

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΕΤΟΙΜΟΥ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΝΑΝΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΟΛΥΦΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ****Ε. Μάνθου, Ε. Δαγρές, Α. Λιανού\*, Π. Τσακανίκας, Ε.Ζ. Πανάγου, Γ.-Ι. Νυχάς**

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα, Ελλάδα  
(\*[alianou@aua.gr](mailto:alianou@aua.gr))

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης φρέσκου κομμένου ανανά υπό διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες με τη χρήση μη παρεμβατικών μεθόδων ανάλυσης. Φρέσκος, κομμένος και έτοιμος προς κατανάλωση ανανάς συντηρήθηκε αερόβια υπό διαφορετικές ισόθερμες συνθήκες (4, 8 και 12°C) καθώς και υπό δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ για περίπου 10 ημέρες. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, δείγματα ανανά αναλύθηκαν μικροβιολογικά, για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ζυμών (κυρίαρχη αλλοιωγόνος μικροχλωρίδα του συγκεκριμένου προϊόντος), με παράλληλη συλλογή δεδομένων φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform infrared, FTIR), καθώς και δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης (multispectral imaging, MSI). Τα φασματικά και μικροβιολογικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (partial least square regression, PLSR). Η εκπαίδευση των PLSR μοντέλων διενεργήθηκε με τα δεδομένα των ισόθερμων συνθηκών (114 δείγματα) και η αξιολόγηση/επικύρωση με τα δεδομένα του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ (41 δείγματα). Αναφορικά με την αξιολόγηση των μοντέλων, στην περίπτωση του μοντέλου το οποίο βασίστηκε στα FTIR δεδομένα, οι τιμές της κλίσης της γραμμικής παλινδρόμησης των προβλεπόμενων έναντι των μετρούμενων μικροβιολογικών τιμών, του συντελεστή συσχέτισης και της τετραγωνικής ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος ήταν 0.81, 0.68 και 0.71 αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το μοντέλο το οποίο βασίστηκε στα δεδομένα MSI ήταν 0.77, 0.83 και 0.47. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι δυο τεχνικές, και ειδικά η MSI, φαίνεται να αποτελούν υποσχόμενες προσεγγίσεις για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης φρέσκου και έτοιμου προς κατανάλωση ανανά.

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Ο ανανάς (*Ananas comosus*) είναι ένα από τα πιο δημοφιλή τροπικά φρούτα, καθώς ξεχωρίζει για το άρωμα και την ελαφρώς όξινη γεύση του. Εκτός των άλλων, η υψηλή περιεκτικότητά του σε αντιοξειδωτικά το κατατάσσει στις πρώτες θέσεις στις προτιμήσεις των καταναλωτών ως μια γευστική υγιεινή επιλογή<sup>[1-3]</sup>. Στα πλαίσια της σύγχρονης τάσης για υιοθέτηση υγιεινών διατροφικών συνηθειών και ταυτόχρονα προσαρμοσμένων στους γρήγορους ρυθμούς ζωής, η καταναλωτική ανάγκη για εύκολα στην προετοιμασία, φρέσκα/ελαφρώς επεξεργασμένα τρόφιμα ολοένα και αυξάνεται<sup>[4]</sup>.

Τα τελευταία χρόνια, η αγορά των φρέσκων, έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων έχει γνωρίσει άνθιση, με τον ανανά να συμμετέχει δυναμικά στην αγοραστική ποικιλία. Σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό IFPA (International Fresh-Cut Produce Association), ως φρέσκο κομμένο εμπόρευμα ορίζεται οποιοδήποτε φρούτο ή λαχανικό έχει υποστεί φυσική μετατροπή από την αρχική του μορφή, αλλά διατηρεί την φρεσκάδα του<sup>[1,4]</sup>. Ο χρόνος ζωής αυτών των προϊόντων είναι περιορισμένος λόγω των διάφορων μεταποιητικών διαδικασιών που ακολουθούνται (όπως πλύσιμο, κόψιμο, ξεφλούδισμα) και τραυματίζουν ή καταστρέφουν τους φυτικούς ιστούς. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η ταχεία υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών αυτών των προϊόντων, με σημαντικότερα την αύξηση του ρυθμού διαπνοής και την παραγωγή μη επιθυμητών

οσμών, την εμφάνιση μαλακής υφής και την εκχύμωση, που τελικά τα καθιστούν πιο ευπαθή στη μικροβιακή δραστηριότητα<sup>[1,3-5]</sup>.

Η επέκταση της διάρκειας ζωής φρέσκων προϊόντων φυτικής προέλευσης, με ταυτόχρονη διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειάς τους, αποτελεί μεγάλη πρόκληση για την βιομηχανία τροφίμων. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για την εκτίμηση της αλλοίωσης και του χρόνου ζωής φρέσκων φρούτων και λαχανικών με παραδοσιακές αναλυτικές μεθόδους. Παρά την αποτελεσματικότητά τους στον προσδιορισμό και χαρακτηρισμό των φαινομένων ποιοτικής υποβάθμισης διαφορετικών τροφίμων, αυτές οι τεχνικές είναι χρονοβόρες, επεμβατικές και μη αυτοματοποιημένες. Πρόσφατα, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί σε καινοτόμες, γρήγορες και μη επεμβατικές μεθόδους εκτίμησης της ποιότητας των τροφίμων, όπως οι διάφορες φασματοσκοπικές μέθοδοι αλλά και η ανάλυση δεδομένων πολυφασματικής/υπερφασματικής απεικόνισης<sup>[4]</sup>.

## ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) ως μέσα εκτίμησης της μικροβιολογικής αλλοίωσης φρέσκου κομμένου ανανά υπό διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες. Στοχεύοντας στη διακριτή συσχέτιση των φασματικών δεδομένων (δεδομένα FTIR και MSI) με τα μικροβιολογικά δεδομένα (πληθυσμός της κυρίαρχης αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας) του συγκεκριμένου προϊόντος κατά τη διάρκεια της συντήρησής του, τα βήματα της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκαν συνοψίζονται στα παρακάτω:

- i. Αερόβια συντήρηση δειγμάτων φρέσκου κομμένου ανανά υπό διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες,
- ii. Μικροβιολογικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό του πληθυσμού της κυρίαρχης αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας του προϊόντος,
- iii. Ταυτόχρονη (με τις μικροβιολογικές αναλύσεις) συλλογή FTIR φασμάτων και πολυφασματικών εικόνων, και
- iv. Ανάπτυξη και αξιολόγηση μοντέλων παλινδρόμησης για την εκτίμηση των μικροβιακών πληθυσμών από φασματικά δεδομένα.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Συντήρηση δειγμάτων

Εμπορικές συσκευασίες (πλαστικά κύπελλα) φρέσκου κομμένου και έτοιμου προς κατανάλωση ανανά σε μορφή ροδέλας συντηρήθηκαν αερόβια, υπό τρεις διαφορετικές ισόθερμες συνθήκες (4, 8 και 12°C), όπως επίσης και υπό δυναμικό (περιοδικά μεταβαλλόμενο) θερμοκρασιακό προφίλ (4°C για 8 h, 8°C για 8 h και 12°C για 8 h). Η συντήρηση του προϊόντος πραγματοποιήθηκε εντός υψηλής ακρίβειας ( $\pm 0.5$  °C) ρυθμιζόμενων επωαστικών κλιβάνων (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) για μέγιστο χρονικό διάστημα 10 ημερών. Η θερμοκρασία στους επωαστικούς κλιβάνους καταγραφόταν κατά την διάρκεια της συντήρησης με κατάλληλα ηλεκτρονικά καταγραφικά (COX TRACER®, Cox Technologies Inc., Belmont, NC, USA). Ανά 12 h τις πρώτες 5 ημέρες και ανά 24 h για το υπόλοιπο της συντήρησης, πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές αναλύσεις καθώς και συλλογή φασματικών δεδομένων.

### Μικροβιολογικές αναλύσεις

Για τον προσδιορισμό των μικροβιακών πληθυσμών στον ανανά, δείγματα μάζας 25 g μεταφέρονταν ασηπτικά σε σακούλες Stomacher (Seward Medical, London, UK) και αραιώνονταν με 225 ml διαλύματος Ringer (Lab M Limited, Lancashire, UK). Μετά την ομογενοποίηση των δειγμάτων, ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για τον προσδιορισμό του πληθυσμού της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX) καθώς των μυκήτων-ζυμών. Η OMX καταμετρήθηκε στο

γενικό εργαστηριακό υπόστρωμα tryptic glucose yeast agar (Plate Count Agar, Biolife, Milan, Italy) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 72 h, ενώ οι μύκητες-ζύμες στο επιλεκτικό υπόστρωμα Rose Bengal Chloramphenicol agar (Lab M Limited) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 5 ημέρες.

### Μετρήσεις FTIR φασματοσκοπίας

Η συλλογή των FTIR φασμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έναν κρύσταλλο ZnSe 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) (PIKE Technologies, Madison, WI, USA), και ένα FTIR-6200 JASCO φασματοφωτόμετρο (Jasco Corp., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με έναν TGS (triglycinesulphate) ανιχνευτή και έναν Ge/KBr διαχωριστή δέσμης. Τα φάσματα συλλέγονταν σε εύρος κυματαριθμών 4000–400cm<sup>-1</sup>. Τα δείγματα τεμαχίζονταν σε μικρά κομμάτια και τοποθετούνταν στον κρύσταλλο ώστε να καλύπτουν όλη την επιφάνειά του, και οι μετρήσεις των φασμάτων πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου.

### Μετρήσεις MSI

Οι πολυφασματικές εικόνες ελήφθησαν σε 18 διαφορετικά και ανομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος από το υπεριώδες έως το εγγύς υπέρυθρο (405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 and 970 nm), με το σύστημα VideometerLab<sup>[6]</sup>. Πριν την κάθε μέτρηση, λάμβανε χώρα κατάλληλη βαθμονόμηση του οργάνου (ραδιομετρική και γεωμετρική). Στη συνέχεια, το δείγμα ανανά τοποθετούνταν εντός τρυβλίου Petri, ούτως ώστε να καλύπτει όλη τη επιφάνειά του και στη συνέχεια τοποθετούνταν κάτω από την κεφαλή του οργάνου. Η κεφαλή έχει στο εσωτερικό της διόδους φωτός LED που ανάβουν διαδοχικά και μια κάμερα που συλλέγει την ανάκλαση σε κάθε μήκος κύματος. Για κάθε δείγμα προϊόντος υπολογίστηκε η μέση ανάκλαση, δηλαδή η μέση ένταση των εικονοστοιχείων για κάθε ένα από τα εξετασθέντα μήκη κύματος.

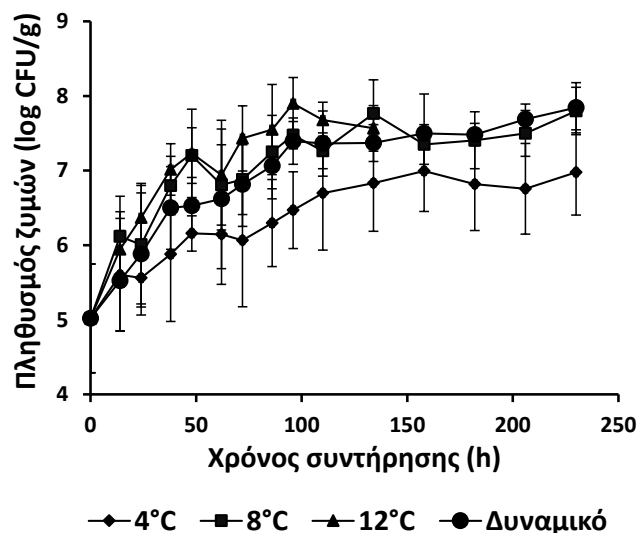
### Ανάλυση δεδομένων

Τα μικροβιολογικά και φασματικά (FTIR, MSI) δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (partial least squares regression, PLSR). Τα μοντέλα τα οποία αναπτύχθηκαν διακριτά για κάθε τύπο αναλυτικής τεχνικής αξιολογήθηκαν έναντι ανεξάρτητων δεδομένων (δεδομένα δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ), και η επίδοση τους εκτιμήθηκε με βάση τις παραμέτρους γραμμικής παλινδρόμησης των προβλεπόμενων έναντι των μετρούμενων (παρατηρούμενων) μικροβιολογικών τιμών: την κλίση (slope) και το σφάλμα (offset) της γραμμής παλινδρόμησης, το συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient,  $r$ ), και την τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (root mean square error, RMSE). Η ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων διενεργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Unscrambler<sup>®</sup> ver. 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα συντήρησης (ανταποκρινόμενα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και παρτίδες προϊόντος), και στα πλαίσια του καθενός από αυτά δύο δείγματα ανανά (προερχόμενα από διαφορετικές συσκευασίες) σε κάθε θερμοκρασία και χρονική στιγμή δειγματοληψίας χρησιμοποιούνταν στις μικροβιολογικές αναλύσεις και φασματικές μετρήσεις ( $n=6$ ).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Μικροβιολογικές αναλύσεις

Οι ζύμες φάνηκε να αποτελούν την κύρια αλλοιωγόνο μικροβιακή ομάδα στον ανανά, με τον πληθυσμό τους να συμπίπτει σχεδόν με αυτόν της ΟΜΧ (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Το αρχικό επίπεδο των ζυμών (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση,  $n=6$ ) ήταν  $5.02 \pm 0.70 \log \text{CFU/g}$ , ενώ οι τελικοί πληθυσμοί ήταν  $6.98 \pm 0.60$ ,  $7.80 \pm 0.30$ ,  $7.57 \pm 0.30$  και  $7.84 \pm 0.30 \log \text{CFU/g}$  κατά τη συντήρηση του προϊόντος στους 4, 8, 12°C και στο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ, αντίστοιχα (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1.** Πληθυσμός ζυμών σε φρέσκο κομμένο ανανά κατά τη διάρκεια αερόβιας συντήρησης υπό ισόθερμες (4, 8 και 12°C) και δυναμικές θερμοκρασιακές (8 h στους 4°C, 8 h στους 8°C, 8 h στους 12°C) συνθήκες.

### Μετρήσεις FTIR φασματοσκοπίας και MSI

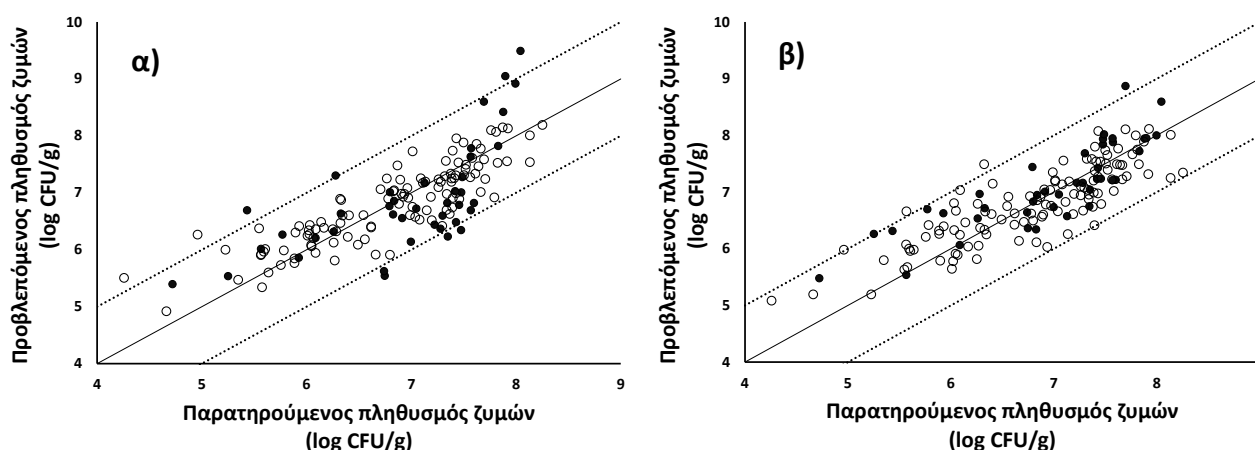
Συνολικά αναλύθηκαν 312 δείγματα για κάθε μια τεχνική. Η υψηλή παραλλακτικότητα όμως που παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο βιολογικών επαναλήψεων (δείγματα από διαφορετική συσκευασία), είχε ως αποτέλεσμα να υπολογιστούν και να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση οι μέσοι όροι των μικροβιολογικών και φασματικών τιμών για τα διπλά δείγματα κάθε πειραματικής επανάληψης. Στη συνέχεια, τα δεδομένα των ισόθερμων θερμοκρασιών ( $n=114$ ) χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση, ενώ τα δεδομένα του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ ( $n=41$ ) για την επικύρωση/πρόβλεψη των μοντέλων PLSR.

Όσον αφορά στα FTIR δεδομένα, για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε μη χρήσιμη πληροφορία/θόρυβος, διενεργήθηκε διαλογή μηκών κύματος μέσω της random forest (RF) παλινδρόμησης, με σκοπό να παραμείνουν στην ανάλυση μόνο οι μεταβλητές που είναι σχετικές με την πρόβλεψη της αλλοίωσης. Το FTIR φάσμα του ανανά αποτελείται κυρίως από κορυφές που αφορούν στο νερό ( $3356\text{ cm}^{-1}$  και  $1635\text{ cm}^{-1}$ ) και κορυφές που αποδίδονται στην απορρόφηση των σακχάρων και οργανικών οξέων ( $1120\text{--}995\text{ cm}^{-1}$ )<sup>[4]</sup>. Συνεπώς, για να αποφευχθεί η ισχυρή επίδραση της απορρόφησης του νερού στο μοντέλο (κυρίως η υψηλή απορρόφηση στα  $3356\text{ cm}^{-1}$ ), τελικά χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση το φασματικό εύρος  $900\text{--}1844\text{ cm}^{-1}$ . Μετά την εφαρμογή της PLSR, το αναπτυχθέν μοντέλο επέδειξε ικανοποιητική επίδοση. Με βάση τις παραμέτρους γραμμικής παλινδρόμησης των προβλεπόμενων από το μοντέλο μικροβιολογικών τιμών (πληθυσμός ζυμών) έναντι των παρατηρούμενων (μετρούμενων) τιμών, παρατηρήθηκε ικανοποιητική συσχέτισή τους (**Πίνακας 1**, **Σχήμα 2α**).

**Πίνακας 1.** Οι τιμές της κλίσης (slope), του σφάλματος (offset), του συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient,  $r$ ) και της τετραγωνικής ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (root mean square error, RMSE) της γραμμικής παλινδρόμησης των προβλεπόμενων έναντι των μετρούμενων μικροβιολογικών τιμών (πληθυσμοί ζυμών), για τα μοντέλα εκτίμησης της μικροβιολογικής αλλοίωσης ανανά με βάση δεδομένα FTIR και MSI.

Τύπος δεδομένων	Κλίση (slope)	Σφάλμα (offset)	$r$	RMSE
FTIR	0.81	1.26	0.68	0.71
MSI	0.77	1.73	0.83	0.47

Όσον αφορά στην ανάλυση των MSI δεδομένων, τα τελευταία μετασχηματίστηκαν με δεκαδικό λογαριθμικό μετασχηματισμό και διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline offset), ώστε να αποκτήσουν πιο συμμετρική κατανομή. Στην πράξη, για κάθε δείγμα αφαιρέθηκε από όλες τις μεταβλητές η τιμή του χαμηλότερου σημείου στο φάσμα. Συνολικά, το μοντέλο πρόβλεψης το οποίο βασίστηκε σε MSI δεδομένα επέδειξε καλύτερη επίδοση στην εκτίμηση του πληθυσμού των ζυμών σε δείγματα ανανά σε σύγκριση με το μοντέλο το οποίο βασίστηκε σε FTIR δεδομένα, όπως υποδεικνύεται τόσο γραφικά (**Σχήμα 2β**) όσο και από τις παραμέτρους της γραμμικής παλινδρόμησης των προβλέψεων έναντι των παρατηρήσεων (**Πίνακας 1**).



**Σχήμα 2.** Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν από τα PLSR μοντέλα α) για τα FTIR δεδομένα, β) για τα MSI δεδομένα, για τους πληθυσμούς των ζυμών ανανά. Οι παρατηρούμενες τιμές συμβολίζονται με τα ανοιχτά σύμβολα ( $n=114$ ), ενώ οι προβλεπόμενες με τα σκιασμένα σύμβολα ( $n=41$ ). Η συμπαγής γραμμή απεικονίζει την ιδανική  $y=x$  γραμμή και οι διακεκομμένες γραμμές οριοθετούν την  $\pm 1\log$  «περιοχή».

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι μη επεμβατικές αναλυτικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου και ειδικά η πολυφασματική απεικόνιση, συνιστούν υποσχόμενα εργαλεία για την εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης φρέσκου έτοιμου προς κατανάλωση ανανά. Οι δυο αυτές τεχνικές θα μπορούσαν να υποστηρίξουν και προσδευτικά να υποκαταστήσουν συμβατικές μικροβιολογικές ή/και χημικές τεχνικές, καθώς προσφέρουν το πλεονέκτημα της γρήγορης εκτίμησης των μικροβιολογικών και βιοχημικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά την αλλοίωση των τροφίμων. Βέβαια, η διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων και ο περεταίρω εμπλουτισμός των συλλεχθέντων δεδομένων είναι πολύ σημαντικές παράμετροι για την ανάπτυξη μοντέλων με ενισχυμένη επίδοση και αξιοπιστία, ικανών να εξηγήσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα φαινόμενα αλλοίωσης.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

This work has been supported by the project “PhasmaFOOD”, funded from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 732541.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. Montero-Calderon, M.A. Rojas-Graó, O. Martyn-Belloso. *Postharvest Biol. Technol.* 50 (2008) 182–189.
- [2] S. Saxena, B.B. Mishra, R. Chander, A. Sharma. *LWT-Food Sci. Technol.* 42 (2009) 1681–1687.
- [3] N. Mantilla, M.E. Castell-Perez, C. Gomes, R.G. Moreira. *LWT-Food Sci. Technol.* 51 (2013) 37–43.
- [4] V. Di Egidio, N. Sinelli, S. Limboa, L. Torri. *Postharvest Biol. Technol.* 54 (2009) 87–92.
- [5] B.Y. Zhang, S. Samapundo, V. Pothakos, I. de Baenst, G. Sürengil, B. Nosedá, F. Devlieghere. *Postharvest Biol. Technol.* 86 (2013) 73–84.
- [6] J. M. Carstensen, J. F. Hansen. Patent family EP1051660 (2003).