεδομένα των προηγούμενων μελετών, κατά την 6^η και 7^η ημέρα συντήρησης οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν μεταξύ 6 – $6,40 \log \text{cfu/g}$, γεγονός που καταδεικνύει πως παρόλο που ο αρχικός πληθυσμός αποικιών (ημέρα 0) του *Brochothrix thermosphacta* ήταν υψηλός, δεν επηρεάστηκε η μετέπειτα ανάπτυξη του υπό αερόβιες συνθήκες, αφού οι πειραματικές και οι βιβλιογραφικές τιμές είναι πολύ κοντά. Συνεπώς, η ανάπτυξη του *Brochothrix thermosphacta* είχε ξεκινήσει πριν ανοιχθούν οι συσκευασίες των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου (Assanti et al., 2021; Balamatsia et al., 2007; Patsias et al., 2006).

➤ Ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*)

Οι ψευδομονάδες είναι μια κατηγορία ψυχρότροφων, Gram – αρνητικών, αερόβιων μικροοργανισμών που προσβάλλουν τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, όπως το κόκκινο κρέας, τα πουλερικά, τα ψάρια και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Είναι ευαίσθητες στο CO₂, επομένως η αναστολή της ανάπτυξής τους μπορεί να επιτευχθεί με εφαρμογή συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP), αντί αερόβιας. Τα είδη που απαρτίζουν το γένος των ψευδομονάδων είναι τα *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis*, *Pseudomonas syringae* και *Pseudomonas chichorii*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε αλλοιωμένα προϊόντα κρέατος που αποθηκεύονται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλή θερμοκρασία, κυριαρχούν τα είδη *P. fragi*, *P. lundensis* και *P. fluorescens*. Οι ψευδομονάδες αρχικά καταβολίζουν τη γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και τέλος τις αζωτούχες ενώσεις προκειμένου να αναπτυχθούν, αποδίδοντας δυσάρεστη οσμή και σχηματίζοντας βλέννα στην επιφάνεια του κρέατος (Raposo et al., 2016).

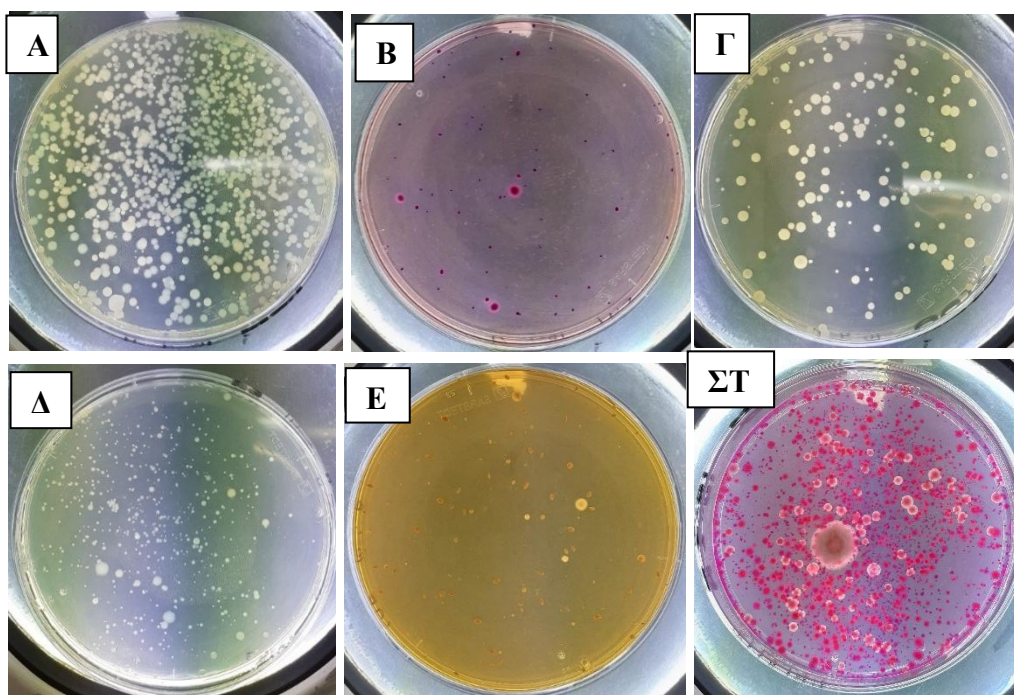
Ο αρχικός πληθυσμός των ψευδομονάδων στον κιμά κοτόπουλο, βρέθηκε ίσος με $3,86 \pm 0,07 \log \text{ cfu/g}$ και καταγράφηκε αυξητική τάση με σημαντική στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, την 3^η και 5^η ημέρα ο μικροβιακός πληθυσμός έφτασε τα $5,05 \pm 0,04 \log \text{ cfu/g}$ και $5,61 \pm 0,01 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα, ενώ ακόμη και την 7^η ημέρα δεν ξεπέρασε το ανώτερο όριο των $7 \log \text{ cfu/g}$ αλλά το πλησίασε αρκετά ($6,65 \pm 0,05 \log \text{ cfu/g}$). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με άλλες μικροβιακές μελέτες σε δείγματα κιμά κοτόπουλου. Η Chouliara et al. (2007) ανέφεραν ότι την ημέρα δειγματοληψίας οι καταμετρηθέντες αποικίες ήταν ίσες με $3,38 \pm 0,18 \log \text{ cfu/g}$ και την 6^η ημέρα $6,28 \pm 0,50 \log \text{ cfu/g}$, ενώ οι Balamatsia et al. (2007) κατέγραψαν ως αρχικό πληθυσμό ψευδομονάδων $4,2 \log \text{ cfu/g}$, ενώ την 7^η ημέρα είχε ξεπεραστεί οριακά το όριο των $7 \log \text{ cfu/g}$.

➤ Οξυγαλακτικά Βακτήρια (*Lactic Acid Bacteria, LAB*)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μια ομάδα προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών που περιλαμβάνει τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* και *Oenococcus*. Συνήθως τα LAB θεωρούνται ασφαλείς μικροοργανισμοί και

χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ζυμωμένων τροφίμων, δρώντας και ως φυσικά συντηρητικά αυτών, ενώ προάγουν και την ανθρώπινη υγεία όταν εφαρμόζονται ως προβιοτικά. Όμως υπάρχουν κάποια είδη των γενών *Streptococcus* και *Enterococcus* τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των παθογόνων *LAB* (Carneiro et al., 2024). Ταξινομούνται σε ομοζυμωτικά (*Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*) και ετεροζυμωτικά (*Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Carnobacterium spp.*) γαλακτικά βακτήρια με βάση τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και τα προϊόντα ζύμωσης. Τα ομοζυμωτικά *LAB* παράγουν σχεδόν κατά αποκλειστικότητα γαλακτικό οξύ προσδίδοντας στο τρόφιμο ευχάριστη οσμή, ενώ τα ετεροζυμωτικά *LAB* παράγουν κατά το μεταβολισμό τους ανεπιθύμητους καταβολίτες με δυσάρεστη οσμή, όπως CO₂, αιθανόλη, ακετοΐνη, οξικό και βουτανοϊκό οξύ, ενώ συμβάλλουν στο σχηματισμό βλέννας και στη μεταβολή του χρώματος στην επιφάνεια του κρέατος. Γενικά τα *LAB* χαρακτηρίζονται ως σημαντικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί του κρέατος που αναπτύσσονται τόσο υπό αερόβια συσκευασία, όσο και υπό συνθήκες κενού ή MAP, προσδίδοντας στο τρόφιμο όξινες γεύσεις, οσμές βουτύρου και αλλοιωμένη υφή λόγω των μεταβολικών διεργασιών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Iulietto et al., 2015).

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζεται η εξέλιξη των *LAB* κατά τη διάρκεια αερόβιας συντήρησης των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, μεταξύ της ημέρας δειγματοληψίας και της 3^{ης} ημέρας δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση των καταμετρηθέντων αποικιών ($2,57 \pm 0,06 \log \text{ cfu/g}$ και $2,64 \pm 0,02 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα), ενώ η μέγιστη τιμή τους ήταν $3,38 \pm 0,03 \log \text{ cfu/g}$ και καταγράφηκε την 7^η ημέρα. Οι Balamatsia et al. (2006) ανέφεραν πως σε δείγματα φιλέτου κοτόπουλου οι αποικίες των γαλακτικών βακτηρίων την ημέρα 0 ήταν $2,73 \pm 0,28 \log \text{ cfu/g}$, ενώ την 8^η ημέρα ήταν $3,85 \pm 0,61 \log \text{ cfu/g}$, ενώ οι αντίστοιχες τιμές των Patsias et al. (2006) ήταν $2,7 \pm 0,3 \log \text{ cfu/g}$ (ημέρα 0) και $4,3 \pm 0,2 \log \text{ cfu/g}$ (ημέρα 8). Αυτές οι βιβλιογραφικές τιμές έρχονται σε συμφωνία με τις πειραματικές αν λάβουμε υπόψιν πως στην παρούσα εργασία η δειγματοληψία τερματίστηκε την 7^η και όχι την 8^η ημέρα, επομένως οι τελικές τιμές ήταν αναμενόμενο να είναι ελαφρώς χαμηλότερες. Φαίνεται ακόμη ότι σε αντίθεση με τους άλλους μικροοργανισμούς τα *LAB* δεν παρουσίασαν σημαντική ανάπτυξη κατά τη διάρκεια των ημερών συντήρησης (μέγιστη τιμή $3,38 \pm 0,03 \log \text{ cfu/g}$), πιθανώς διότι όντας προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, που σημαίνει ότι αναπτύσσονται αποτελεσματικότερα απουσία οξυγόνου, η επαφή τους με το οξυγόνο να έδρασε ανασταλτικά στον ταχύ πολλαπλασιασμό τους.



Εικόνα 26: Μορφολογία των αποικιών, Α) OMX, Β) Εντεροβακτήρια, Γ) *B. thermosphacta*, Δ) Ψευδομονάδες, Ε) Γαλακτικά βακτήρια, ΣΤ) Ζύμες - Μύκητες.

➤ Ζυμομύκητες

Οι ζύμες είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί, επομένως παρουσία οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση στην επιφάνεια των κρεάτων και των πουλερικών. Γενικά οι ζύμες είναι πιο ανθεκτικές από διάφορα άλλα βακτήρια, υπό συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού και pH, υψηλής αλατότητας, καθώς και χαμηλής θερμοκρασίας συντήρησης. Ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται με αργό ρυθμό, γι' αυτό συνήθως σε δείγματα κρέατος η αλλοίωση επέρχεται πρωτίστως από τα βακτήρια. Οι πιο γνωστοί ζυμομύκητες που μολύνουν τα προϊόντα κρέατος είναι των γενών *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Sporotrichium* και *Thamnidium* (Boekhout & Robert, 2003).

Όπως συνέβη και στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, έτσι και οι ζυμομύκητες παρουσιάζουν αυξητική τάση των καταμετρηθέντων αποικιών τους κατά τις ημέρες συντήρησης του κιμά κοτόπουλου. Συγκεκριμένα, ο αρχικός πληθυσμός αυτών (ημέρα 0) ήταν $3,34 \pm 0,12 \log \text{ cfu/g}$ ενώ η μέγιστη τιμή $5,18 \pm 0,06 \log \text{ cfu/g}$ καταγράφηκε την 7^η ημέρα. Οι τιμές αυτές έρχονται σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων ερευνητών. Οι Chouliara et al. (2007) ανέφεραν χαμηλότερη αρχική τιμή ζυμομυκήτων ($<2 \log \text{ cfu/g}$ την ημέρα 0) ενώ την 6^η ημέρα οι σχηματισθέντες αποικίες πλησίασαν

τους $4,3 \pm 0,3 \log \text{ cfu/g}$. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Balamatsia et al. (2006) όπου ανέφεραν αρχικό αριθμό ζυμομυκήτων σε φιλέτο κοτόπουλο, ίσο με $2,8 \log \text{ cfu/g}$ ενώ το όριο των $7 \log \text{ cfu/g}$ ξεπεράστηκε μετά την 11^η ημέρα συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες.

Επομένως λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και το γεγονός ότι ακόμη και για έναν μικροοργανισμό να έχει καταγραφεί αριθμός αποικιών που υπερβαίνει το ανώτατο όριο, το τρόφιμο καθίσταται ακατάλληλο για κατανάλωση, συμπεραίνουμε πως η συνολική αλλοίωση των δειγμάτων κιμά κοτόπουλο επήλθε μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας συντήρησης, γεγονός που καταδεικνύεται και από τις χρωματικές μεταβολές των μεμβρανών (Εικόνα 25).

3.3 Φυσικοχημικές αναλύσεις

3.3.1 pH

Το pH είναι μια από τις βασικές ενδείξεις ανάπτυξης μικροοργανισμών και αλλοίωσης ενός δείγματος κρέατος, λόγω των μεταβολικών ουσιών που παράγονται κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων. Ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών, μπορούν να σχηματιστούν διάφορα οξέα ή βάσεις, που με τη σειρά τους μειώνουν ή αυξάνουν την τιμή του pH.

Συγκεκριμένα, στο κρέας ένας από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται είναι ο *Brochothrix thermosphacta*, ο οποίος καταναλώνει γλυκόζη, διάφορα αμινοξέα και ενώσεις αζώτου για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του και παράγει ως προϊόντα αλλοίωσης οξικό οξύ, ακετοΐνη και αλκοόλες προκαλώντας μείωση του pH. Ακόμη ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μικροοργανισμών που δρα με τον ίδιο τρόπο μειώνοντας το pH μέσω των μεταβολιτών του, είναι τα γαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria) που παράγουν γαλακτικό οξύ. Προς την αντίθετη κατεύθυνση, αυτή της αύξησης του pH, δρουν τα εντεροβακτήρια

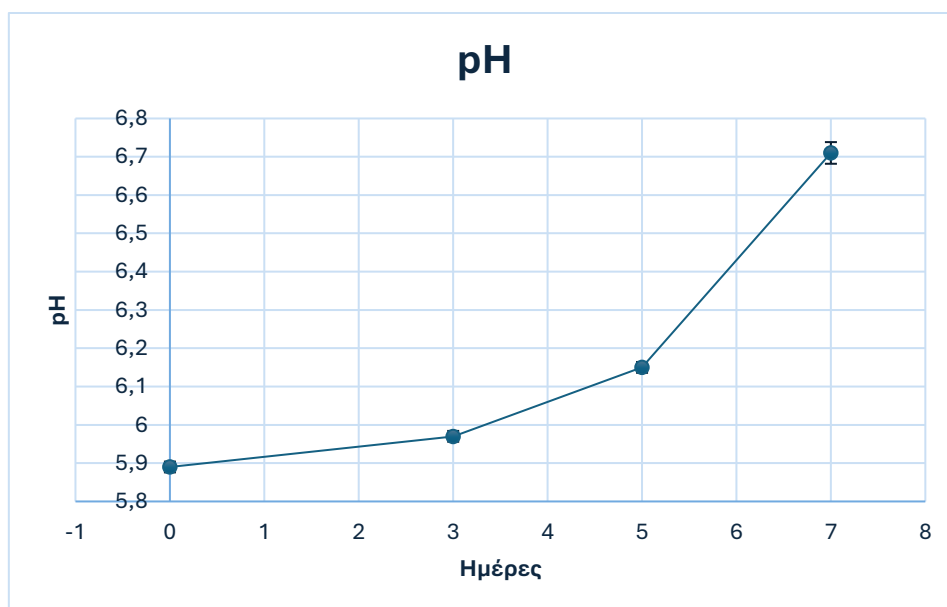
(*Enterobacteriaceae*) και οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas*) που παράγουν βιογενείς αμίνες ως προϊόντα αλλοίωσης (Bekhit et al., 2021).

Η μεταβολή του pH των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου συναρτήσει των ημερών συντήρησης παρουσιάζεται στον Πίνακα 16 και το Διάγραμμα 2.

Πίνακας 16: Μεταβολή του pH του κιμά κοτόπουλου συναρτήσει των ημερών συντήρησης.

Ημέρα	pH
0	5,89 ± 0,02 ^A
3	5,97 ± 0,01 ^B
5	6,15 ± 0,01 ^C
7	6,71 ± 0,03 ^D

* A, B, C, D: Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών συντήρησης ($p < 0,05$).



Διάγραμμα 3: Μεταβολή pH κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου που είναι αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες.

Η αρχική τιμή του pH ήταν $5,89 \pm 0,02$ η οποία βρίσκεται μέσα στο εύρος των φυσιολογικών τιμών (5,7 – 6,1) για φρέσκο, νωπό κρέας κοτόπουλο (Beauclercq et al.,

2022; Hertanto et al., 2018), ενώ η τελική τιμή έφτασε $6,71 \pm 0,03$. Παρατηρείται ότι μέχρι τις 3 πρώτες ημέρες ο κιμάς θεωρούνταν φρέσκος, ενώ την 5^η ημέρα υπήρξε μια οριακή αύξηση pH πάνω από τη θεωρητικά ανώτατη φυσιολογική τιμή στα $6,15 \pm 0,01$, η οποία όμως μπορεί να χαρακτηριστεί ως αμελητέα. Τέλος, την 7^η ημέρα η τιμή του pH αυξήθηκε αρκετά στο $6,71 \pm 0,03$, τιμή χαρακτηριστική της αλλοίωσης του δείγματος και της προσβολής του από μικροοργανισμούς. Μεταξύ των ημερών συντήρησης, όλες οι τιμές pH παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$). Η συνεχής αύξηση του pH κατά τις ημέρες συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες συσκευασίας, πιθανώς να οφείλεται στη δράση μικροβιακών ή και ενδογενών ενζύμων, όπως η πρωτεάση και η λιπάση, οι οποίες προκαλούν σημαντική αύξηση πτητικών βάσεων (όπως της αμμωνίας ή της τριμεθυλαμίνης) κατά την παρατεταμένη αποθήκευση.

Οι Balamatsia et al. (2006, 2007) για δείγματα φιλέτου κοτόπουλου, σε δύο διαφορετικές μελέτες, ανέφεραν ως αρχική τιμή pH το 5,9 και το 6,32 αντίστοιχα. Αντίστοιχα για την ημέρα δειγματοληψίας (ημέρα 0) οι Patsias et al. (2006) κατέγραψαν την τιμή 6,25 για το pH δειγμάτων, ενώ οι Silva & Glória (2002) έκαναν μελέτες pH τόσο σε δείγματα στήθους όσο και σε μπούτι κοτόπουλου με αναφερθέντες αρχικές τιμές τις $5,72 \pm 0,09$ και $6,30 \pm 0,15$ αντίστοιχα. Επομένως όπως γίνεται φανερό η τιμή του pH ενός δείγματος κρέατος εξαρτάται από το είδος αυτού, από το μέρος του σώματός του από όπου μπορεί να έχει ληφθεί το δείγμα, τη διατροφή του, από το στρες που υπέστη κατά τη σφαγή του καθώς και τις μετέπειτα συνθήκες αποθήκευσής του.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το pH αποτελεί σημαντική παράμετρο κακής κατάστασης και αλλοίωσης ενός τροφίμου και πόσο μάλλον του κιμά κοτόπουλο που ανήκει στην ομάδα των ευπαθών τροφίμων, τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις pH των δειγμάτων επιβεβαιώνουν τόσο τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, όσο και τις χρωματικές μεταβολές των μεμβρανών που δρουν σαν δείκτες στην αερόβια συσκευασία, ότι **η αλλοίωση του κρέατος επήλθε μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας συντήρησης.**

3.3.2 Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N)

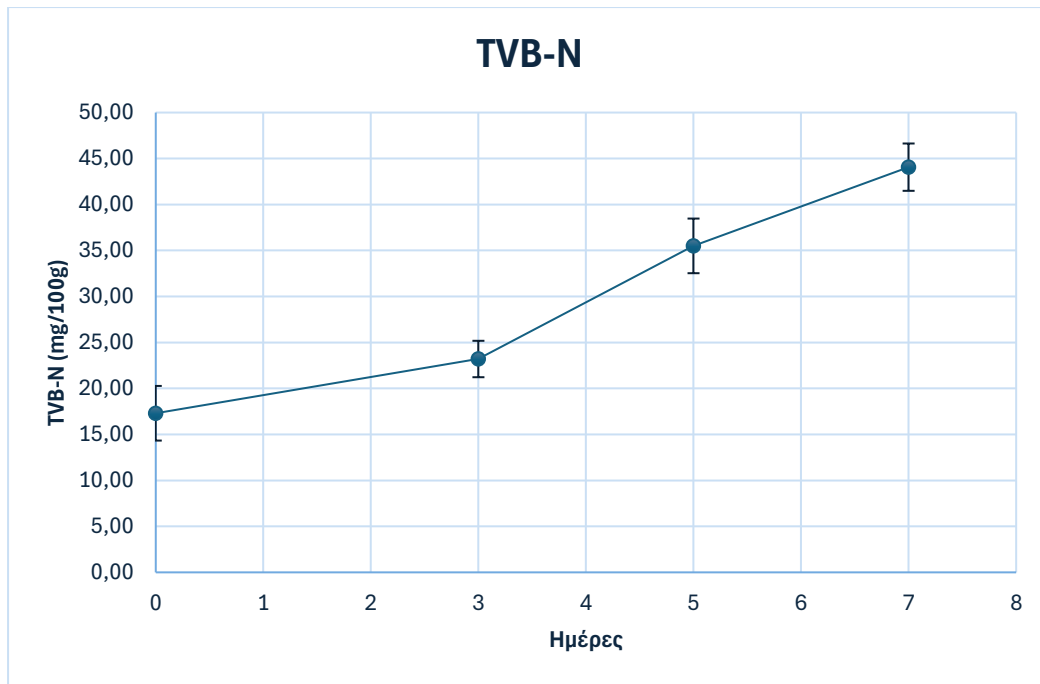
Το ολικό πτητικό άζωτο αποτελεί έναν από τους βασικούς δείκτες αλλοίωσης σε προϊόντα κρέατος, αφού μας πληροφορεί για το ρυθμό με τον οποίο αυξάνουν οι περιέχουσες ενώσεις αζώτου και επηρεάζουν με τη σειρά τους τη μεταβολή του pH, τη μικροβιακή ανάπτυξη καθώς και τις οργανοληπτικές ιδιότητες αυτού. Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, στο ολικό πτητικό άζωτο περιλαμβάνονται ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, υψηλής πτητικότητας, συμπεριλαμβανομένου της αμμωνίας (NH₃), της διμεθυλαμίνης (DMA), της τριμεθυλαμίνης (TMA) καθώς και διαφόρων βιογενών αμινών. Οι ενώσεις αυτές παράγονται είτε μέσω αμίνωσης / τρανσαμίνωσης αλδεϋδών και κετονών, είτε μέσω αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων. Ειδικότερα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία διαφορετικοί μικροοργανισμοί συμβάλλουν στην ανάπτυξη διαφόρων βιογενών αμινών. Αναφορικά με το κρέας, οι βιογενείς αμίνες που κυριαρχούν σε αυτό είναι η ισταμίνη, η τυραμίνη, η καδαβερίνη και η πουτρεσκίνη. Η ισταμίνη παράγεται κυρίως από γαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. divergens*, *L. carnis*, *L. Curvatus*, *L. hilgardii*) και τους μικροοργανισμούς *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Edwardsiella spp.* Στο σχηματισμό της τυραμίνης λαμβάνουν μέρος εντερόκοκκοι (*Enterococcus faecalis*), στρεπτόκοκκοι (*Streptococci*) και γαλακτικά βακτήρια (*L. divergens*, *L. carnis*). Επιπλέον τα εντεροβακτήρια φαίνεται ότι συμβάλλουν στην παραγωγή καδαβερίνης ενώ οι ψευδομονάδες στην πουτρεσκίνη (Silva & Glória, 2002).

Στον Πίνακα 17 και το Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η μεταβολή των TVB-N των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου συναρτήσει των ημερών συντήρησης.

Πίνακας 17: Μεταβολή του ολικού πτητικού αζώτου (TVB-N) του κιμά κοτόπουλου συναρτήσει των ημερών συντήρησης.

Ημέρα	TVB-N (mg/100g)
0	17,30 ± 2,97 ^A
3	23,20 ± 1,98 ^B
5	35,50 ± 2,97 ^C
7	44,06 ± 2,57 ^D

* A, B, C, D: Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών συντήρησης (p<0,05).



Διάγραμμα 4: Μεταβολή TVB-N κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου που είναι αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες.

Η αρχική τιμή του TVB-N του κιμά κοτόπουλου (από στήθος και μπούτι) ήταν $17,30 \pm 2,97$ mg N₂/100g, ενώ η μέγιστη ποσότητα καταγράφηκε την 7^η ημέρα συντήρησης και ήταν ίση με $44,06 \pm 2,57$ mg N₂/100g. Καθ' όλη τη διάρκεια των ημερών δειγματοληψίας υπήρχε στατιστικά σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας των πτητικών αζωτούχων ενώσεων στο δείγμα. Σύμφωνα με τη νομοθεσία το ανώτατο επιτρεπτό όριο TVB-N σε προϊόντα κοτόπουλου είναι τα 30 mg N₂/100g, τιμή που ξεπεράστηκε μεταξύ 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας συντήρησης στους 4 ± 1 °C. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται μέγιστες επιθυμητές τιμές μόνο για τεμάχια τμημάτων κοτόπουλου (στήθος, μπούτι) και όχι για τον κιμά, οπότε πιθανώς τα παραπάνω όρια να είναι λιγότερο ανεκτικά για αυτό το είδος, λόγω της εξ' αρχής μεγαλύτερης επιφάνειάς του και του κινδύνου ευκολότερης επιμόλυνσης και αλλοίωσης. Μια προτεινόμενη μέγιστη τιμή TVB-N για μπιφτέκι κοτόπουλο είναι τα 15 – 20 mg N₂/100g, ώστε να θεωρείται σίγουρα ασφαλές και φρέσκο (Assanti et al., 2021).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Silva & Glória (2002), οι οποίοι μελέτησαν τη μεταβολή των TVB-N σε στήθος και μπούτι κοτόπουλο ξεχωριστά και ανέφεραν για την ημέρα 0 τις τιμές $14,32 \pm 6,23$ mg N₂/100g και $16,80 \pm 3,63$ mg N₂/100g αντίστοιχα. Οι Balamatsia et al. (2007) κατέγραψαν ως αρχική τιμή

TVB-N σε φιλέτο κοτόπουλο, τα 20,5 mg N₂/100g και τελική τα 54,5 mg N₂/100g, ενώ οι Assanti et al. (2021) ανέφεραν αρκετά χαμηλότερες τιμές, μεταξύ αυτών τις 5,6 mg N₂/100g (ημέρα 0) και 32,2 mg N₂/100g (12^η ημέρα). Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται ότι το εύρος τόσο των αρχικών τιμών των TVB-N σε δείγματα κοτόπουλου, όσο και ο ρυθμός μεταβολής του διαφοροποιείται μεταξύ των ερευνών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο είδος του κρέατος, τις συνθήκες σφαγής και διανομής του, τις συνθήκες συσκευασίας του κλπ.

Αντιπαραβάλλοντας τα βιβλιογραφικά με τα πειραματικά δεδομένα εξάγεται το συμπέρασμα πως ο κιμάς που χρησιμοποιήθηκε είχε εξ' αρχής σχετικά υψηλά επίπεδα TVB-N (εξαιτίας των προαναφερθέντων αιτιών), τα οποία κατά την αερόβια αποθήκευση αυξήθηκαν ραγδαία, πιθανώς λόγω της συνεχόμενης ανάπτυξης μικροοργανισμών. Λαμβάνοντας υπόψιν και τις προηγούμενες αναλύσεις (μικροβιολογικές και φυσικοχημικές), η αλλοίωση του δείγματος επήλθε μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας συντήρησης, παρόλο που το θεωρητικό αναφερθέν ανώτατο όριο των TVB-N ξεπεράστηκε κατά την 4^η ημέρα.

3.3.3 Ανάλυση πτητικών ενώσεων

Ένα από τα βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προτίμηση και την αποδοχή αυτών από τους καταναλωτές είναι το άρωμα. Κάθε τρόφιμο έχει το δικό του ιδιαίτερο και χαρακτηριστικό άρωμα, που το διαχωρίζει από τις υπόλοιπες τροφές. Για την ύπαρξη αυτής της οσμής είναι υπεύθυνες οι πτητικές ενώσεις που περιέχει, οι οποίες δρουν είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους. Επομένως, η απομόνωση και η ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων είναι το κυρίαρχο βήμα για τη μελέτη των αρωμάτων κάθε τροφίμου. Υπάρχουν πολλές πτητικές ενώσεις οι οποίες όμως είναι άοσμες, επομένως μέσω των αναλύσεων (SPME/GC-MS) μπορούν να ανιχνευτούν ενώσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις που να μη συνεισφέρουν στο άρωμα. Αντιθέτως, πολλές από τις σημαντικότερες αρωματικές ενώσεις μπορεί να βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο δείγμα.

Μετά τη σφαγή του ζώου και τη διάρκεια συντήρησής του, λαμβάνουν χώρα αρκετές βιοχημικές διεργασίες που οδηγούν στην παραγωγή πτητικών ενώσεων και την

ποιοτική υποβάθμιση του κρέατος. Κατά την πρωτεόλυση, τα ενδογενή ένζυμα του κρέατος διασπούν τις πρωτεΐνες σε μικρότερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία είτε διασπώνται περαιτέρω είτε μεταβολίζονται από μικροοργανισμούς, παράγοντας πτητικές ενώσεις όπως η αμμωνία ή διάφορες άλλες αμίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την οσμή της αλλοίωσης / σήψης. Κατά την οξείδωση των λιπιδίων σχηματίζονται πτητικές αλδεϋδες, κετόνες, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η οξείδωση του λινελαϊκού οξέος προς εξανάλη, η οποία ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσδίδει ταγή οσμή στο κρέας. Σε συνθήκες παρατεταμένης αποθήκευσης όπου επέρχεται μικροβιακή ανάπτυξη, διάφορα βακτήρια όπως οι ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια, μεταβολίζουν αμινοξέα και λιπαρά οξέα προς σχηματισμό σουλφιδίων, θειο-αλκοολών και οργανικών οξέων (οξικό, προπιονικό οξύ κ.ά.) που εντείνουν ακόμη περισσότερο τη δυσάρεστη οσμή του τροφίμου (Bleicher et al., 2022; Casaburi et al., 2015; Iulietto et al., 2015; Wojtasik-Kalinowska et al., 2023).

Οι κύριες κατηγορίες πτητικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα κιμά κοτόπουλου είναι οι αλκοόλες, οι αλδεϋδες, οι κετόνες και οι εστέρες. Στον Πίνακα 18 φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης αυτών κατά τη διάρκεια της αερόβιας συντήρησης των δειγμάτων, ενώ στον Πίνακα 19 το χαρακτηριστικό άρωμα που προσδίδει καθεμία από αυτές.

Πίνακας 18: Ημιοποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων (ppb) στα δείγματα κιμά κοτόπουλου κατά τις ημέρες αερόβιας συντήρησης.

		Ημέρα			
Ονομασία ένωσης		0	3	5	7
Αλκοόλες	Αιθανόλη	72,22±16,7 ^A	240,97±41,12 ^B	279,80±2,47 ^B	57,47±10,25 ^A
	1-προπανόλη	-	12,26±2,99 ^B	11,83±0,89 ^B	-
	2-μεθυλ-1-προπανόλη	-	6,22±0,28 ^A	45,08±8,76 ^B	72,43±5,67 ^C
	3-μεθυλ-1-βουτανόλη	-	123,01±4,45 ^B	294,41±5,76 ^C	402,08±9,11 ^D
	2-μεθυλ-1-βουτανόλη	-	29,03±2,85 ^B	120,70±0,83 ^C	137,83±1,53 ^D
ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ		72,22±16,7	411,49±20,78	751,82±5,42	669,81±7,46
Κετόνες	βουτανόνη	37,13±5,21 ^A	32,86±6,88 ^A	55,76±8,27 ^A	200,57±11,09 ^B
	3-υδροξυ-2-βουτανόνη	-	110,47±27,15 ^B	209,86±15,95 ^C	91,30±10,51 ^B
	Ακετόνη	-	-	70,97±6,18 ^B	84,15±5,39 ^B
	2,3-βουτανοδιόνη	-	-	49,84±6,61 ^B	39,58±0,94 ^B

	2-πεντανόνη	-	-	6,31±0,93 ^B	13,65±0,74 ^C
	ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ	37,13±5,21	143,33±14,00	392,74±10,07	429,25±8,12
Αλδεΐδες	3-μεθυλοβουτανάλη	-	34,26±3,78 ^B	28,85±0,52 ^B	24,27±6,45 ^B
	2-μεθυλοβουτανάλη	-	9,41±0,84 ^B	12,93±0,51 ^{B,C}	15,63±2,41 ^C
	ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ	-	43,67±3,87	41,78±0,73	39,90±6,89
Εστέρες	Οξικός αιθυλεστέρας	-	113,44±21,02 ^B	93,71±6,14 ^B	107,48±4,90 ^B
	Μεθυλεστέρας βουτανοϊκού οξέος	-	31,97±4,46 ^B	29,31±10,06 ^B	36,46±2,96 ^B
	Αιθυλεστέρας βουτανοϊκού οξέος	-	16,14±1,92 ^A	17,98±9,43 ^A	13,40±3,74 ^A
	ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ	-	161,55±15,25	141,00±10,67	157,34±4,84

* A, B, C, D: Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε γραμμή υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών συντήρησης (p<0,05).

Πίνακας 19: Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε κιμά κοτόπουλο και το χαρακτηριστικό τους άρωμα (PubChem, n.d.).

	Ονομασία ένωσης	Άρωμα
Αλκοόλες	Αιθανόλη	Οινόπνευμα
	1-προπανόλη	Όμοια της αιθανόλης-οινόπνευμα
	2-μεθυλ-1-προπανόλη (ισοβουτανόλη)	Γλυκιά οσμή, σε ↑συγκεντρώσεις οσμή μούχλας
	3-μεθυλ-1-βουτανόλη	Δυσάρεστη οσμή ζυμωμένου τροφίμου (ουίσκι, βύνη, καμένο)
	2-μεθυλ-1-βουτανόλη	Άρωμα ψημένου με φρουτώδη ή αλκοολική χροιά
Κετόνες	βουτανόνη	Ευχάριστη/πικάντικη οσμή που μοιάζει με μέντα ή ακετόνη
	3-υδροξυ-2-βουτανόνη (ακετοΐνη)	Οσμή βουτύρου, γιαουρτιού, νότες μέντας
	Ακετόνη	Αρωματική/έντονη οσμή, σαν μέντα
	2,3-βουτανοδιόνη (διακετύλιο)	Βουτυρώδης οσμή
	2-πεντανόνη	Αρωματική/έντονη οσμή, σαν μέντα
Αλδεΐδες	3-μεθυλοβουτανάλη	Φρουτώδεις, μήλο
	2-μεθυλοβουτανάλη	Δυσάρεστη οσμή, κακάο
Εστέρες	Οξικός αιθυλεστέρας	Φρουτώδεις, ανανάς
	Μεθυλεστέρας βουτανοϊκού οξέος	Φρουτώδεις, μήλο
	Αιθυλεστέρας βουτανοϊκού οξέος	Φρουτώδεις, ανανάς, μπανάνα

➤ Αλκοόλες

Οι κύριες μεταβολικές πορείες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αλκοολών στο κρέας είναι η πρωτεόλυση, ο μεταβολισμός διαφόρων αμινοξέων, η αναγωγή μεθυλκετονών, καθώς και η αναγωγή αλδεϋδών που προέρχονται από την οξείδωση λιπιδίων.

Στον κιμά κοτόπουλο οι αλκοόλες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι εξής: αιθανόλη, 1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη και 3-μεθυλ-1-βουτανόλη. Σε γενικές γραμμές οι συγκεντρώσεις όλων των αλκοολών παρουσίασαν αυξητική τάση κατά την πάροδο των ημερών συντήρησης, ενώ την ημέρα 0 η μοναδική αλκοόλη που ταυτοποιήθηκε ήταν η αιθανόλη. Όλες οι άλλες ενώσεις αυτής της κατηγορίας ανιχνεύτηκαν από την 3^η ημέρα και μετά. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην παροδική αλλοίωση και ανάπτυξη μικροοργανισμών στα δείγματα κιμά, οι οποίοι φαίνεται να είναι υπαίτιοι για την ανάπτυξη αλλοιογόνων πτητικών ενώσεων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αρκετοί είναι οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή αλκοολών σε προϊόντα κρέατος, με κύριους από αυτούς τα βακτήρια *Pseudomonas spp.* και *Carnobacterium spp.* Ειδικότερα, υπό αερόβιες συνθήκες, προς αυτή την κατεύθυνση παραγωγής αιθανόλης, 1-προπανόλης, 2-μεθυλ-1-προπανόλης και 2-μεθυλ-1-βουτανόλης δρουν τα βακτήρια *Pseudomonas spp.*, *Moraxella*, *L. Gasicomitatum*, *Sh. Putrefaciens*, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες (vacuum packaging) τα *B. thermosphacta*, *C. maltaromaticum*, *C. divergens*, *Cl. algidicarnis*, *Cl. putrefaciens*, *E. faecium*, *H. alvei*, *L. lactis*, *L. piscium*, *S. liquefaciens*, *Sh. Baltica*. Στην ανάπτυξη της 3-μεθυλ-1-βουτανόλης υπό αερόβιες συνθήκες συνδράμουν οι μικροοργανισμοί *Shewanella*, *S. liquefaciens*, *Br. thermosphacta*, *Pseudomonas spp.*, *P. fragi*, *C. Maltaromaticum* και απουσία οξυγόνου οι *S. Proteamaculans*, *S. liquefaciens*, *Enterococcus spp.* *C. divergens*, *Lact. lactis*, *H. Alvei*. (Casaburi et al., 2015).

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα του Πίνακα 19 με τις χαρακτηριστικές οσμές των ανιχνευθέντων ενώσεων, γίνεται αντιληπτό πως η ανάπτυξη αλκοολών στο κρέας κατά την αποθήκευσή του, του προσδίδει δυσάρεστη οσμή, που κατά κύριο λόγο προσομοιάζει στο άρωμα του αλκοόλ / οινοπνεύματος.

➤ Κετόνες

Η ανάπτυξη των κετονών στο κρέας μπορεί να προέλθει από οξείδωση λιπιδίων, από βακτηριακή αποικοδόμηση αλκανίων ή μέσω αφυδρογόνωσης δευτεροταγών αλκοολών. Οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την παραγωγή κετονών είναι οι *Pseudomonas spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Brochothrix thermosphacta* και *Enterobacteriaceae*.

Στα δείγματα κιμά κοτόπουλου οι κετόνες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι εξής: ακετόνη, 2-βουτανόνη, ακετοΐνη, διακετύλιο και 2-πεντανόνη. Οι συγκεντρώσεις των περισσότερων από αυτές τις ενώσεις παρουσίασαν αύξηση κατά την αποθήκευση, ενώ στις εξαιρέσεις (ακετόνη, διακετύλιο) όπου παρατηρήθηκε μείωση μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας, αυτή δεν χαρακτηρίστηκε ως στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$).

Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι η ακετοΐνη παράγεται κατά τον καταβολισμό της γλυκόζης από τους *Carnobacterium*, *Lactobacillus* και *B. thermosphacta* υπό αερόβιες συνθήκες και από τη μικροβιακή αποικοδόμηση του ασπαρτικού οξέος. Η ακετοΐνη χαρακτηρίζεται ως η κετόνη που παράγεται συχνότερα στο κρέας κατά την αποθήκευσή του λόγω μικροβιακής προσβολής και μαζί με το διακετύλιο είναι οι βασικότερες ενώσεις που εμπλέκονται στην ανάπτυξη βουτυρένιας οσμής στο αλλοιωμένο κρέας (Casaburi et al., 2015).

➤ Αλδεΐδες

Οι συνηθέστερες μεταβολικές πορείες μέσα από τις οποίες μπορούν να παραχθούν οι αλδεΐδες στο κρέας είναι μέσω της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων, της β-οξείδωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων είτε της αυτοοξείδωσης αυτών, καθώς και μέσω τρανσαμίνωσης διαφόρων αμινοξέων. Επιπλέον σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι αλλοιώνουν το κρέας και συμβάλλουν στο σχηματισμό αλδεϋδών, όπως οι *Pseudomonas spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Brochothrix thermosphacta* και *Enterobacteriaceae* (Bleicher et al., 2022; Casaburi et al., 2015).

Γενικά οι αλδεΐδες μακριάς ανθρακικής αλυσίδας και υψηλού βαθμού ακορεστότητας, προσδίδουν κατά κύριο λόγο λιπαρή γεύση στο αλλοιωμένο κρέας, ενώ οι αλδεΐδες βραχείας αλυσίδας χαρακτηρίζονται για τις πιο έντονες και όξινες οσμές τους. Οι πιο συχνά απαντώμενες αλδεΐδες σε προϊόντα κρέατος είναι οι εξανάλη, επτανάλη,

βενζαλδεΐδη και η 3-μεθυλοβουτανάλη, με τις δύο πρώτες να έχουν χαρακτηριστική οσμή χόρτου σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ η ύπαρξή τους σε μεγαλύτερα ποσοστά είναι υπεύθυνη για την ταγγισμένη οσμή των δειγμάτων. Η βενζαλδεΐδη προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη και έχει συσχετιστεί με την έντονη/καυστική οσμή του ελαίου αμυγδάλου, ενώ η 3-μεθυλοβουτανάλη που παράγεται από τη λευκίνη προσδίδει έντονη οσμή μήλου (Casaburi et al., 2015).

Στα δείγματα κιμά κοτόπουλου ανιχνεύθηκαν μόνο δύο αλδεΐδες, η 2-μεθυλοβουτανάλη και η 3-μεθυλοβουτανάλη, με τη συγκέντρωση της πρώτης να αυξάνεται κατά την πάροδο των ημερών συντήρησης και της δεύτερης να μειώνεται, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, επομένως η μεταβολή της συγκέντρωσης της 3-μεθυλοβουτανάλης θεωρείται αμελητέα. Και οι δύο ενώσεις ταυτοποιήθηκαν από την 3^η ημέρα και έπειτα, ενώ την ημέρα 0 δεν προϋπήρχε καμία από αυτές. Η μεταβολή των συγκεντρώσεων που προαναφέρθηκε συνάδει με τη δυσάρεστη οσμή που αποκτά το κρέας κατά την αερόβια αποθήκευση, όπου εξασθενούν οι νέστες μήλου (3-μεθυλοβουτανάλη) και υπερισχύει η ανεπιθύμητη ταγγισμένη οσμή (2-μεθυλοβουτανάλη). Βάσει προηγούμενων μελετών, τα αλλοιογόνα βακτήρια που συμβάλλουν στην παραγωγή της 2-μεθυλοβουτανάλης υπό αερόβιες συνθήκες είναι τα *Pseudomonas spp.*, *S. liquefaciens*, *B. thermosphacta*, *Sh. putrefaciens*, *Moraxella*, ενώ κάποιοι επιπλέον μικροοργανισμοί όπως οι *H. alvei*, *Enterobacter agglomerans*, *Alteromonas putrefaciens*, *Aeomonas hydrophila*, *P. fragi* δρουν αθροιστικά με τους προηγούμενους προς σχηματισμό της 3-μεθυλοβουτανάλης (Casaburi et al., 2015).

➤ Εστέρες

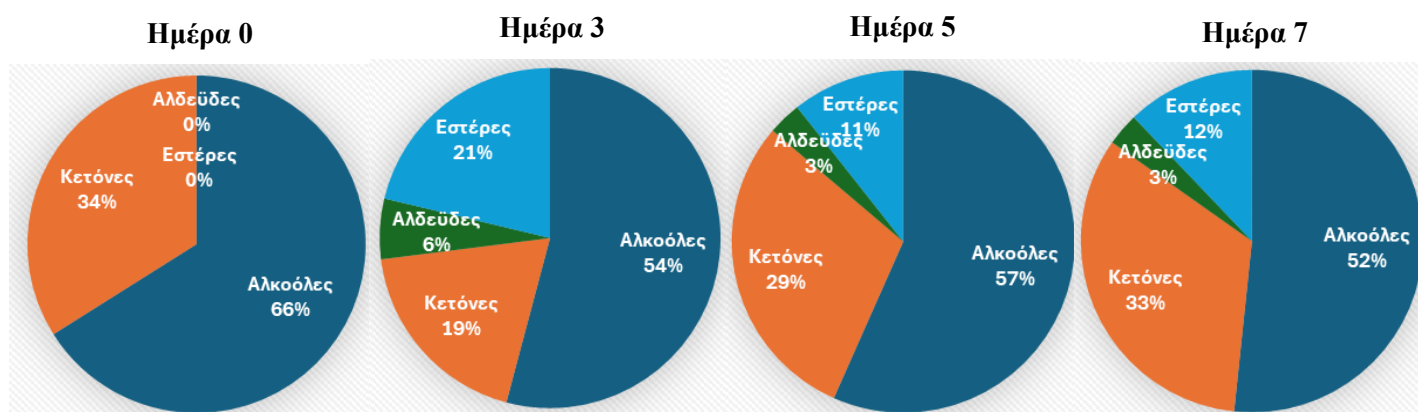
Οι εστέρες παράγονται μέσω εστεροποίησης διαφόρων αλκοολών και καρβοξυλικών οξέων που υπάρχουν στο κρέας, υπό τη δράση του ενζύμου της εστεράσης. Έρευνες έχουν δείξει πως το προτιμότερο αλκοολικό υπόστρωμα στο νωπό κρέας για την παραγωγή εστέρων είναι η αιθανόλη, γι' αυτό και η πλειονότητα των ανιχνευθέντων εστέρων είναι αιθυλεστέρες. οι πιο κοινοί εστέρες που έχουν ταυτοποιηθεί σε αλλοιωμένο κρέας είναι οι εξής: οξικός αιθυλεστέρας, βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, 3-μεθυλοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας, εξανοϊκός / οκτανοϊκός και δεκανοϊκός αιθυλεστέρας. Γενικά οι εστέρες προσδίδουν στα υποστρώματα όπου περιέχονται

ευχάριστες, γλυκιές και φρουτώδεις οσμές. Υπό την παρουσία όμως διαφόρων μικροοργανισμών, όπως οι ψευδομονάδες και ειδικότερα ο *P. fragi*, τα αρώματα αυτά μπορούν να αλλοιωθούν και να μετατραπούν σε ανεπιθύμητες έντονες φρουτώδεις οσμές (π.χ. χαλασμένων φρούτων) στο κρέας (Bleicher et al., 2022; Casaburi et al., 2015).

Στα δείγματα κιμά κοτόπουλου ανιχνεύτηκε ο οξικός αιθυλεστέρας, ο μεθυλεστέρας του βουτανοϊκού οξέος και ο αιθυλεστέρας του βουτανοϊκού οξέος. Οι συγκεντρώσεις όλων των παραπάνω ενώσεων παρουσίασαν αύξηση κατά την αποθήκευση, όχι όμως στατιστικά σημαντική μεταξύ των ημερών αυτής. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, προς την παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα παρουσία οξυγόνου συμβάλλουν μικροοργανισμοί όπως οι *P. fragi*, *Pseudomonas spp.*, *Sh. Putrefaciens*, *Moraxella*, του βουτυρικού μεθυλεστέρα ο *P. fragi* και του βουτυρικού αιθυλεστέρα οι *P. fragi*, *Pseudomonas spp.*, *B. thermosphacta*, *R. aquatilis* και *Carnobacterium spp* (Casaburi et al., 2015).

Στην Εικόνα 27 φαίνεται η επί τοις εκατό μεταβολή των τεσσάρων κατηγοριών των πτητικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα κιμά κοτόπουλου κατά την αερόβια αποθήκευσή τους στους 4 ± 1 °C για 7 ημέρες.

Την ημέρα 0 η μοναδική αλκοόλη που ανιχνεύτηκε ήταν η αιθανόλη και από κετόνες η βουτανόνη. Αναφορικά με τις αλκοόλες, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης αυτών από την ημέρα 0 προς την 3^η ημέρα, ενώ από αυτή τη μέρα και έπειτα δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή. Η μείωση αυτή πιθανώς να οφείλεται στην αντίδραση της αιθανόλης με καρβοξυλικά οξέα του κρέατος προς σχηματισμό εστέρων, το ποσοστό των οποίων φαίνεται να αυξάνεται την 3^η ημέρα.



Εικόνα 27: % μεταβολή των πτητικών ενώσεων στα δείγματα κιμά κοτόπουλου κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες.

Από την 3^η έως και την 7^η ημέρα το ποσοστό των αλκοολών κυμαίνονταν μεταξύ του 52 – 57 % των συνολικών πτητικών ενώσεων. Πιθανώς η παραγωγή των αλκοολών σε αυτό το διάστημα να οφείλεται στην πρωτεόλυση και το μεταβολισμό των αμινοξέων λόγω αύξησης του μικροβιακού φορτίου.

Αντίστοιχα, κι οι κετόνες παρουσίασαν μείωση της συγκέντρωσής τους από την ημέρα 0 προς την 3^η ημέρα, ενώ από την 3^η έως την 7^η ημέρα παρουσίασαν αυξητική τάση. Η αρχική μείωση πιθανώς να οφείλεται στην αναγωγή κάποιων κετονών προς παραγωγή β 'ταγών αλκοολών, ενώ η επακόλουθη αύξηση στην ανάπτυξη βακτηρίων όπως οι *Pseudomonas spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Brochothrix thermosphacta* και *Enterobacteriaceae*.

Οι αλδεϋδες και οι εστέρες ακολούθησαν τον ίδιο τρόπο μεταβολής της περιεκτικότητάς τους στα δείγματα του κιμά κοτόπουλου, μια αύξηση των ποσοστών τους την 3^η ημέρα και μια επακόλουθη μείωση έπειτα αυτής. Παρόλο που στην Εικόνα 29 η % μεταβολή των αλδεϋδών και των εστέρων μεταξύ 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας φαίνεται να είναι σημαντική (της τάξεως του 3% και 10% αντίστοιχα), παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 18 φαίνεται πως οι συνολικές συγκεντρώσεις αυτών κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα. Η παραγωγή αυτών των δύο ομάδων πτητικών ενώσεων οφείλεται ως επί το πλείστον στη συνεχόμενη αύξηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο κρέας, που ως μεταβολικά προϊόντα παράγουν τις συγκεκριμένες ουσίες.

Συνοψίζοντας, κατά κύριο λόγο το αρωματικό προφίλ των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου αποτελείται από τις αλκοόλες και τις κετόνες οι οποίες προσδίδουν στο κρέας δυσάρεστη / αλκοολική και βουτυρώδη οσμή αντίστοιχα, γεγονός που επαληθεύεται από την όσφρηση των δειγμάτων κατά την πάροδο των ημερών αερόβιας αποθήκευσης. Οι αλδεΐδες και οι εστέρες συνεισφέρουν λιγότερο στο τελικό προφίλ, λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων και υπερκάλυψης των αρωμάτων τους από τις δύο πρώτες κατηγορίες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ως έξυπνες συσκευασίες ορίζονται τα υλικά που έχουν την ικανότητα να παρακολουθούν την κατάσταση ποιότητας των συσκευασμένων τροφίμων με στόχο την άμεση, εύκολη και γρήγορη πληροφόρηση των καταναλωτών. Για να παραχθούν τέτοιες συσκευασίες σε βιομηχανική κλίμακα στην Ευρώπη και να κυκλοφορήσουν στην αγορά των τροφίμων πρέπει να πληρούν κάποιες βασικές προϋποθέσεις, με κυριότερη αυτή του να μην παρατηρούνται φαινόμενα μετανάστευσης από το υλικό στο τρόφιμο. Στην Αμερική, την Ιαπωνία και την Αυστραλία έχουν κυκλοφορήσει έξυπνες συσκευασίες τροφίμων με τεχνολογία δεικτών φρεσκάδας, οι οποίες όμως κατά κύριο λόγο περιέχουν χημικές και όχι φυσικές ενώσεις σαν δείκτες.

Στη συγκεκριμένη εργασία παρασκευάστηκαν μεμβράνες από άμυλο καλαμποκιού και δείκτη από κόκκινο λάχανο, πρώτες ύλες απολύτως φυσικές, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης του τροφίμου από τα υλικά της συσκευασίας του. Το άμυλο καλαμποκιού επιλέχθηκε ως υπόστρωμα λόγω της αύξησης σταθερότητας των ανθοκυανινών κατά τις αλληλεπιδράσεις τους με τους πολυσακχαρίτες. Επιπλέον παρασκευάστηκε και ένα είδος μεμβράνης αμύλου καλαμποκιού με δείκτη κόκκινο του μεθυλίου, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν μάρτυρας για το εάν ο φυσικός δείκτης είναι ευαίσθητος και ανιχνεύει τις αλλαγές και αλλοιώσεις του τροφίμου και όχι για να προταθεί ως δυνητική έξυπνη συσκευασία.

Οι παρασκευασθέντες μεμβράνες πέρα από έξυπνη θα μπορούσαν να δράσουν και ως ενεργή συσκευασία, λόγω της αντιοξειδωτικής ικανότητας που έχουν οι ανθοκυανίνες του εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου. Προς αυτή την κατεύθυνση έγιναν οι αρχικές πειραματικές δοκιμές μελέτης και χαρακτηρισμού των μεμβρανών, ως προς τις μηχανικές ιδιότητές τους, την αντιοξειδωτική τους δράση και τον προσδιορισμό υγρασίας και διαλυτότητας αυτών. Βάση αυτών των πειραμάτων εξήχθησαν τα συμπεράσματα, πως η προσθήκη εκχυλίσματος στις μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού βελτιώνει τις μηχανικές τους ιδιότητες, ενώ αυξάνει την αντιοξειδωτική τους δράση και τα ποσοστά υγρασίας και διαλυτότητας των φιλμ, σε βαθμό ανάλογο με το ποσοστό του εκχυλίσματος.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν μελέτες για το εάν οι μεμβράνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φιλμ επικάλυψης του κρέατος. Συγκεκριμένα, τα μπιφτέκια

νωπού κιμά κοτόπουλου επικαλύφθηκαν και στις δύο πλευρές τους από κυκλικές μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού ενισχυμένες με εκχύλισμα κόκκινου λάχανου (CSF+10%RCE, CSF+20%RCE). Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών έδειξαν πως οι συγκεκριμένες μεμβράνες δεν είναι κατάλληλες για να επικαλύψουν κάποιο τρόφιμο όπως το κρέας λόγω της υψηλής περιεκτικότητας αυτού σε νερό και της ικανότητας του αμύλου να προσροφά την υγρασία. Από την 3^η κιόλας ημέρα συντήρησης ο κιμάς είχε αποβάλλει την υγρασία του, η οποία δεσμεύτηκε από τις μεμβράνες με αποτέλεσμα να χάσει τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά, να αλλάξει χρώμα και να ξεραθεί. Επομένως οι μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού, είτε είναι εμπλουτισμένες με εκχύλισμα ανθοκυανινών είτε όχι, δεν είναι κατάλληλες για επικάλυψη τροφίμων υψηλής περιεκτικότητας σε υγρασία, δηλαδή δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενεργές συσκευασίες. Η χρήση τους αυτή, μπορεί να επιτευχθεί με παρασκευή ενός σύνθετου εδώδιμου υλικού συσκευασίας (υδροκολλοειδή και λιπίδια), ώστε να μειωθεί η προσροφητική ικανότητα των μεμβρανών. Επιπλέον, η επικάλυψη του κιμά με CSF+RCE μεμβράνες πιθανώς να μην ήταν αποδεκτή και από το καταναλωτικό κοινό διότι καλύπτει εντελώς το τρόφιμο και λόγω του ήδη υπάρχοντος χρώματος των φιλμ να δίνει την αντίθετη εντύπωση απόκρυψης της κατάστασης ποιότητας του τροφίμου. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε οι μεμβράνες δεικτών να τοποθετηθούν δίπλα από το μπιφτέκι κοτόπουλου, ώστε να ελεγχθεί εάν μπορούν να ανιχνεύσουν την αλλοίωση μέσω χρωματικής μεταβολής.

Ο έλεγχος των μεμβρανών ως έξυπνη συσκευασία με τη λειτουργία δεικτών φρεσκάδας πραγματοποιήθηκε μέσω οπτικής παρατήρησης της μεταβολής των χρωμάτων των δεικτών και μέσω φυσικοχημικής και μικροβιολογικής ανάλυσης των δειγμάτων κιμά κοτόπουλου. Οι CSF+10%RCE και CSF+20%RCE μεμβράνες αποχρωματίστηκαν την 7^η ημέρα (ροζ → άχρωμο), ενώ ο μάρτυρας CSF+5%MRI έδειξε μία μικρή χρωματική αλλαγή από κόκκινο σε πορτοκαλί την 5^η ημέρα στο δεξί του άκρο, ενώ την 7^η ημέρα είχε μεταβεί εξ ολοκλήρου σε κίτρινο χρώμα, γεγονός που υποδεικνύει την αλλοίωση του δείγματος, τη συσσώρευση πτητικών ενώσεων αζώτου και την αύξηση του pH. Τόσο οι φυσικοχημικές όσο και οι μικροβιολογικές μελέτες έδειξαν πως η αλλοίωση του δείγματος επήλθε μεταξύ 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας, με τα επίπεδα του pH, των TVB-N και των μικροοργανισμών να υπερβαίνουν τα αποδεκτά όρια την 7^η ημέρα, συνεπώς η πιθανότερη ημέρα αλλοίωσης προσδιορίστηκε ως η 6^η. Ακόμη η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από το σύνολο των πτητικών ενώσεων και τη μεταβολή των

συγκεντρώσεών τους κατά τις ημέρες της αερόβιας αποθήκευσης. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήξαμε και κατά την παρατήρηση της χρωματικής μεταβολής των μεμβρανών. Επομένως οι μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού με δείκτη κόκκινου λάχανου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες σε έξυπνες συσκευασίες προϊόντων κρέατος, εφόσον ανιχνεύουν τη συσσώρευση πτητικών ενώσεων αζώτου που παράγονται κυρίως από μικροβιακή προσβολή του δείγματος και μεταβάλλουν το χρώμα τους όταν επέρχεται αλλοίωση αυτού.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι οι μεμβράνες αμύλου καλαμποκιού με ενσωματωμένο δείκτη από κόκκινο λάχανο, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενεργή συσκευασία χωρίς να υποβληθούν σε περαιτέρω τροποποιήσεις, λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την υγρασία του τροφίμου, ενώ η ανταπόκρισή τους ως δείκτες φρεσκάδας είναι υψηλή. Οι ανθοκυανίνες του κόκκινου λάχανου συγκριτικά με το δείκτη κόκκινο του μεθυλίου εμφάνισαν χαμηλότερη ευαισθησία ανίχνευσης των πτητικών αζωτούχων ενώσεων, όπως ήταν και αναμενόμενο λόγω της εκ φύσεως ευκολότερης αποικοδόμησής τους υπό την επίδραση του οξυγόνου, του φωτός, της θερμοκρασίας κλπ. Παρόλα αυτά το χρώμα των CSF+RCE μεμβρανών μεταβλήθηκε την ημέρα όπου επήλθε αλλοίωση σύμφωνα με όλες τις υπόλοιπες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Συνεπώς η χρήση τους σε έξυπνες συσκευασίες βασισμένες σε φυσικά προϊόντα μπορεί να εφαρμοστεί.

Ως μελλοντικές προκλήσεις επί του θέματος, ώστε να εισχωρήσουν τέτοιου είδους συσκευασίες στην τροφική αλυσίδα, μπορούν να αναφερθούν:

- η εύρεση κάποιας εδώδιμης μεμβράνης που να μην απορροφά τόση υγρασία από το τρόφιμο αλλά να προσδίδει σταθερότητα στις ανθοκυανίνες,
- η εύρεση κάποιας νέας σύνθεσης όπου να αυξάνει την ευαισθησία των ανθοκυανινών ως δείκτες και να τις προστατεύει από την άμεση αποικοδόμησή τους,
- ο έλεγχος διατήρησης των ιδιοτήτων των μεμβρανών και της λειτουργίας τους να αλλάζουν χρώμα, υπό συνθήκες μαζικής παραγωγής και αποθήκευσης των τροφίμων, καθώς και
- η μελέτη της δράσης των μεμβρανών σε διαφορετικού είδους τρόφιμα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abedi-Firoozjah, R., Yousefi, S., Heydari, M., Seyedfatehi, F., Jafarzadeh, S., Mohammadi, R., Rouhi, M., & Garavand, F. (2022). Application of Red Cabbage Anthocyanins as pH-Sensitive Pigments in Smart Food Packaging and Sensors. *Polymers*, 14(8), Article 8.
<https://doi.org/10.3390/polym14081629>
- Ademoyegun, O. T., Akin-Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., & Adewuyi, G. O. (2013). Phenolic Contents and Free Radical Scavenging Activity in Some Leafy Vegetables. *International Journal of Vegetable Science*, 19(2), 126–137.
<https://doi.org/10.1080/19315260.2012.677943>
- Amrita Poonia. (2017). Antimicrobial Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. In *ResearchGate*.
https://www.researchgate.net/publication/324692568_Antimicrobial_Edible_Films_and_Coatings_for_Fruits_and_Vegetables
- Assanti, E., Karabagias, V. K., Karabagias, I. K., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2021). Shelf life evaluation of fresh chicken burgers based on the combination of chitosan dip and vacuum packaging under refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*, 58(3), 870–883.
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04601-4>
- Balamatsia, C. C., Patsias, A., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2007). Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere-packaged chicken fillets: Correlation with microbiological and sensory attributes. *Food Chemistry*, 104(4), 1622–1628.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.013>
- Balamatsia, C. C., Rogga, K., Badeka, A., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2006). Effect of Low-Dose Radiation on Microbiological, Chemical, and Sensory Characteristics of Chicken Meat Stored Aerobically at 4°C. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1126–1133. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.5.1126>
- Beauclercq, S., Mignon-Grasteau, S., Petit, A., Berger, Q., Lefèvre, A., Métayer-Coustard, S., Tesseraud, S., Emond, P., Berri, C., & Le Bihan-Duval, E. (2022). A Divergent Selection on Breast Meat Ultimate pH, a Key Factor for Chicken Meat Quality, is Associated With Different Circulating Lipid Profiles.

- Frontiers in Physiology*, 13, 935868.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.935868>
- Bekhit, A. E.-D. A., Giteru, S. G., Holman, B. W. B., & Hopkins, D. L. (2021). Total volatile basic nitrogen and trimethylamine in muscle foods: Potential formation pathways and effects on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3620–3666.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12764>
- Bekhit, A. E.-D. A., Holman, B. W. B., Giteru, S. G., & Hopkins, D. L. (2021). Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 280–302.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.006>
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., & Bekhit, A. E.-D. A. (2018). Role of calpain system in meat tenderness: A review. *Food Science and Human Wellness*, 7(3), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.08.002>
- Bleicher, J., Ebner, E. E., & Bak, K. H. (2022). Formation and Analysis of Volatile and Odor Compounds in Meat—A Review. *Molecules*, 27(19), Article 19.
<https://doi.org/10.3390/molecules27196703>
- Boekhout, T., & Robert, V. (2003). *Yeasts in Food*. Elsevier.
- Carneiro, K. O., Campos, G. Z., Scafuro Lima, J. M., Rocha, R. da S., Vaz-Velho, M., & Todorov, S. D. (2024). The Role of Lactic Acid Bacteria in Meat Products, Not Just as Starter Cultures. *Foods*, 13(19), Article 19.
<https://doi.org/10.3390/foods13193170>
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., & Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45, 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002>
- Cheng, M., Yan, X., Cui, Y., Han, M., Wang, Y., Wang, J., Zhang, R., & Wang, X. (2022). Characterization and Release Kinetics Study of Active Packaging Films Based on Modified Starch and Red Cabbage Anthocyanin Extract. *Polymers*, 14(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/polym14061214>
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology*, 24(6), 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.12.005>

- Chun, O. K., Smith, N., Sakagawa, A., & Lee, C. Y. (2004). Antioxidant properties of raw and processed cabbages. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(3), 191–199. <https://doi.org/10.1080/09637480410001725148>
- Dehghani, S., Hosseini, S. V., & Regenstein, J. M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry*, 240, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.034>
- Demirdöven, A., Özdoğan, K., & Erdoğan-Tokatlı, K. (2015). Extraction of Anthocyanins from Red Cabbage by Ultrasonic and Conventional Methods: Optimization and Evaluation. *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), 491–500. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12153>
- do Nascimento Alves, R., Lorrane Santos Lima, T., da Silva Chaves, K., & de Albuquerque Meireles, B. R. L. (2021). Biodegradable films with Brassica Oleracea Capitata extract as a quality indicator in sheep meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), e14997. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14997>
- Durak-Dados, A., Michalski, M., & Osek, J. (2020). Histamine and other biogenic amines in food. *Journal of Veterinary Research*, 64(2), 281–288. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0029>
- Fennema, O., Donhowe, I. G., & Kester, J. J. (1994). Lipid type and location of the relative humidity gradient influence on the barrier properties of lipids to water vapor. *Journal of Food Engineering*, 22(1), 225–239. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)90032-9)
- Freshness Index of Fish Flesh (K Value) | Shodex HPLC Columns and Standards.* (n.d.). Retrieved 25 May 2024, from <https://www.shodex.com/en/dc/02/03/12.html>
- Ghaani, M., Cozzolino, C. A., Castelli, G., & Farris, S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.008>
- Ghareaghajlou, N., Hallaj-Nezhadi, S., & Ghasempour, Z. (2021). Red cabbage anthocyanins: Stability, extraction, biological activities and applications in food systems. *Food Chemistry*, 365, 130482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130482>
- Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Shojaee-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M. J., & Khaksar, R. (2013). Physical, mechanical and barrier properties of

- corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1117–1126. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.026>
- Hammam, A. R. A. (2019). Technological, applications, and characteristics of edible films and coatings: A review. *SN Applied Sciences*, 1(6), 632. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0660-8>
- Hertanto, B. S., Nurmalasari, C. D. A., Nuhriawangsa, A. M. P., Cahyadi, M., & Kartikasari, L. R. (2018). The physical and microbiological quality of chicken meat in the different type of enterprise poultry slaughterhouse: A case study in Karanganyar District. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102(1), 012051. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012051>
- Hopkins, D., Holman, D. B., Bekhit, A. E.-D., & Giteru, D. S. (2020). *Total volatile basic nitrogen in meat products: Occurrence, method of determination and use as a freshness indicator*.
- ICMSF, Christian, J. H. B., & Roberts, T. A. (Terence A. (1986). *ICMSF Microorganisms in Foods 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications* (2nd ed.). Blackwell Scientific Publications.
- Iulietto, M. F., Sechi ,Paola, Borgogni ,Elena, & and Cenci-Goga, B. T. (2015). Meat Spoilage: A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science*, 14(3), 4011. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.4011>
- Janseerat, Kolekar, M., Reddy, C. S., Sharma, S., & Roy, S. (2024). Anthocyanin-Based Natural Color Induced Intelligent Food Packaging Sensor: A Review. *Current Food Science and Technology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s43555-024-00021-z>
- Kalpana, S., Priyadarshini, S. R., Maria Leena, M., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2019). Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.008>
- Karaca, I. M., Haskaraca, G., Ayhan, Z., & Gültekin, E. (2023). Development of real time-pH sensitive intelligent indicators for monitoring chicken breast freshness/spoilage using real packaging practices. *Food Research International*, 173, 113261. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113261>

- Kokkinakis, M. N., Fragkiadakis, G. A., Lapidakis, N. E., & Kokkinaki, A. N. (2020). Assessing microbiological quality of ready-to-eat prepacked sandwiches, in Crete, Greece. *Journal of Food Science and Technology*, 57(11), 4220–4227. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04460-z>
- Kumar, L., Ramakanth, D., Akhila, K., & Gaikwad, K. K. (2022). Edible films and coatings for food packaging applications: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 20(1), 875–900. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01339-z>
- Leja, M., Kamińska, I., & Kołton, A. (2010). Phenolic compounds as the major antioxidants in red cabbage. *Folia Horticulturae*, 22(1), 19–24. <https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0146>
- Lister, S. A., & Barrow, P. (2008). Enterobacteriaceae. *Poultry Diseases*, 110–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2862-5.50013-1>
- Lu, X., Zhang, Y., Zhu, L., Luo, X., & Hopkins, D. L. (2019). Effect of superchilled storage on shelf life and quality characteristics of *M. longissimus lumborum* from Chinese Yellow cattle. *Meat Science*, 149, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.11.014>
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 83–95. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000453>
- Ma, Q., Lu, X., Wang, W., Hubbe, M. A., Liu, Y., Mu, J., Wang, J., Sun, J., & Rojas, O. J. (2021). Recent developments in colorimetric and optical indicators stimulated by volatile base nitrogen to monitor seafood freshness. *Food Packaging and Shelf Life*, 28, 100634. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100634>
- Matloob, A., Ayub, H., Mohsin, M., Ambreen, S., Khan, F. A., Oranab, S., Rahim, M. A., Khalid, W., Nayik, G. A., Ramniwas, S., & Ercisli, S. (2023). A Review on Edible Coatings and Films: Advances, Composition, Production Methods, and Safety Concerns. *ACS Omega*, 8(32), 28932–28944. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03459>
- Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 228–237. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01051-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01051-0)
- Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A.-M. (2020). Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food

- Packaging: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 238, 116178.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>
- Müller, P., & Schmid, M. (2019). Intelligent Packaging in the Food Sector: A Brief Overview. *Foods*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods8010016>
- Musso, Y. S., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2019). Smart gelatin films prepared using red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extracts as solvent. *Food Hydrocolloids*, 89, 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.036>
- Mutwakil. (2011). Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(4), 486–510. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.486.510>
- Ojogbo, E., Ogunsona, E. O., & Mekonnen, T. H. (2020). Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials. *Materials Today Sustainability*, 7–8, 100028. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100028>
- Oladzadabbasabadi, N., Mohammadi Nafchi, A., Ghasemlou, M., Ariffin, F., Singh, Z., & Al-Hassan, A. A. (2022). Natural anthocyanins: Sources, extraction, characterization, and suitability for smart packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 100872. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100872>
- Olkku, J., & Rha, C. (1978). Gelatinisation of starch and wheat flour starch—A review. *Food Chemistry*, 3(4), 293–317. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(78\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(78)90037-7)
- Oviasogie, P. O., Okoro, D., & Ndiokwere, C. L. (2009). Determination of total phenolic amount of some edible fruits and vegetables. *African Journal of Biotechnology*, 8(12), Article 12.
<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/60894>
- Packaging is the source of 40% of the planet's plastic waste. (n.d.). Our World in Data. Retrieved 1 April 2025, from <https://ourworldindata.org/data-insights/packaging-is-the-source-of-40-of-the-planets-plastic-waste>
- Packaging Waste Facts and Statistics. (n.d.). Business Waste. Retrieved 1 April 2025, from <https://www.businesswaste.co.uk/your-waste/packaging-waste-recycling/packaging-waste-facts-and-statistics/>
- Paczkowski, S., & Schütz, S. (2011). Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 917–935.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3417-x>

- Panou, A., & Karabagias, I. K. (2023). Biodegradable Packaging Materials for Foods Preservation: Sources, Advantages, Limitations, and Future Perspectives. *Coatings*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/coatings13071176>
- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., & Nicorescu, V. (2017). Mechanisms of Oxidative Processes in Meat and Toxicity Induced by Postprandial Degradation Products: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 96–123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12241>
- Patsias, A., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2006). Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: Microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology*, 23(5), 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.08.004>
- Patsias, A., Chouliara, I., Paleologos, E. K., Savvaidis, I., & Kontominas, M. G. (2006). Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4 °C. *European Food Research and Technology*, 223(5), 683–689. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0253-9>
- Ponnampalam, E. N., Hopkins, D. L., Bruce, H., Li, D., Baldi, G., & Bekhit, A. E. (2017). Causes and Contributing Factors to “Dark Cutting” Meat: Current Trends and Future Directions: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 400–430. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12258>
- Prietto, L., Mirapalhete, T. C., Pinto, V. Z., Hoffmann, J. F., Vanier, N. L., Lim, L.-T., Guerra Dias, A. R., & da Rosa Zavareze, E. (2017). pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. *LWT*, 80, 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.006>
- PubChem. (n.d.). *PubChem*. Retrieved 14 May 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Raposo, A., Pérez, E., de Faria, C. T., Ferrús, M. A., & Carrascosa, C. (2016). Food Spoilage by *Pseudomonas* spp.—An Overview. In *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance* (pp. 41–71). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119139188.ch3>
- Ribeiro Sanches, M. A., Camelo-Silva, C., da Silva Carvalho, C., Rafael de Mello, J., Barroso, N. G., Lopes da Silva Barros, E., Silva, P. P., & Pertuzatti, P. B. (2021). Active packaging with starch, red cabbage extract and sweet whey:

- Characterization and application in meat. *LWT*, 135, 110275.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110275>
- Rowland, R. H., Ian R. (2000). Metabolic Activities of the Gut Microflora in Relation to Cancer. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(2), 179–185.
<https://doi.org/10.1080/089106000750060431>
- Schumann, B., & Schmid, M. (2018). Packaging concepts for fresh and processed meat – Recent progresses. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.005>
- Shao, P., Liu, L., Yu, J., Lin, Y., Gao, H., Chen, H., & Sun, P. (2021). An overview of intelligent freshness indicator packaging for food quality and safety monitoring. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 285–296.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.012>
- Silva, C. M. G., & Glória, M. B. A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4±1 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry*, 78(2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00404-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00404-6)
- Sun, Y., Fu, M., Li, Z., & Peng, X. (2018). Evaluation of Freshness in Determination of Volatile Organic Compounds Released from Pork by HS-SPME-GC-MS. *Food Analytical Methods*, 11(5), 1321–1329. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1109-6>
- Šuput, <div>Danijela Z., Lazić, V. L., Popović, S. Z., & Hromiš</div>, N. M. (2015). Edible films and coatings – sources, properties and application. *Food and Feed Research, Volume 42, Issue 1*(Volume 42, Issue 1), Article Volume 42, Issue 1.
- Tamsyn Stanborough Mark Tamplin, Narelle Fegan, & Shane M. Powell. (2016). *Insight into the Genome of Brochothrix thermosphacta, a Problematic Meat Spoilage Bacterium*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02786-16>
- Thottathil Nazar, M. I., George, T. S., Muhammadaly, S. A., Kanoth, B. P., George, N., Balachandrakurup, V., Chemmarickal Dominic, M. D., & Nair, A. B. (2023). Biodegradable pH sensor in packaging material using anthocyanin from banana bracts. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
<https://doi.org/10.1007/s13399-023-04294-7>
- Tsarakidou, P., Sameli, N., Bosnea, L., Chorianopoulos, N., & Samelis, J. (2021). Assessment of the spoilage microbiota in minced free-range chicken meat

- during storage at 4 C in retail modified atmosphere packages. *Food Microbiology*, 99, 103822. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103822>
- Umaraw, P., & Verma, A. K. (2017). Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1270–1279. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.986563>
- Vilela, C., Kurek, M., Hayouka, Z., Röcker, B., Yildirim, S., Antunes, M. D. C., Nilsen-Nygaard, J., Pettersen, M. K., & Freire, C. S. R. (2018). A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>
- Wang, B., Yu, B., Yuan, C., Guo, L., Liu, P., Gao, W., Li, D., Cui, B., & Abd El-Aty, A. M. (2022). An overview on plasticized biodegradable corn starch-based films: The physicochemical properties and gelatinization process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(10), 2569–2579. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1868971>
- Wang, C., Lu, Y., Li, Z., An, X., Gao, Z., & Tian, S. (2022). Preparation and Performance Characterization of a Composite Film Based on Corn Starch, κ-Carrageenan, and Ethanol Extract of Onion Skin. *Polymers*, 14(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/polym14152986>
- Wells, N., Yusufu, D., & Mills, A. (2019). Colourimetric plastic film indicator for the detection of the volatile basic nitrogen compounds associated with fish spoilage. *Talanta*, 194, 830–836. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.020>
- Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., & Topolska, J. (2013). Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, 51(1), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.015>
- Wójcik, W., Łukasiewicz, M., & Puppel, K. (2021). Biogenic amines: Formation, action and toxicity - a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2634–2640. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10928>
- Wojtasik-Kalinowska, I., Szpicer, A., Binkowska, W., Hanula, M., Marcinkowska-Lesiak, M., & Poltorak, A. (2023). Effect of Processing on Volatile Organic Compounds Formation of Meat—Review. *Applied Sciences*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/app13020705>

- Wu, D., Zhang, M., Chen, H., & Bhandari, B. (2021). Freshness monitoring technology of fish products in intelligent packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(8), 1279–1292.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1757615>
- Zhang, N., & Jing, P. (2022). Anthocyanins in Brassicaceae: Composition, stability, bioavailability, and potential health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 2205–2220.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1852170>
- Zhang, Z., Tang, H., Cai, K., Liang, R., Tong, L., & Ou, C. (2023). A Novel Indicator Based on Polyacrylamide Hydrogel and Bromocresol Green for Monitoring the Total Volatile Basic Nitrogen of Fish. *Foods*, 12(21), Article 21.
<https://doi.org/10.3390/foods12213964>
- Zhu, F. (2015). Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 122, 456–480.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.063>
- Αγγελής, Γ. (2017). *Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία*. Αθήνα: UNIBOOKS I.K.E.
- Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, 139 OJ L (2004).
<http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj/ell>
- Κανονισμός αριθ. 450/2009 της Επιτροπής, της 29ης Μαΐου 2009 , σχετικά με τα ενεργά και νοήμονα υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τρόφιμα (Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ), 135 OJ L (2009). <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/450/oj/ell>
- Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 10/2011 της Επιτροπής, της 14ης Ιανουαρίου 2011 , για τα πλαστικά υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ, 012 OJ L (2011). <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/10/oj/ell>
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2023/2006 της Επιτροπής, της 22ας Δεκεμβρίου 2006 , σχετικά με την ορθή πρακτική παραγωγής υλικών και αντικειμένων που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τρόφιμα (Κείμενο που παρουσιάζει

- ενδιαφέρον για τον EOX), 384 OJ L (2006).
<http://data.europa.eu/eli/reg/2006/2023/oj/ell>
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον EOX), 338 OJ L (2005).
<http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/ell>
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2074/2005 της Επιτροπής της 5ης Δεκεμβρίου 2005 για θέσπιση μέτρων εφαρμογής για ορισμένα προϊόντα βάσει του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και για την οργάνωση επίσημων ελέγχων βάσει των κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 854/2004 και (ΕΚ) αριθ. 882/2004, για την παρέκκλιση από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 852/2004 και για τροποποίηση των κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και (ΕΚ) αριθ. 854/2004 (Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον EOX), 338 OJ L (2005).
<http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2074/oj/ell>
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1935/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 27ης Οκτωβρίου 2004 σχετικά με τα υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα και με την κατάργηση των οδηγιών 80/590/ΕΟΚ και 89/109/ΕΟΚ, 338 OJ L (2004).
<http://data.europa.eu/eli/reg/2004/1935/oj/ell>
- Μικροβιολογία Τροφίμων Ι Ενότητα 3: Καταμέτρηση Μικροοργανισμών με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης ή επίστρωσης σε τρυβλία- Κανόνες Αρίθμησης (ή καταμέτρησης). - ppt κατέβασμα.* (n.d.). Retrieved 12 February 2025, from <https://slideplayer.gr/slide/11410302/>
- Μοδίτση, Μ. Σ. (with Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης). (2012). *Μελέτη μεμβρανών από πρωτεΐνες γάλακτος ως συστήματα μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης αντιμικροβιακών ουσιών.*
- Νόμος 2939/2001 (Κωδικοποιημένος)—ΦΕΚ Α 179/06.08.2001.* (n.d.). Retrieved 12 February 2025, from <https://www.kodiko.gr/nomothesia/document/182985/nomos-2939-2001>