



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιολογική ποιότητα και εμπορικός χρόνος ζωής
μαριναρισμένων με κιτρικό οξύ φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus
labrax*), αποθηκευμένων στους 4 °C, υπό αερόβιες συνθήκες»**

Χάιδω – Στυλιανή Αγγελή

ΒΟΛΟΣ, 2024

**«Μικροβιολογική ποιότητα και εμπορικός χρόνος ζωής μαριναρισμένων με
κιτρικό οξύ φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*), αποθηκευμένων στους 4
°C, υπό αερόβιες συνθήκες»**

**“Microbiological quality and shelf-life of marinated with citric acid European
sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets, stored under air at 4 °C.”**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. **Μποζιάρης Σ. Ιωάννης**, Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
2. **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργεια, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
3. **Παρλαπάνη Φωτεινή**, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων - Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, καθηγητή Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τις καθηγήτριες Παναγιώτα Παναγιωτάκη και Φωτεινή Παρλαπάνη για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Δημήτριο Αναγνωστόπουλο για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του τόσο κατά τη διάρκεια του πειράματος όσο και της συγγραφής, της παρούσας διατριβής, καθώς επίσης και την υπόλοιπη επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τρόφιμα και ιδιαίτερα τα ιχθυηρά, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησής τους υποβαθμίζονται ποιοτικά και εντέλει αλλοιώνονται, καθιστώντας τα δηλαδή ακατάλληλα για βρώση, εξαιτίας μεταβολών που εμφανίζονται στη οσμή, γεύση, εμφάνιση και υφή του τροφίμου. Η παραπάνω διαδικασία προκύπτει εξαιτίας της μικροβιακής δραστηριότητας μιας συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών, τους Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς (EAM). Ένας από τους βασικότερους στόχους της βιομηχανίας τροφίμων είναι ο έλεγχος της ποιότητας στη διάρκεια της συντήρησης καθώς επίσης και η επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των τροφίμων, και στη συγκεκριμένη περίπτωση των ιχθυηρών. Για αυτό τον λόγο πολλά τρόφιμα πλέον επεξεργάζονται με διάφορες τεχνικές και μεθόδους, όπως το μαρινάρισμα το οποίο αποτελεί την εμφάνιση ενός προϊόντος σε διάλυμα εδωδιμων οργανικών οξέων, εξαιτίας των αντιμικροβιακών και συντηρητικών τους δράσεων.

Σκοπό της παρούσας διατριβής, αποτέλεσε η παρακολούθηση για τυχόν μεταβολές στον πληθυσμό των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών, οι μεταβολές του χημικού δείκτη pH καθώς επίσης και οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, εμφάνιση, χρώμα, υφή, οσμή), ωμών φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) μαριναρισμένων σε κιτρικό οξύ (από φυσικό χυμό λεμονιού) και συσκευασμένων σε αερόβιες συνθήκες κατά τη συντήρησή τους στους 4 °C.

Ως προς την οργανοληπτική αξιολόγηση, η κατάσταση των φιλέτων από την ημέρα 0 έως και την ημέρα 5 αξιολογήθηκε ως «Άριστη» με βαθμολογία 5. Εν συνεχεία από την ημέρα 10 μέχρι και την 16^η ημέρα το προϊόν αξιολογήθηκε ως «Πολύ Καλό» με συνολική βαθμολογία από 4 έως 4,5. Κατά την 20^η ημέρα η ποιότητα των φιλέτων είχε υποβαθμιστεί αρκετά με την συνολική βαθμολογία να αγγίζει το 3,5

καθιστώντας το ως «Καλό», σημείο το οποίο αποτέλεσε και τον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος. Με την λήξη του πειράματος (ημέρα 25), τα φιλέτα εμφάνισαν την χαμηλότερη βαθμολογία (2,5) και αξιολογήθηκαν ως «Μη αποδεκτά». Ο χημικός δείκτης pH από την έναρξη του πειράματος έως και την λήξη του δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ του 4,28 και 4,64.

Σύμφωνα με την μικροβιολογική αξιολόγηση, παρατηρήθηκε ότι οι κύριοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί της παρούσας εργασίας παρατηρήθηκε ότι ήταν οι ζυμομύκητες και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. Οι πληθυσμοί αυτών στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής ήταν 6,82 και 4,9 αντίστοιχα, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης (25^η ημέρα) ήταν 6,42 και 6,33 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αποτέλεσαν μέρος του βακτηριακού πληθυσμού, αλλά οι πληθυσμοί τους ήταν χαμηλότεροι από τους προηγούμενους καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος οι πληθυσμοί τόσο των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο (H₂S), όσο και των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae, δεν εμφάνισαν καθόλου ανάπτυξη με τους πληθυσμούς τους να βρίσκονται σχεδόν συνεχώς κάτω από το όριο απαρίθμησης των 2 log₁₀ cfu/g.

Λέξεις – Κλειδιά: Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), Μαρινάρισμα, Κιτρικό Οξύ, Εμπορικός Χρόνος Ζωής, Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Γενικά για τις υδατοκαλλιέργειες.....	1
1.2 Υδατοκαλλιέργεια στον Ελλαδικό χώρο	3
1.3 Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	4
1.4 Αλλοιώσεις τροφίμων.....	6
1.5 Μέθοδοι συντήρησης τροφίμων.....	9
1.5.1 Συντήρηση με οξύνιση (Μαρινάρισμα)	10
1.6 Σκοπός Εργασίας	11
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	12
2. 1 Διαδικασία και Εκτέλεση Πειράματος.....	12
2.1.1 Παροχή, καθαρισμός και φιλετάρισμα ιχθύων	12
2.1.2 Μαρινάρισμα Φιλέτων	12
2.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	13
2.3 Οργανοληπτικός έλεγχος.....	13
2.4 Μικροβιακές αναλύσεις	14
2.4.1 Δειγματοληψία	14
2.4.2 Επίστρωση τρυβλίων	14
2.4.3 Παρασκευή Θρεπτικών Συστατικών	16
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	22
3.1 Οργανοληπτικός Έλεγχος	22
3.2 Μεταβολή pH.....	26
3.3 Μικροβιολογική Ανάλυση	26
4. Συζήτηση.....	29
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	35
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ	36
7. ABSTRACT	42

1. Εισαγωγή

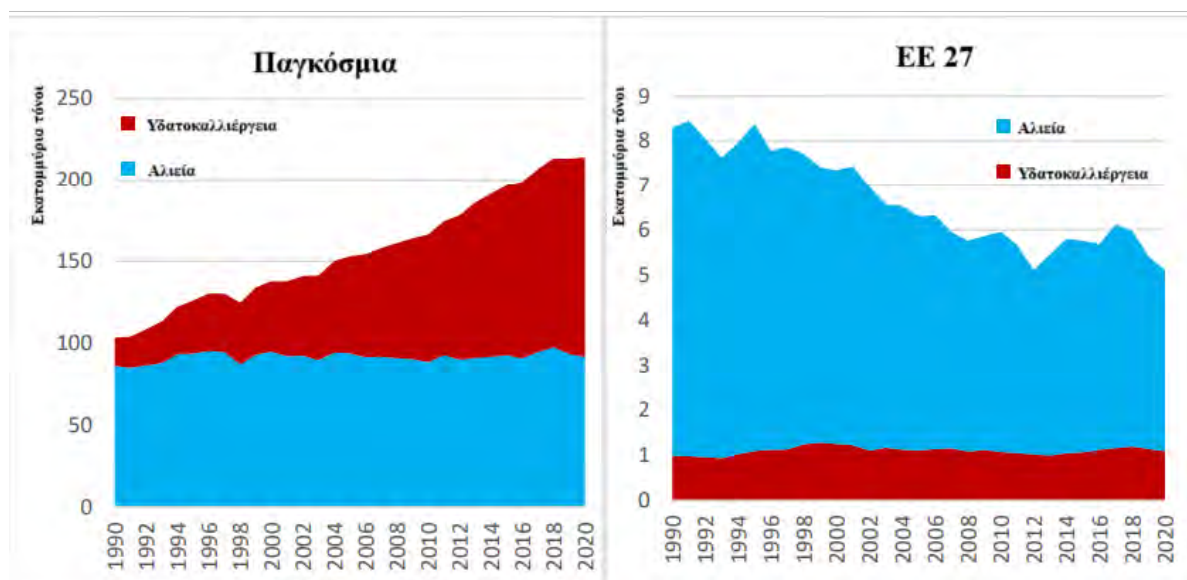
1.1 Γενικά για τις υδατοκαλλιέργειες

Με τον όρο υδατοκαλλιέργεια νοείται η καλλιέργεια υδρόβιων φυτών ή την εκτροφή υδρόβιων ζώων και άλλων οργανισμών για εμπορικούς σκοπούς (Κλαουδάτος. & Κλαουδάτος, 2018). Οι κύριοι λόγοι για τους οποίους εφαρμόζονται οι διάφορες υδατοκαλλιεργητικές δραστηριότητες είναι η παραγωγή τροφής για τον άνθρωπο, η εκτροφή οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως τροφή για τα καλλιεργούμενα είδη (ζωντανές τροφές), η παραγωγή προϊόντων για την βιομηχανία, η βελτίωση των φυσικών αποθεμάτων σε υδρόβιους οργανισμούς (εμπλουτισμός), η ανακύκλωση διαφόρων οργανικών αποβλήτων (μέσω της τροφής όπως τα ζωικά άλβουρα), κ.α. (Παπουτσόγλου, 1997, Βουλτσιάδου και συν., 2015).

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους κλάδους πρωτογενούς παραγωγής, σε παγκόσμια κλίμακα (Brand et al., 2023), ενώ συμβάλει σε τεράστιο βαθμό τόσο στην κάλυψη των καταναλωτικών αναγκών όσο και στην οικονομική ανάπτυξη των χωρών-παραγωγών (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος, 2018). Στην Ευρώπη, η υδατοκαλλιέργεια κατέχει ζωτικό ρόλο στις παράκτιες και παραποτάμιες κοινωνίες – περιοχές, καθώς συμβάλει στην διατήρηση της αλιευτικής κουλτούρας και διατροφής. Επομένως, κατά προσέγγιση, μπορεί να θεωρηθεί ως το υδάτινο ισοδύναμο της γεωργίας και κτηνοτροφίας στην χέρσο, δηλαδή την εκτροφή και καλλιέργεια ορισμένων οργανισμών που διαβιούν στα θαλάσσια και γλυκά υδατικά οικοσυστήματα με κύριο στόχο την συμπλήρωση των ποσοτήτων που προσφέρονται από την συλλεκτική αλιεία (Παπουτσόγλου, 1997, NOAA Fisheries, 2020). Τέλος, η εκτροφή ιχθύων είναι μια διαδικασία που προσομοιάζει τους μηχανισμούς της φύσης, όσον το δυνατόν περισσότερο, ενώ μπορεί να διαρκέσει από 16 έως 18 μήνες με στόχο

το ψάρι να φτάσει το επιθυμητό μέγεθος (περίπου 400 g, ανάλογα το είδος) και απαιτεί σημαντική επιστημονική κατάρτιση καθώς και εξειδικευμένη τεχνογνωσία (Ετήσια ΕΛΟΠΥ, Έκθεση Υδατοκαλλιέργειας, 2023).

Εξαιτίας της στάσιμης, εδώ και δεκαετίες αλιευτικής παραγωγής (περίπου 85 μεγατόνους ανά έτος) (Βουλτσιάδου και συν., 2015), η υδατοκαλλιέργεια έρχεται να καλύψει την ολοένα και αυξανόμενη ζήτηση ιχθυηρών (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος, 2018), ενώ αποδεικνύεται ως μία από τις πιο αξιόπιστες εναλλακτικές λύσεις στο πρόβλημα της κάλυψης των διατροφικών αναγκών παγκοσμίως (Κλαουδάτος Σ. 2005). Σύμφωνα με την Οικονομική Έκθεση των Υδατοκαλλιεργειών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (STECF, 22-17), το 2020, ο συγκεκριμένος τομέας άγγιξε τους 1,2 εκατομμύρια τόνους παραγόμενων προϊόντων (Εικ. 1.1), σε όγκο πωλήσεων, ενώ προσέφερε 3,9 δισεκατομμύρια ευρώ σε αξία εργασίας, απασχολώντας 57.000 εργαζομένους ανάμεσα σε 14.000 διαφορετικές επιχειρήσεις.



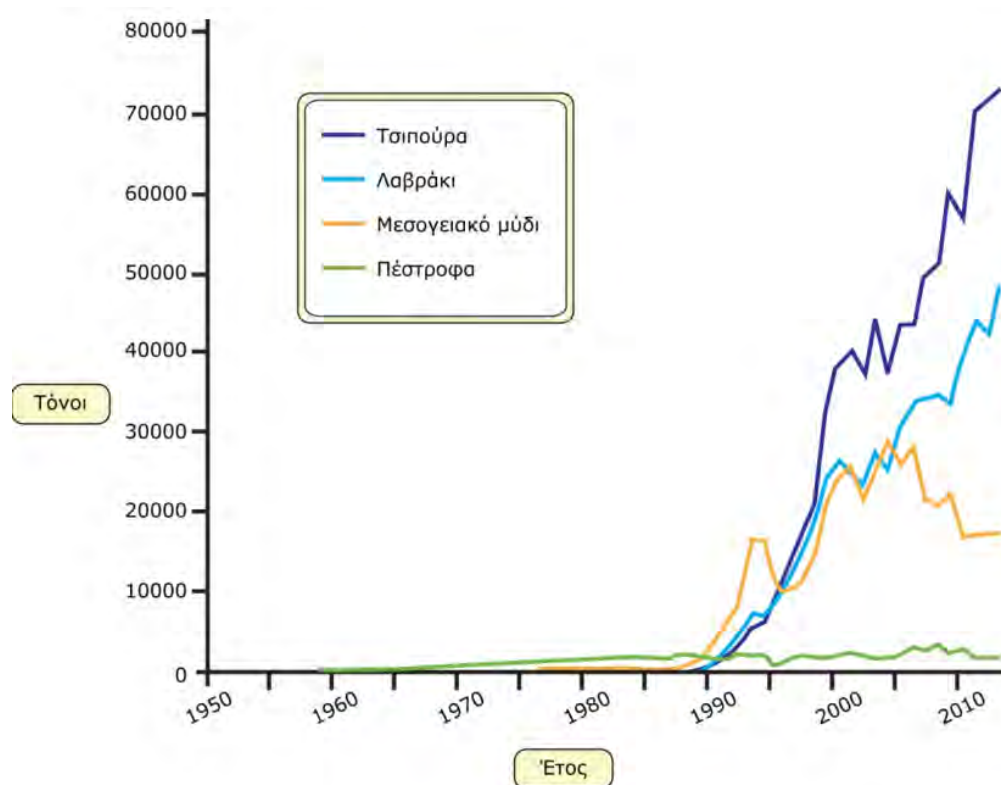
Εικόνα 1.1: Διαγράμματα παραγωγής ιχθυηρών (εκατομμύρια τόνοι) σε Παγκόσμιο και Ευρωπαϊκό επίπεδο. Με κόκκινο παρατηρείται η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών ενώ με μπλε χρώμα η αλιευτική παραγωγή. Από STECF, 2022.

Κατά προσέγγιση, το 7% της παραγωγής ιχθυηρών από υδατοκαλλιέργειες της Ε.Ε συγκεντρώνεται σε τέσσερις μόνο χώρες, την Γαλλία, την Ελλάδα, την Ισπανία και την Ιταλία. Περισσότερο από το μισό του συνολικού όγκου αυτής της παραγωγής επικεντρωνόταν μόνο σε οστρακοειδή, ενώ τα ψάρια τόσο του θαλασσινού όσο και του γλυκού νερού αντιπροσώπευαν περίπου το 21 και 28% του συνολικού όγκου αντίστοιχα.

1.2 Υδατοκαλλιέργεια στον Ελλαδικό χώρο

Η Ελλάδα ξεκίνησε νωρίς της προσπάθειες ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών ήδη από το 1950 (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος, 2010), όμως η ταχύτατη ανάπτυξή τους ήρθε στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Εκείνη την περίοδο μόνο το 2% της εγχώρια παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προέρχονταν από υδατοκαλλιεργητικές δραστηριότητες (2.000 τόνοι) ενώ το υπόλοιπο 98% από την συλλεκτική αλιεία (105,651 τόνοι). Με την πάροδο των χρόνων και την εξέλιξη των μεθόδων παραγωγής, η αναλογία αυτή άρχισε να μεταβάλλεται σταδιακά, αφού από το 2003 και μετά η προσφορά ιχθυηρών από μονάδες στην Ελλάδα υπέρβαινε αυτή της αλιείας. Η έντονη επιτυχία αυτών των δραστηριοτήτων οφείλεται κυρίως στην μεγάλη έκταση των ακτογραμμών της Ελλάδας, σε ιδανικές κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν καθώς και στα πολύ καλά, ποιοτικά, νερά τα οποία είναι κατάλληλα για εκτροφή και καλλιέργεια θαλάσσιων οργανισμών (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος, 2010). Η θαλάσσια Ιχθυοκαλλιέργεια σήμερα αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα, στην χώρα, καθιστώντας την Ελλάδα σε μία από τις κορυφαίες χώρες στην παραγωγή μεσογειακών ειδών τόσο σε Ευρωπαϊκό όσο και σε διεθνές επίπεδο (Βουλτσιάδου και συν., 2015).

Στην Ελλάδα, ιχθύες όπως το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της ελληνικής παραγωγής, ενώ ακολουθούν τα μύδια, η πέστροφα καθώς και άλλα ψάρια του γλυκού νερού (STECF 22-17) (Εικ. 1.2).



Εικόνα 1.2: Παραγωγή ιχθυηρών από υδατοκαλλιέργειες στον Ελλαδικό χώρο από το 1950 έως το 2010. Από Βουλτσιάδου και συν., 2015.

1.3 Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

Το Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Εικ. 1.3) αποτελεί βενθικό είδος της υποτροπικής ζώνης, το οποίο ζει στην περιοχή της υφαλοκρηπίδας σε βάθη που μπορεί να αγγίζουν μέχρι και τα 200m. Ανάλογα με την εποχή του χρόνου, συναντάται και σε πολύ ρηχότερα νερά, όπως κατά τους θερινούς μήνες στους οποίους μεταναστεύει κυρίως σε παράκτιες περιοχές καθώς και στις εκβολές των ποταμών.



Εικόνα 1.3: Απεικόνιση μορφολογίας λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). URL: https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species/dicentrarchus-labrax_el.

Αντίθετα τον χειμώνα εισέρχεται ξανά σε βαθύτερα και πιο κρύα νερά. Είναι ένα ευρύθερμο και ευρύαλο είδος με δυνατότητα να επιβιώνει σε θερμοκρασίες από 2 έως και 35 °C, και διακυμάνσεις αλατότητα από 0 έως 40 psu, και για αυτό παρατηρείται σε εύρος οικοσυστημάτων όπως οι παράκτιες ζώνες που προαναφέρθηκαν, σε λιμνοθάλασσες με υφάλμυρα νερά και στην ανοιχτή θάλασσα (Νεοφύτου Ν., 2015).

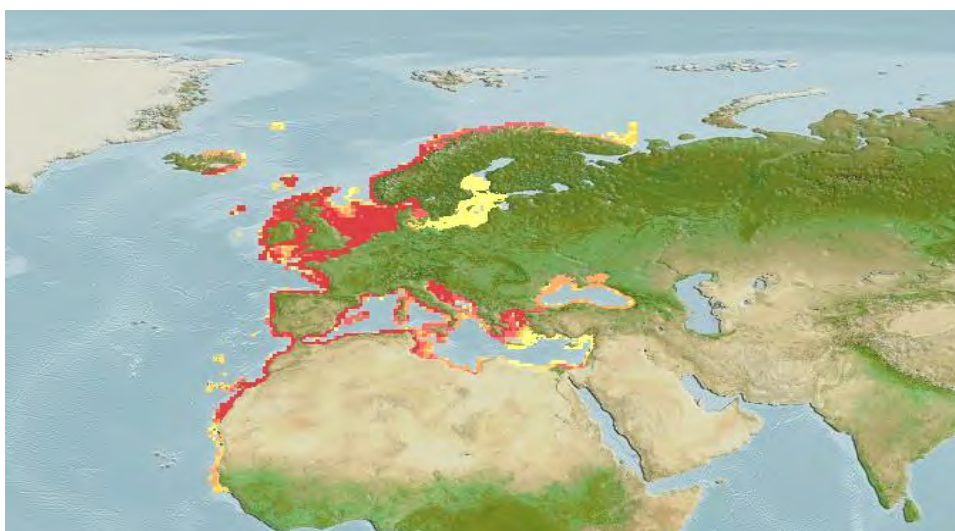
Πίνακας 1.1: Συστηματική κατάταξη του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). URL: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=126975>

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Chordata
Υποφύλο	Vertebrata
Υπερκλάση	Osteichthyes
Κλάση	Actinopterygii
Υποκλάση	Teleostei
Υπερτάξη	Percoidei
Οικογένεια	Serranidae
Γένος	<i>Dicentrarchus</i>
Είδος	<i>Dicentrarchus labrax</i>

Θεωρείται ένα έντονα αρπακτικό είδος, με το διαιτολόγιο του να περιλαμβάνει πληθώρα ψαριών, όπως μικρότερα κοπαδιάρικα ψάρια, σουπιές και καλαμάρια καθώς και διάφορα είδη οστρακοειδών και μαλακίων. Σύμφωνα με την γεωγραφική του

εξάπλωση θεωρείται ένα πολύ κοινό είδος τόσο της Μεσογείου, όσο και της Μαύρης Θάλασσας, ενώ συναντάται εξίσου σε μεγάλους πληθυσμούς στις περισσότερες Ευρωπαϊκές ακτές του Ατλαντικού όπως στην Νορβηγία και στις θαλάσσιες περιοχές της Μεγάλης Βρετανίας και Ιρλανδίας (Εικ. 1.4).

Τέλος ως προς την αναπαραγωγή τους, τα λαβράκια γενούν μικρά πελαγικά αυγά (1,02 έως 1,39 mm), κοντά σε εκβολές ποταμών όπου τα νερά έχουν αλατότητα χαμηλότερη του 35 ‰ είτε και σε παράκτιες περιοχές όπου η αλατότητα είναι υψηλότερη (≥ 30 ‰) (FAO, 2023).



Εικόνα 1.4: Γεωγραφική εξάπλωση του *D. labrax*, τόσο στη Μεσόγειο όσο και στις βορειοδυτικές ακτές της Ευρώπης. URL: <https://www.fishbase.se/summary/dicentrarchus-labrax.html>

1.4 Αλλοιώσεις τροφίμων

Τα τρόφιμα ανεξαρτήτως της προέλευσής τους (φυτικής ή ζωικής), από τη στιγμή της παρασκευής/παραγωγής τους υπόκεινται σε μία προοδευτική μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την προέλευση αυτού του τροφίμου (Σφλώμος & Βαρζάκας, 2019). Τα τρόφιμα αποτελούν οικοσυστήματα όπου ενδιαιτεί πληθώρα μικροοργανισμών, ενώ διάφοροι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (π.χ. το pH, το οξυγόνο, το νερό, οι διαθέσιμες πρώτες ύλες,

η θερμοκρασία κ.τ.λ.) επηρεάζουν την αύξηση, επιβίωση ή και αδρανοποίησή τους (Μποζιάρης, 2019α). Είναι επομένως απολύτως σημαντικό, σε όλα τα στάδια που προϋπάρχουν της τελικής παρασκευής ενός τροφίμου (εξ αλίευση, ανάπτυξη, εκτροφή κ.α.), να τηρούνται όλοι οι κανόνες, συνθήκες και οι διάφορες τεχνολογικές διαδικασίες που αρχικά βελτιώνουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος ενώ αφετέρου επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής του τόσο στο ράφι όσο και στα χέρια του καταναλωτή (Σφλώμος & Βαρζάκας, 2019).

Όπως προαναφέρθηκε η ταχύτητα και το είδος της προκαλούμενης μεταβολής, από την στιγμή της παραγωγής ενός τροφίμου εξαρτάται από την σύσταση του και από τις παραμέτρους υγιεινής, οι οποίες σχετίζονται με τόσο με τον τρόπο επεξεργασίας του όσο και με τον τρόπο διατήρησής του. Επομένως ως αλλοιώσεις τροφίμων μπορεί να αναφερθούν οι καταστάσεις που προκαλούνται από πλήθος μικροοργανισμών οι οποίοι είτε βρίσκονται στα αρχικά συστατικά αυτών (πρώτες ύλες), είτε μεταφέρονται στο τελικό προϊόν από μη σωστό χειρισμών του ανθρώπου (Σφλώμος & Βαρζάκας, 2019). Τέλος η υποβάθμιση αυτή, μπορεί να επιφέρει αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, οσμή, όψη, υφή), με αποτέλεσμα να τα καθιστά ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση (Gramm & Huss, 1996, Boziaris and Parlapani, 2017).

Τα ψάρια και γενικότερα τα αλιευτικά προϊόντα ανήκουν στην κατηγορία των πιο ευαλλοίωτων τροφίμων, κυρίως λόγω της έντονης μικροβιακής δραστηριότητας, και πιο συγκεκριμένα λόγω του μεταβολισμού μίας συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών, των Ειδικών Αλλοιογόνων Μικροοργανισμών (EAM) [αγγλική μετάφραση, Specific Spoilage Organisms (SSOs)] (Anagnostopoulos et al., 2023). Οι συγκεκριμένοι οργανισμοί ευνοούνται από τις συνθήκες συντήρησης - αποθήκευσης (π.χ. ατμόσφαιρα, θερμοκρασία), και εντέλει επικρατούν έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών του μικροβιώματος των ιχθυηρών, φθάνουν σε υψηλούς

πληθυσμούς και παράγουν διάφορους μεταβολίτες (δείκτες χημικής αλλοίωσης-CSI). Οι μεταβολίτες αυτοί, είναι υπεύθυνοι για τις δυσάρεστες γεύσεις/οσμές στα τρόφιμα, ενώ έχουν ως αποτέλεσμα την οργανοληπτική τους απόρριψη (Gram & Huss, 1996, Parlapani et al., 2016). Επομένως, ένα τρόφιμο μπορεί να θεωρηθεί αλλοιωμένο όταν έχουν πραγματοποιηθεί, σε αυτό, αλλαγές οι οποίες το καθιστούν μη αποδεκτό για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Στις διαδικασίες αλλοίωσης λαμβάνουν χώρα φαινόμενα που αφορούν τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών, χημικές αντιδράσεις υποβάθμισης καθώς και ενζυμική δραστηριότητα, ενώ το ποσοστό συνεισφοράς καθενός από αυτούς του μηχανισμούς εξαρτάται από το είδος του αλιεύματος (π.χ. άπαχο ή λιπαρό ψάρι, καρκινοειδές, μαλάκιο κ.τ.λ.), τον τύπο του προϊόντος (νωπό, επεξεργασμένο κ.τ.λ.) και τέλος από τις συνθήκες συντήρησης (τροποποιημένη ατμόσφαιρα, αερόβιες συνθήκες κ.τ.λ.) (Boziaris and Parlapani, 2017; Μποζιάρης, 2019β).

Η παραγωγή μεταβολιτών, εξαιτίας της ανάπτυξης μικροοργανισμών, επηρεάζει κατά κόρον τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ιχθυηρών, όπως η γένυση, η υφή και το άρωμα (Gram & Huss, 1996, Dainty, 1996). Τα παραπάνω δημιουργούν χημικές αλλαγές στα ιχθυηρά και εντέλει τα οδηγούν στην απόρριψη του προϊόντος, ενώ αποτελούνται συνήθως από μόνο ένα γένος ή είδος μικροοργανισμών (Gram & Huss, 1996, Gram & Dalgaard, 2002, Boziaris and Parlapani, 2017; Boziaris et al., 2011). Η διαδικασία της αλλοίωσης συνήθως εμφανίζεται ως δυναμική με αλλαγές και αλληλεπιδράσεις να πραγματοποιούνται μεταξύ διαφόρων ομάδων αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Gram & Dalgaard, 2002, Tsigarida et al., 2003, Boziaris and Parlapani, 2017; Boziaris et al., 2011).

Η αρχική μικροχλωρίδα των ιχθυηρών αποτελείται κυρίως από μικροοργανισμούς που προέρχονται τόσο από την στήλη νερού των περιοχών συλλογής

ή εκτροφής, καθώς και από διάφορες πηγές μόλυνσης κατά τη συγκομιδή, χειρισμό, πρωτογενή μεταποίηση σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας και αλιείας, όπως για παράδειγμα τα αλιευτικά σκάφη και τους χώρους εκφόρτωσης, είτε κατά τη δευτερογενή επεξεργασίας στις βιομηχανίες τροφίμων. Μόλυνση των θαλασσινών με διάφορα είδη βακτηρίων, μπορεί να πραγματοποιηθεί εξαιτίας κακών συνθηκών υγιεινής στην παραπάνω διαδικασία, διαμέσου του αέρα, των εργαζομένων (π.χ. ακάθαρτα χέρια, ρούχα και μαλλιά), του εξοπλισμού και επιφανειών εργασίας, έντομα, πτηνά, το νερό πλύσης, τον πάγο, τα κιβώτια, τα οχήματα κ.λπ., και μέσω διασταυρούμενης μόλυνσης μεταξύ ακατέργαστου και τελικού προϊόντος (για μεταποιημένα θαλασσινά) (Parlapani et al., 2021).

1.5 Μέθοδοι συντήρησης τροφίμων

Όπως προαναφέρθηκε, κυριότερη αιτία αλλοίωσης των ιχθυηρών αποτελεί η μικροβιακή δραστηριότητα. Ορισμένοι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ενεργός οξύτητα (pH), η ενεργότητα του νερού (aw), η συσκευασία σε μίγμα αερίων και τα διάφορα πρόσθετα συντηρητικά, αφενός παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των διαφόρων μικροοργανισμών και αφετέρου επιμηκύνουν τον εμπορικό χρόνο ζωής του τροφίμου, διασφαλίζοντας παράλληλα την υγιεινή και την ασφάλεια του (Μποζιάρης, 2019β). Τα μέτρα τα οποία λαμβάνονται, με στόχο την αντιμετώπιση των διαφόρων αιτιών οι οποίες ευθύνονται για την ποιοτική υποβάθμιση και αλλοίωση των τροφίμων, ονομάζονται «μέθοδοι συντήρησης τροφίμων» (Food Preservation Techniques).

Σύμφωνα με την θεωρία των εμποδίων (Hurdles Theory) (Leistner, 1992), κάθε περιοριστικός παράγοντας μπορεί να θεωρηθεί ως ένα εμπόδιο που προστατεύει το τρόφιμο από τους μικροοργανισμούς. Η εφαρμογή των απαιτούμενων εμποδίων, καθορίζει και τις μεθόδους συντήρησης οι οποίες μπορούν να εφαρμοσθούν. Κάποιες από τις παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης είναι η χαμηλή θερμοκρασία (ψύξη,

κατάψυξη), η θέρμανση, η αφυδάτωση, η κάπνιση, η προσθήκη διαφόρων ουσιών (συντηρητικών) όπως το αλάτι, η ζάχαρη κ.α., οι συσκευασίες vacuum (υπό κενό) καθώς και οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) (Boziaris et al., 2013).

1.5.1 Συντήρηση με οξύνιση (Μαρινάρισμα)

Η συντήρηση των ιχθυηρών με οξύνιση ή αλλιώς "μαρινάρισμα", όπως είναι ευρέα γνωστή, αποτελεί ένα τρόπο συντήρησης που βασίζεται κυρίως στις αντιμικροβιακές ιδιότητες που εμφανίζουν τα οργανικά οξέα. Τα ασθενή οργανικά οξέα, μικρού μοριακού βάρους, όπως το οξικό οξύ που βρίσκεται στο ξύδι, το κιτρικό οξύ που βρίσκεται στο λεμόνι, το προπιονικό, το γαλακτικό οξύ κ.λπ., θεωρούνται μερικά από τα κυριότερα οξέα που χρησιμοποιούνται στην συντήρηση των τροφίμων με την μέθοδο της οξύνισης (Μποζιάρης, 2019β). Η εφαρμογή οργανικών οξέων στην επιφάνεια των ψαριών, με μεθόδους όπως η εμβάπτιση ή ο ψεκασμός, αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και γνωστή πρακτική (Mei et al., 2019). Μια σειρά από πειράματα έχουν αναδείξει τα οργανικά οξέα και τα αντίστοιχα άλατά τους, ως αναστολείς της ανάπτυξης βακτηρίων σε διάφορα είδη ψαριών (Rey et al., 2012, García-Soto et al., 2014).

Το κύριο εμπόδιο στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι το χαμηλό pH, αλλά και η παρουσία του αδιάστατου μορίου των οργανικών οξέων, το οποίο είναι δραστικό έναντι των μικροοργανισμών, εξαιτίας του ότι εμφανίζει την δυνατότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη αυτών και να εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων (Μποζιάρης, 2019β). Τα ιχθυηρά υπόκεινται σε προεργασίες όπως ο αποκεφαλισμός, ο εκσπλαχνισμός, το πλύσιμο και κατόπιν σε εμβάπτιση στο διάλυμα οργανικών οξέων. Συνήθως προηγείται μια ελαφριά αλάτιση, επιπλέον το μαρινάρισμα μπορεί να πραγματοποιηθεί εν ψυχρώ ή εν θερμώ, ενώ σε πολλές περιπτώσεις προηγείται θερμική επεξεργασία.

Το κιτρικό οξύ, αποτελεί ένα ασθενές οργανικό οξύ το οποίο εμφανίζεται στα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, λεμόνια κ.α.). Παρασκευάζεται βιομηχανικά είτε από το χυμό των λεμονιών κατά την κατακρήμνιση με ανθρακικό ασβέστιο υπό μορφή αδιάλυτου κιτρικού ασβεστίου, είτε κυρίως κατά τη ζύμωση σακχάρων με μύκητες. Θεωρείται ένα φυσικό συντηρητικό, ενώ πολλές φορές χρησιμοποιείται ως ρυθμιστής οξύτητας για να προσθέσει όξινη (ξινή) γεύση τόσο σε τρόφιμα όσο και σε μη αλκοολούχα ποτά. Ως πρόσθετο τροφίμων, με βάση την νομοθεσία, επισημαίνεται με τον κωδικό E330. Όπως προαναφέρθηκε, το κιτρικό οξύ υπάρχει σε ποικιλία από φρούτα και λαχανικά, αλλά συγκεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό κατά κόρον στα λεμόνια, στα οποία αποτελεί περίπου το 8% του ξηρού τους βάρους.

1.6 Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η παρακολούθηση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών αλλαγών, καθώς επίσης και η εκτίμηση του εμπορικού χρόνου ζωής φιλέτου από λαβράκι, το οποίο μαριναρίστηκε με κιτρικό οξύ (φυσικός χυμός λεμονιού), συσκευάστηκε κάτω από αερόβιες συνθήκες, και αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. 1 Διαδικασία και Εκτέλεση Πειράματος

2.1.1 Προμήθεια, καθαρισμός και φιλετάρισμα ιχθύων

Στην παρούσα προπτυχιακή διατριβή, μελετήθηκαν ο μικροβιακός πληθυσμός, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά καθώς και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*), βάρους περίπου 450g, τα οποία παραχωρήθηκαν από την εταιρεία «Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιά ΑΒΒΕ» (Κεφαλονιά, Ελλάδα).

Οι ιχθύες μεταφέρθηκαν μέσα σε πολυεστερικά κουτιά με θρυμματισμένο πάγο, εντός 24 ωρών, από την εγκατάσταση εκτροφής στο Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων (ΕΤΕΧΝΑΤ), του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Βόλος).

Στη συνέχεια πλύθηκαν, απολεπίστηκαν, αποκεφαλίστηκαν και εκσπλαχνίστηκαν, ενώ πραγματοποιήθηκε εκ νέου πλύση αυτών με κύριο στόχο, την ελάττωση των επιπέδων ακαθαρσιών και γενικότερα εξωγενών υλικών, τα οποία ενδέχεται να επηρεάζαν αρνητικά το τελικό προϊόν. Τέλος τα ψάρια τεμαχίστηκαν σε φιλέτα βάρους 100 γραμμαρίων.

2.1.2 Μαρινάρισμα Φιλέτων

Τα φιλέτα μαριναρίστηκαν σε κιτρικό οξύ, δηλαδή φυσικό χυμό λεμονιού (μετά από στύψιμο λεμονιών), ο οποίος ήταν αραιωμένος με νερό σε αναλογία 1 προς 1. Η αναλογία προϊόντος προς την μαρινάδα ήταν 1:1,5 (100g φιλέτο ψαριού, εμβαπτίστηκε σε 150 ml μαρινάδας). Το μαρινάρισμα πραγματοποιήθηκε στους 8 °C για περίπου 20 ώρες. Μετά από αυτό τα φιλέτα αφέθηκαν να στραγγίσουν και να στεγνώσουν για 1

ώρα στους 4 °C, πριν συσκευασθούν σε πλαστικές σακούλες σε αερόβιες συνθήκες και συντηρηθούν στους 4 °C.

2.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις

Η μέτρηση του pH της σάρκας των δειγμάτων πραγματοποιούνταν μετά την αραίωση και ομογενοποίηση 5 γραμμαρίων προϊόντος με 50mL απεσταγμένου νερού. Οι τιμές ελήφθησαν χρησιμοποιώντας πεχάμετρο (inoLab® pH 730), του οποίου το ηλεκτρόδιο βυθιζόνταν εντός του δείγματος.

2.3 Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των φιλέτων αποτελούσε την αξιολόγηση αυτών καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησής τους, στους 4 °C. Τα κριτήρια ελέγχου επικεντρώθηκαν κυρίως στην οσμή, γεύση και υφή (συνεκτικότητα φιλέτου), αλλά και ως προς την αφή και όψη του φιλέτου γενικότερα, ενώ η ομάδα αξιολόγησης αποτελούνταν από πέντε εκπαιδευμένους πανελιστ. Η πρώτη μέρα του οργανοληπτικού ελέγχου ξεκίνησε με την έναρξη του πειράματος (ημέρα 0), επαναλήφθηκε τις ημέρες συντήρησης 5, 10, 13, 16, 20 και 25 όπου ήταν η λήξη του πειράματος.

Η κλίμακα αξιολόγησης βαθμονομούνταν από το 1 μέχρι το 5, όπου με 1 υποδηλώνονταν το «αλλοιωμένο» φιλέτο ενώ αντίθετα με 5 η άριστη ποιότητα που εμφανίζονταν στα φρέσκα φιλέτα. Το προϊόν εντέλει απορρίπτονταν όταν ένας από τους 5 κριτές, αξιολογούσε ένα από τα παραπάνω κριτήρια με βαθμολογία 2,5 ή και χαμηλότερη. Συγκεκριμένα, με βαθμό 5 χαρακτηρίστηκε το προϊόν ως «Άριστο», με βαθμολογία από 4,9 έως 4 ως «Πολύ καλό», αντίστοιχα από 3,9 έως και 3 κρίθηκε ως «Καλό», ενώ από 2,9 – 2 ως «Μη αποδεκτό». Τέλος, με βαθμολογία από 1,9 έως 1 τα προϊόντα θεωρούνταν ως «Μη αποδεκτά».

2.4 Μικροβιακές αναλύσεις

2.4.1 Δειγματοληψία

Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (25 ημέρες) πραγματοποιούνταν έλεγχος των μικροβιακών πληθυσμών. Αρχικά 25g προϊόντος μεταφέρονταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher και έπειτα προσθέτονταν σε αυτή 225ml MRD (Maximum Recovery Diluent, 0,1% peptone, 0,85% NaCl). Οι σακούλες τοποθετούνταν σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK) για 2 περίπου λεπτά, με στόχο την ομογενοποίηση του δείγματος.

Ο εμβολιασμός του εναιωρήματος γινόταν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα με τις τεχνικές της επιφανειακής επίστρωσης και ενσωμάτωσης ανάλογα με το θρεπτικό υλικό. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν περίπου ανά 3 – 5 ημέρες, τα δείγματα που απομονώνονταν από κάθε θρεπτικό συστατικό ήταν διπλά (n=2), ενώ εντέλει τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζονταν ως ο μέσος όρος του log cfu/g των δύο επαναλήψεων.

2.4.2 Επίστρωση τρυβλίων

A) Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (Spread Plate Technique)

Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 0,1mL ομογενοποιημένου δείγματος, στην επιφάνεια στερεών θρεπτικών μέσων τα οποία βρίσκονταν σε τρυβλία Petri. Η συγκεκριμένη μέθοδος πραγματοποιήθηκε για τα θρεπτικά υποστρώματα TSA, CFC και IA, ενώ εφαρμόζεται συνήθως για την αύξηση αερόβιων μικροοργανισμών.

B) Τεχνική της ενσωμάτωσης (Pour Plate Technique)

Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 1mL ομογενοποιημένου δείγματος σε κενά αποστειρωμένα τρυβλία Petri, όπου σε αυτά προστίθεται θρεπτικά συστατικά με άγαρ το οποίο σε θερμοκρασία 45°C είναι ρευστό ενώ σε θερμοκρασία δωματίου σταθεροποιείται. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την αύξηση μικροαερόφιλων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών, ενώ είναι κατάλληλη για τη χρήση θρεπτικών συστατικών όπως το MRS και το VRBGA.

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν αφορούν την:

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) σε θρεπτικό υπόστρωμα Trypton Soy Agar (TSA) με την τεχνική της επίστρωσης και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25°C για 48 h με 72h.
- Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα Cetrimide Fucidin Cephaloridine Agar (CFC) με την τεχνική της επίστρωσης και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25°C για 48 h.
- Υδροθειούχα βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*) σε θρεπτικό υπόστρωμα Iron Agar (IA) κατά Lyngby με την τεχνική της επίστρωσης και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25°C για 72 h.
- Οξυγαλακτικά βακτήρια με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υλικό MRS (deMan-Rogosa-Sharp Agar) και επώαση των τρυβλίων στους 30°C για 72 h.
- Εντεροβακτήρια με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υλικό VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) και επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 24 h.
- Ζυμομύκητες με την τεχνική της επίστρωσης σε θρεπτικό υλικό YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), μετά από επώαση των δειγμάτων στους 25 °C για 5 ημέρες.

Τα θρεπτικά υλικά για την διεξαγωγή του πειράματος προέρχονταν από την εταιρεία Neogen® Culture Media, UK εκτός από το CFC (Cetrimide, Fucidic Acid, & Cephalothin Agar), το οποίο προμηθεύτηκε από την LAB M,UK.

2.4.3 Παρασκευή Θρεπτικών Συστατικών

1. Ολική Μεσόφιλη Μικροχλωρίδα (OMX)

Το Tryptone Soy Agar (TSA), αποτελεί θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για την καλλιέργεια διαφόρων βακτηρίων. Πρόκειται για ένα μη επιλεκτικό μέσο, το οποίο περιέχει πληθώρα θρεπτικών ουσιών οι οποίες επιτρέπουν την ανάπτυξη μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται ως θρεπτικό μέσο γενικής χρήσης. Χρησιμοποιείται σε εφαρμογές όπως η συντήρηση της καλλιέργειας, η απαρίθμηση ή ακόμα και σε απλές γενικές καλλιέργειες. Περιέχει πεπτόνες καζεΐνης καθώς και πεπτόνες σόγιας οι οποίες προσδίδουν αμινοξέα και αζωτούχες ενώσεις, ενώ η γλυκόζη που περιέχεται χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας των μικροοργανισμών

TSA	
Συστατικά	g/1000ml
Tryptone	15,0
Soy Peptone	5,0
Sodium Chloride	5,0
Agar	12,0

Διαδικασία Παραγωγής TSA

Ζυγίζονται και προστίθενται 37g θρεπτικού υλικού σε φιάλη των 1000ml, ενώ έπειτα προστίθενται 1000ml απιονισμένου νερού. Η αποστείρωση του διαλύματος πραγματοποιείται στους 121 °C για περίπου 15min, η ενσωμάτωση του θρεπτικού γίνεται σε τρυβλία Petri, ενώ το τελικό pH του είναι $7,3 \pm 0,2$.

2. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.

Το θρεπτικό μέσο για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. έχει ως στόχο την καταστολή των περισσότερων ανεπιθύμητων μικροοργανισμών που ενδέχεται να αναπτυχθούν σε ένα τρόφιμο. Η προσθήκη αντιβιοτικών ουσιών προσδίδει εκλεκτικότητα στο θρεπτικό σε διάφορα βακτήρια του συγκεκριμένου γένους. Συγκεκριμένα η εκλεκτικότητα του CFC (Cetrimide Fucidin Chephaloridine), εξαρτάται από τον συνδυασμό των αντιμικροβιακών ενώσεων Chephaloridine, Fucidin και Cetrimide. Η πεπτόνη της ζελατίνης καθώς και η καζεΐνη προσδίδουν άζωτο, θείο και διάφορες ακόμη βιταμίνες, ενώ το θειικό κάλιο και το χλωριούχο μαγνήσιο αποτελούν συστατικά τα οποία παράγουν χρωστικές ουσίες συμβάλλοντας στην καταμέτρηση των πληθυσμών.

CFC	
Συστατικά	g/1000ml
Gelatin Peptone	16,0
Potassium Sulphate	10,0
Enzymatic Digest of Casein	10,0
Magnesium Chloride	1,4
Bacteriological Agar	13,0

Εκλεκτικό μέσο CFC	
Συστατικά	mg/500ml
Cetrimide	5,0
Fucidin	5,0
Cephaloridine	25,0

Διαδικασία παραγωγής CFC

Σε αποστειρωμένη φιάλη του 1 λίτρου, ζυγίζονται και προστίθενται 48,4g του θρεπτικού υλικού μαζί με 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, 10ml γλυκερόλης συμπληρώνονται και πραγματοποιείται ανάδευση σε εστία μέχρι την ομογενοποίηση. Η αποστείρωση του διαλύματος πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά στους 121 °C, ενώ

έπειτα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο, μέχρι η θερμοκρασία να αγγίξει τους 45 με 50 βαθμούς. Προστέθηκε το εκλεκτικό υλικό CFC, αφού πρώτα διαλύθηκε σε 5ml απιονισμένου νερού με 50% αιθανόλη, εντέλει ακολούθησε η διαδικασία της ενσωμάτωσης, στην οποία μικρή ποσότητα του θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Αφέθηκαν σε κατάσταση ηρεμίας, έως ότου την πλήρη σταθεροποίησή των τρυβλίων και στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 10 με 15 βαθμούς Κελσίου για πιθανή μελλοντική χρήση.

3. Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S)

Το θρεπτικό υλικό Iron Agar (IA) κατά Lyngby, χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο. Η καζεΐνη και η πεπτόνη με προσθήκη μαγιάς είναι τα συστατικά τα οποία προσδίδουν το άζωτο, τον άνθρακα και όλες τις απαραίτητες βιταμίνες. Η γλυκόζη, η σακχαρόζη και η λακτόζη που περιέχει, ύστερα από ζύμωση παράγουν οξέα τα οποία ανιχνεύονται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Τέλος το θειοθειικό νάτριο ανάγεται προς το υδρόθειο, το οποίο εν συνεχεία αντιδρά με άλατα σιδήρου και προσδίδει στις αποικίες μαύρο χρωματισμό.

Iron Agar (IA)	
Συστατικά	g/1000ml
Beef Extract	3,0
Yeast Extract	3,0
Balanced Peptone N° 1	20,0
Sodium Chloride	5,0
Lactose	10,0
Ferric Citrate	0,3
Sucrose	10,0
Glucose	1,0
Sodium Thiosulphate	0,3
Phenol Red	0,025
Agar N° 2	12,0

Διαδικασία παραγωγής ΙΑ

Σε φιάλη του 1 λίτρου, έπειτα από αποστείρωση της, προστίθενται 65g θρεπτικού υλικού μαζί με 1000ml απιονισμένου νερού. Έπειτα γίνεται αποστείρωση του διαλύματος στους 121 °C για περίπου 15 λεπτά. Το θρεπτικό υλικό αφήνεται να κρυώσει σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία να αγγίξει τους 45 – 50 βαθμούς και μοιράζεται εξίσου σε τρυβλία Petri.

4. Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria, LAB)

Το θρεπτικό υπόστρωμα deMan – Rogosa – Sharp agar (MRS), είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τα διάφορα εκχυλίσματα που περιέχει όπως ζύμης και κρέατος καθώς και οι πεπτόνες, παρέχουν άνθρακα, άζωτο και διάφορες βιταμίνες. Το θεικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το θεικό μαγγάνιο ($MnSO_4$) παρέχουν θετικά ιόντα για τον μεταβολισμό. Το πολυσορβικό (Polysorbate, Tween ® 80) είναι επιφανειοδραστικό, διευκολύνοντας την πρόσληψη των θρεπτικών από τους μικροοργανισμούς.

MRS	
Συστατικά	g/1000ml
Mixed Peptones	10,0
Yeast Extract	5,0
Beef Extract	10,0
Glucose	20,0
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2,0
Sodium Acetate	5,0
Triammonium Citrate	2,0
Magnesium Sulphate	0,2
Manganese Sulphate	0,05
Polysorbate, Tween ®80	1,08
Agar	15,0

Διαδικασία παραγωγής MRS

Σε αποστειρωμένη φιάλη του 1 λίτρου, προστίθενται 70g θρεπτικού υλικού μαζί με 1000ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα θερμαίνεται έως την ομογενοποίηση

και στη συνέχεια αποστειρώνεται στους 121 °C για περίπου 15 λεπτά. Τέλος αφήνεται να κρυώσει μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει τους 45 έως 50 βαθμούς, και μοιράζεται εξίσου σε τρυβλία Petri.

5. Ζυμομύκητες

Το θρεπτικό υλικό YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), αποτελεί μη επιλεκτικό θρεπτικό υλικό και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη διαφόρων ζυμομυκήτων. Το εκχύλισμα ζύμης που περιέχει, παρέχει στους καλλιεργούμενους μικροοργανισμούς βιταμίνες και αμινοξέα. Η πεπτόνη λειτουργεί ως κύρια πηγή αζώτου, βιταμινών και ανόργανων συστατικών.

YEPD	
Συστατικά	g/1000ml
Peptone	20,0
Yeast Extract	10,0
Glucose	20,0
Agar	15,0

Διαδικασία παραγωγής YEPD

Σε αποστειρωμένη φιάλη, προστέθηκαν 65g του θρεπτικού υλικού YEPD σε 1000ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα, θερμαίνεται μέχρι την ομογενοποίησή του και αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121 °C για περίπου 15 λεπτά. Ενώ στο τέλος, αφήνεται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 45 με 50 βαθμούς για να κρυώσει.

6. Βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*

Το θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA), είναι επιλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των εντεροβακτηριδίων στα τρόφιμα. Η γλυκόζη, είναι υδατάνθρακας που χρησιμοποιείται για την ζύμωση. Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να προκαλέσουν ζύμωση στην γλυκόζη, παράγουν

κόκκινες αποικίες, με ερυθρό – ιώδες φωτοστέφανο. Τα χολικά άλατα και το κρυσταλλικό ιώδες αναστέλλουν την ανάπτυξη των Gram⁺ βακτηρίων.

VRBGA	
Συστατικά	g/1000ml
Yeast Extract	3,0
Peptone	7,0
Sodium Chloride	5,0
Bile Salts	1,5
Glucose	10,0
Neutral Red	0,03
Crystal Violet	0,002
Agar	12,0

Διαδικασία παραγωγής VRBGA

Σε αποστειρωμένη φιάλη προστίθενται 38,5g θρεπτικού υλικού μαζί με 1000ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι την ομογενοποίηση του. Το διάλυμα δεν χρήζει αποστείρωσης λόγω ότι θερμαίνεται καθ' όλη τη διάρκεια της παρασκευής του.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Οργανοληπτικός Έλεγχος

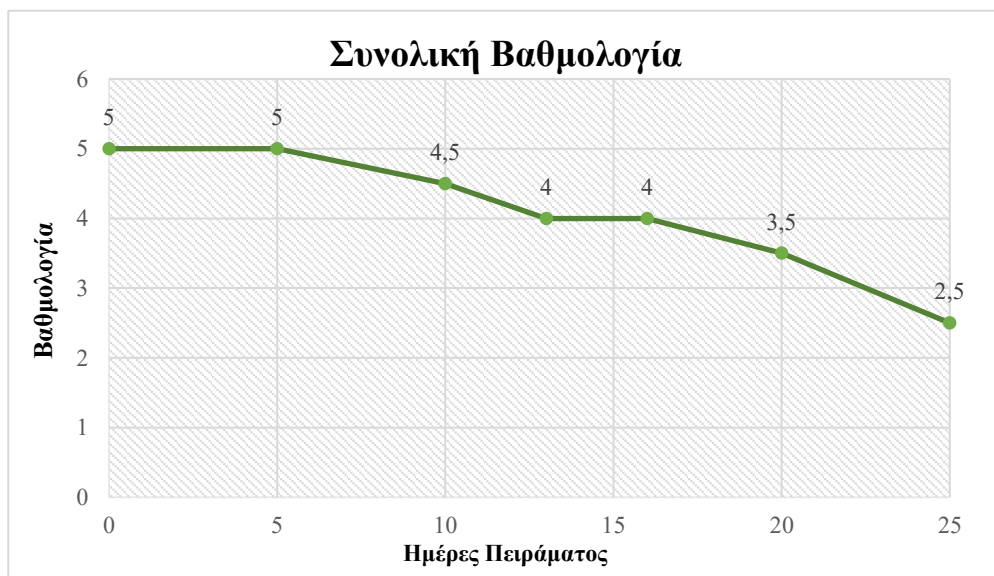
Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στα φιλέτα λαβρακιού, μαριναρισμένα με κιτρικό οξύ (χυμός λεμονιού), που αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 4 °C, πραγματοποιούνταν οργανοληπτικός έλεγχος των βασικών τους χαρακτηριστικών όπως η οσμή, η υφή, το χρώμα ενώ στο τέλος προσδιορίζονταν και η συνολική βαθμολογία του προϊόντος. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των βαθμολογιών των 5 κριτών, για τις διάφορες παραμέτρους, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος.

Σύμφωνα με την αξιολόγηση του προϊόντος από την πρώτη μέρα μέχρι και την 5^η μέρα συντήρησης, για όλες τις παραμέτρους αξιολογήθηκε ως «Άριστο» με βαθμολογία 5. Στο πέρας του χρόνου ξεκίνησε η υποβάθμιση των φιλέτων, όπως παρατηρείται και στον πίνακα 3.1 αφού για τις μέρες 10, 13 και 16 το προϊόν αξιολογήθηκε ως «Πολύ Καλό» με συνολική βαθμολογία από 4 έως 4,5. Κατά την ημέρα 20, η ποιότητα των φιλέτων ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, είχε υποβαθμιστεί αρκετά, η συνολική βαθμολογία ήταν 3,5 καθιστώντας το ως «Καλό». Την τελευταία μέρα του πειράματος (ημέρα 25), παρατηρήθηκε ότι τα φιλέτα συγκέντρωσαν την χαμηλότερη συνολική βαθμολογία (2,5) και αξιολογήθηκε το προϊόν ως «Μη Αποδεκτό».

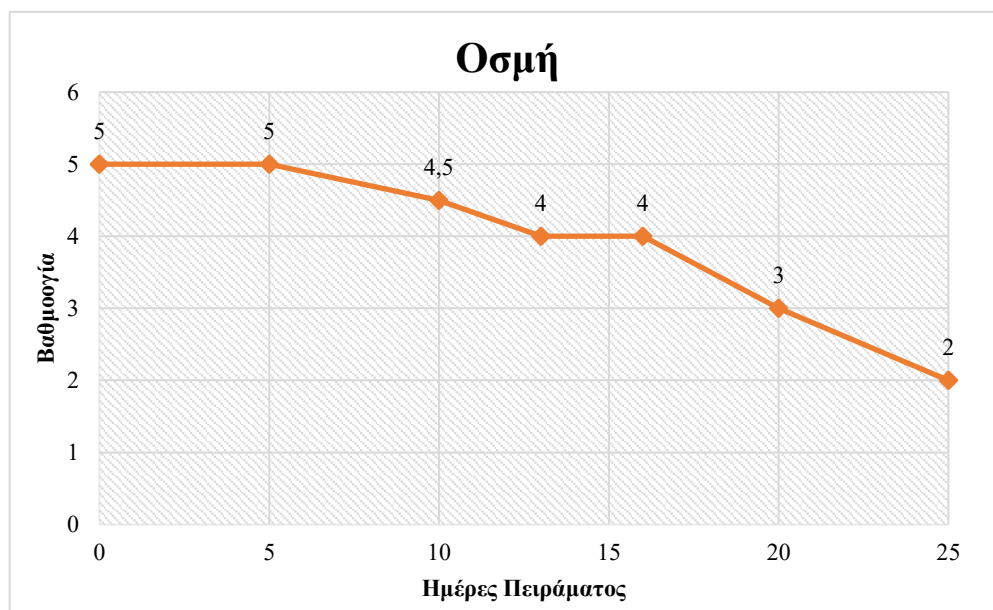
Ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων συντηρημένα με κιτρικό οξύ σε θερμοκρασία 4 °C καθορίστηκε στις 20 περίπου ημέρες, αφού η συνολική βαθμολογία του προϊόντος ήταν 3,5 καθιστώντας το ως «Καλό». Οι μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ιχθύων λαβρακιού συντηρημένα σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C παρουσιάζονται αναλυτικά στα Σχήματα 3.1 – 3.5.

Πίνακας 3.2: Βαθμολογία των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (εμφάνιση, οσμή, γεύση, χρώμα υφή) και η συνολική βαθμολογία των ιχθύων λαβρακιού.

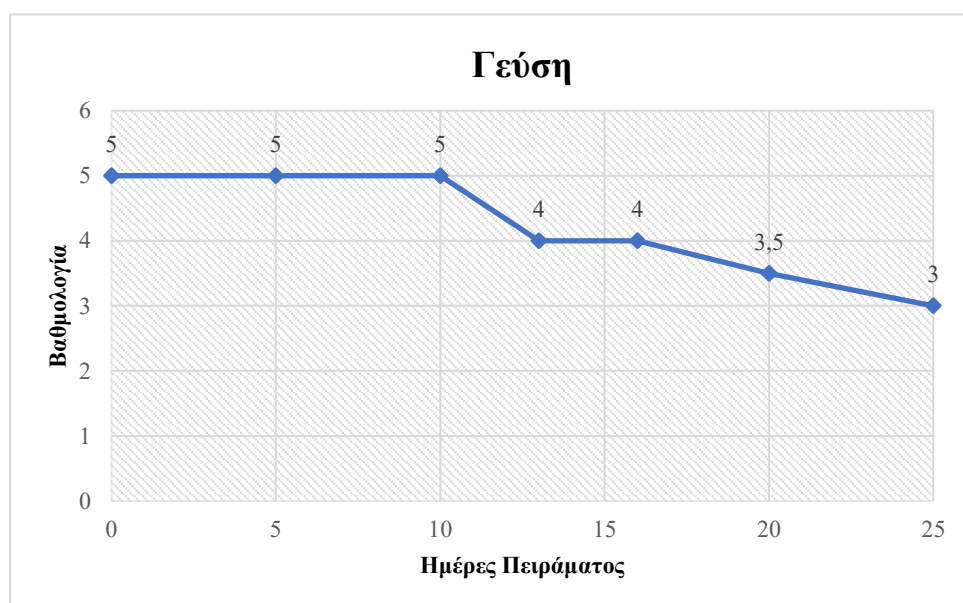
Ημέρες	Εξωτερική Εμφάνιση	Οσμή	Γεύση	Χρώμα	Υφή	Συνολική Βαθμολογία
0	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5
10	4,5	4,5	5	4	4	4,5
13	4	4	4	3,5	4	4
16	4	4	4	3,5	4	4
20	4	3	3,5	3	3	3,5
25	3,5	2	3	2,5	2,5	2,5



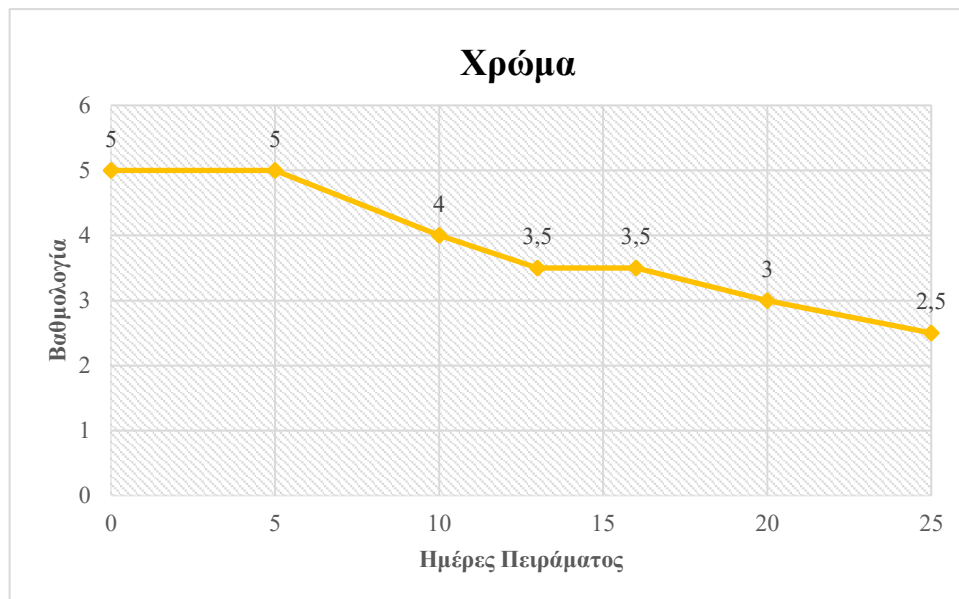
Σχήμα 3.1: Συνολική βαθμολογία για τις μεταβολές των ποιοτικών χαρακτηριστικών των φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*), μαριναρισμένα με κιτρικό οξύ.



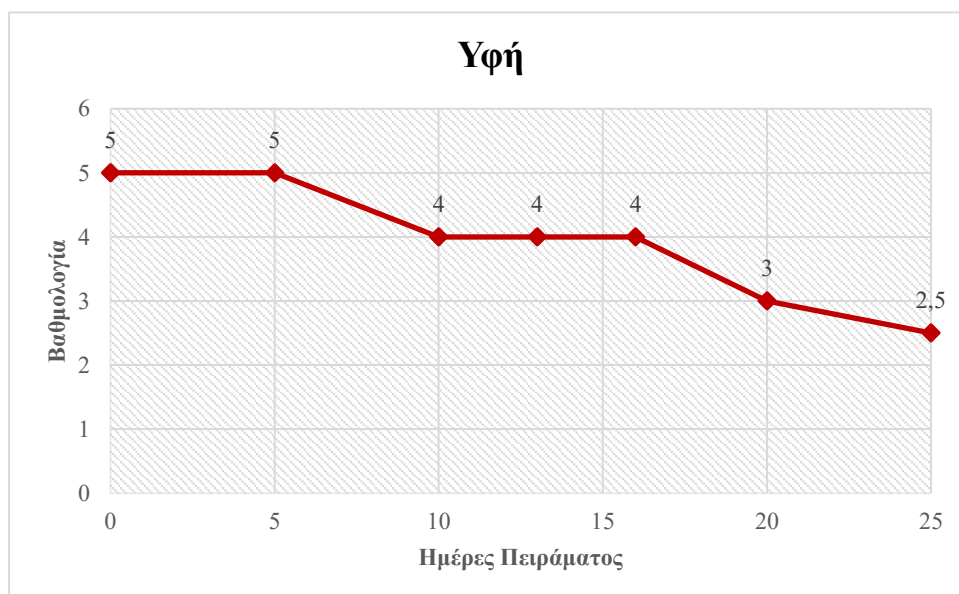
Σχήμα 3.2: Μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών (οσμή) των φιλέτων λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) κατά την διάρκεια συντήρησής τους στους 4 °C με την παρουσία κιτρικού οξέος σε συνθήκες αέρος για 25 ημέρες.



Σχήμα 3.3: Μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών (γεύση) των φιλέτων λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) κατά την διάρκεια συντήρησής τους στους 4 °C με την παρουσία κιτρικού οξέος σε συνθήκες αέρος για 25 ημέρες.



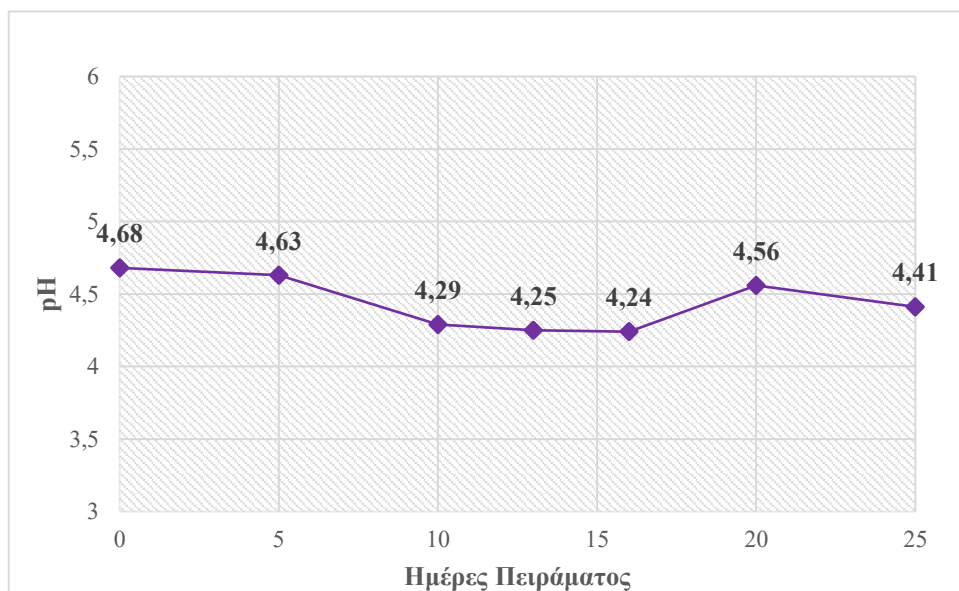
Σχήμα 3.4: Μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών (χρώμα) των φιλέτων λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) κατά την διάρκεια συντήρησής τους στους 4 οC με την παρουσία κιτρικού οξέος σε συνθήκες αέρος για 25 ημέρες.



Σχήμα 3.5: Μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών (υφή) των φιλέτων λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) κατά την διάρκεια συντήρησής τους στους 4 οC με την παρουσία κιτρικού οξέος σε συνθήκες αέρος για 25 ημέρες.

3.2 Μεταβολή pH

Στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 3.6) παρουσιάζονται οι μεταβολές του pH στη σάρκα των φιλέτων λαβρακιού κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό συνθήκες αέρα στους 4 °C.



Σχήμα 3.6: Μεταβολή του pH των φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) κατά την διάρκεια συντήρησής τους στους 4 οC με την παρουσία κιτρικού οξέος σε συνθήκες αέρος για 25 ημέρες.

3.3 Μικροβιολογική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα που εμφανίζονται παρακάτω ως προς τις μικροβιακές αναλύσεις, παραθέτουν την μικροβιακή αύξηση στα φιλέτα Λαβρακιού, κατά την πάροδο του πειράματος στο Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων (ETEXNAT), του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όπως προαναφέρθηκε τα φιλέτα συντηρούνταν σε αερόβιες συνθήκες παρουσία κιτρικού οξέος, στους 4 °C. Ο πίνακας 3.2 καταγράφει τις πληθυσμιακές μεταβολές της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) καθώς και διαφόρων άλλων μικροοργανισμών, καλλιεργημένα σε διαφορετικού είδους υποστρώματα και μετρούμενα σε log₁₀ cfu/g.

Πίνακας 3.3: Μεταβολές στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών σε μαριναρισμένα φιλέτα Λαβρακίου, συντηρούμενα υπό αερόβιες συνθήκες στους 4 °C. Μετρούμενες σε log₁₀ cfu/g.

	Ημέρα 0	Ημέρα 5	Ημέρα 10	Ημέρα 13	Ημέρα 16	Ημέρα 20	Ημέρα 25
TSA	<2	3	7,03	5	6,1	6,79	7,33
CFC	<2	<2	<2	4,77	4,52	4,9	6,3
IA	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
MRS	<2	1,87	3,66	4,14	2	4,5	4,32
YEPD	<2	2,84	6,38	5,29	5,91	6,82	6,42
VRBGA	<2	1,54	<2	<2	<2	<2	<2

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0) είχε πληθυσμό μικρότερο του 2 log₁₀ cfu/g όπου ήταν και το όριο απαρίθμησης της μεθόδου της επίστρωσης. Κατά την 10^η ημέρα παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση του πληθυσμού στο 7,03 log₁₀ cfu/g, ενώ στον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος (20^η ημέρα) ο πληθυσμός ήταν 6,79 log₁₀ cfu/g. Τέλος, κατά την λήξη της πειραματικής διαδικασίας (25^η ημέρα) ο πληθυσμός ήταν 7,33 log₁₀ cfu/g (Σχ.6.7).

Αντίστοιχα, για τις ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.) , κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0) μέχρι και την 10^η ημέρα ο πληθυσμός ήταν μικρότερος του 2 log₁₀ cfu/g, από την ημέρα 13 μέχρι και την 20^η η οποία αποτελούσε τον εμπορικό χρόνο ζωής οι πληθυσμοί των βακτηρίων ήταν αυξημένοι στα 4,77 και 4,9 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα. Κατά την λήξη του πειράματος παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος πληθυσμός, 6,3 log₁₀ cfu/g (Σχ.6.7).

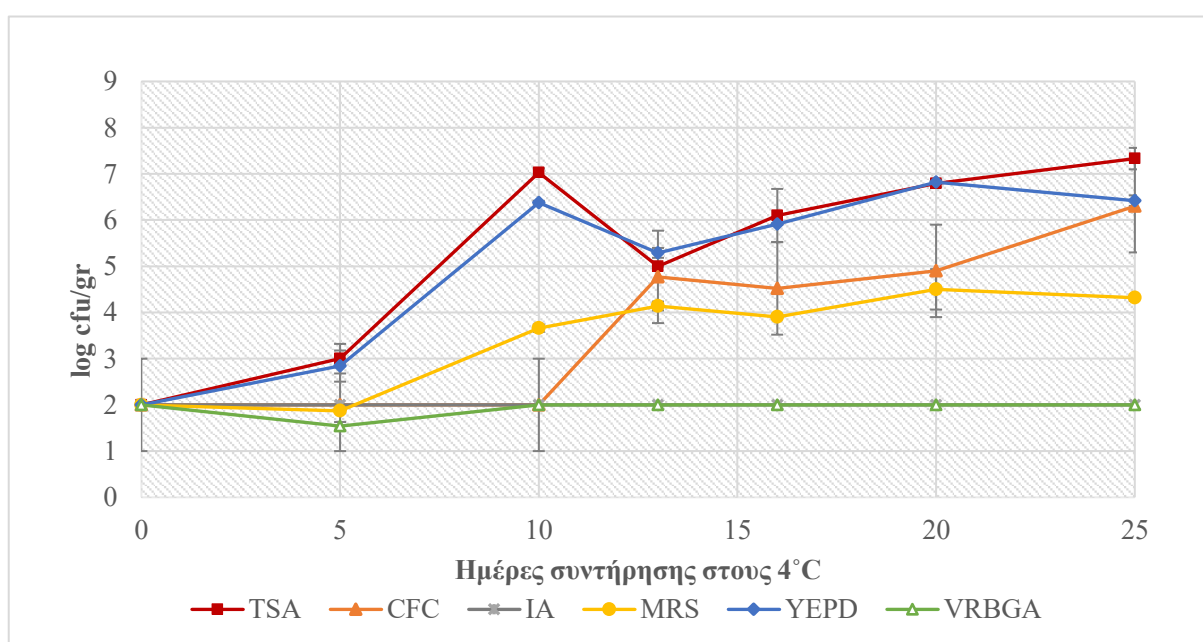
Συνεχίζοντας, τα βακτήρια που παράγουν H₂S, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό ΙΑ, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, δεν εμφάνισαν αύξηση στους πληθυσμούς τους, με την τιμή να βρίσκεται μικρότερη από 2 log₁₀ cfu/g (Σχ.6.7).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (θρεπτικό υλικό MRS), κατά την έναρξη του πειράματος καταμετρήθηκαν στο 2 log₁₀ cfu/g, την 5^η ημέρα οι τιμές του πληθυσμού μειώνονται και φτάνουν το 1,87 log₁₀ cfu/g, ενώ στην συνέχεια μέχρι και την 13^η ημέρα

αυξάνονται μέχρι ο πληθυσμός τους να φτάσει το $4,14 \log_{10} \text{ cfu/g}$. Στον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος ο πληθυσμός ήταν $4,5 \log_{10} \text{ cfu/g}$, ενώ στη λήξη του πειράματος $4,32 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (Σχ.6.7).

Οι ζυμομύκητες, καλλιεργημένοι σε θρεπτικό υλικό YEPD, είχαν γενικά μία αυξητική τάση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Συγκεκριμένα, την ημέρα 0 ήταν μικρότερη του $2 \log_{10} \text{ cfu/g}$, ενώ την 10^η άγγιξε $6,38 \log_{10} \text{ cfu/g}$, στον εμπορικό χρόνο ζωής του (20^η ημέρα) $6,82 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ενώ στην λήξη του πειράματος $6,42 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (Σχ.6.7).

Τέλος, για τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae, οι τιμές των πληθυσμών ήταν σχετικά σταθερές, την 5^η ημέρα ήταν μειωμένος στο $1,54 \log_{10} \text{ cfu/g}$, ενώ στις υπόλοιπες ημέρες του πειράματος μικρότερη του $2 \log_{10} \text{ cfu/g}$.



Σχήμα 3.7: Πληθυσμιακές Μεταβολές του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού (OMX) σε θρεπτικό TSA, των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.* σε θρεπτικό μέσο CFC, των βακτηριών που παράγουν υδρόθειο (H_2S) σε θρεπτικό μέσο IA, των οξυγαλακτικών βακτηριών σε θρεπτικό MRS, των ζυμομυκήτων σε θρεπτικό υλικό YEPD και των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae σε θρεπτικό VRBGA, κατά τη διάρκεια συντήρησής των φιλέτων σε πλαστικές σακούλες, υπό αερόβιες συνθήκες, στους 4°C. Το κάθε σημείο του διαγράμματος αποτελεί τον μέσο όρο των διπλών μετρήσεων.

4. Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως τα τρόφιμα και ειδικότερα τα ιχθυηρά, υπόκεινται σε διάφορες αλλοιώσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε χημικούς, μικροβιακούς ή και φυσικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, η μικροβιακή ανάπτυξη αποτελεί την κύρια αιτία υποβάθμισης της ποιότητας των ιχθυηρών (Dainty, 1996; Dalgaard, 2003; Parlapani et al., 2015). Μια ποικιλία ψυχρότροφων Gram-αρνητικών βακτηρίων όπως τα *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Shewanella* και *Vibrionaceae*, επιτελούν το κύριο τμήμα της αρχικής μικροχλωρίδας ιχθύων που διαβιούν σε θερμά θαλασσινά νερά (Gram and Dalgaard, 2002; Leisner and Gram, 1999; Boziaris and Parlapani 2017).

Όμως μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτή τη μικροχλωρίδα είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση αυτών των προϊόντων, οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) (Parlapani et al., 2013). Το είδος του προϊόντος, δηλαδή ωμό ή ελαφρώς επεξεργασμένο (π.χ. καπνιστό, αλατισμένο, μαριναρισμένο), οι συνθήκες αποθήκευσης (ψύξη, κατάψυξη, τροποποιημένες ατμόσφαιρες), οι φυσικές και χημικές απαιτήσεις για ανάπτυξη και μικροβιακές αλληλεπιδράσεις είναι οι παράγοντες που καθορίζουν την επικράτηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών στα ιχθυηρά (Parlapani, 2021).

Στην παρούσα διπλωματική διατριβή έγινε διερεύνηση της επίδρασης του κιτρικού οξέος, στην αύξηση των πληθυσμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp., των υδροθειούχων βακτηρίων, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των βακτηρίων του γένους *Enterobacteriaceae* καθώς και των ζυμομυκήτων, σε φιλέτα λαβρακιού μαριναρισμένα σε φυσικό χυμό λεμονιού, υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 4 °C. Επίσης μελετήθηκαν οι μεταβολές των

οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων (υφή, γεύση, οσμή, χρώμα), καθώς και οι μεταβολές στον χημικό δείκτη pH.

Τα νωπά φιλέτα ιχθυών, και στην συγκεκριμένη περίπτωση του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*), είναι ευαλλοίωτα προϊόντα τα οποία αρχικά υποβαθμίζονται ποιοτικά και εν τέλει αλλοιώνονται. Η γεύση, η οσμή, η υφή αποτελούν ορισμένα από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τα οποία καθώς μεταβάλλονται, καθιστούν το προϊόν λιγότερο ελκυστικό έως και ακατάλληλο για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Ashie et al., 1996). Ο οργανοληπτικός έλεγχος, ανέδειξε πώς τα φιλέτα ωμού λαβρακιού, μαριναρισμένα σε κιτρικό οξύ, συντηρούμενα υπό συνθήκες αέρος, είχε πολύ υψηλές τιμές αξιολόγησης για όλους τους παράγοντες μέχρι και την ημέρα 16, με τις τιμές να κυμαίνονται από 5 έως και 3,5. Ωστόσο, αυτά τα χαρακτηριστικά υποβαθμίστηκαν με το πέρασμα του χρόνου αποθήκευσης, αφού έπειτα από τον εμπορικό χρόνο ζωής (20 ημέρες) η υφή, κάποιες δυσάρεστες οσμές και η γεύση ήταν τα πιο εμφανή χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν αλλοίωση.

Σύμφωνα με τους Anagnostopoulos et al., (2023), από παρόμοια έρευνα που πραγματοποίησαν σε φιλέτα λαβρακιού υπό διαφορετικές συνθήκες συντήρησης (φιλέτα σε άλμη συνθήκες αέρα, κενού και MAP, ψημένα φιλέτα μαριναρισμένα με οξικό οξύ συνθήκες αέρα και κενού, ωμά φιλέτα μαριναρισμένα με κιτρικό οξύ συνθήκες αέρα και κενού), παρατήρησαν διαφορά στον εμπορικό χρόνο ζωής. Συγκεκριμένα, για τα φιλέτα που μαριναρίστηκαν σε κιτρικό οξύ και συντηρήθηκαν υπό συνθήκες κενού, ο εμπορικός χρόνος ζωής ήταν πολύ μεγαλύτερος (35 ημέρες), εν συγκρίσει με ομοίως συντηρημένα φιλέτα αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες (25 ημέρες). Το συγκεκριμένο γεγονός μπορεί να αποδοθεί κυρίως στον συνδυασμό των δύο μεθόδων συντήρησης, αρχικά η συσκευασία κενού χρησιμοποιείται εκτενώς για την παράταση της διάρκειας ζωής και τη διατήρηση της ποιότητας των φρέσκων και

μεταποιημένων ψαριών. Το προϊόν τοποθετείται σε μεμβράνη χαμηλής διαπερατότητας οξυγόνου, ο αέρας αφαιρείται υπό κενό και η συσκευασία σφραγίζεται. Αυτές οι συνθήκες, δηλαδή τα χαμηλά επίπεδα O₂ και τα αυξημένα επίπεδα CO₂, παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των φρέσκων ψαριών αναστέλλοντας εντέλει την ανάπτυξη αερόβιων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Ashie et al., 1996).

Η συνθήκες συντήρησης όπως η ψύξη και γενικά οι χαμηλές θερμοκρασίες αποτελούν έναν από τους πιο συνήθεις τρόπους συντήρησης των ιχθυηρών. Οι Parlapani et al., (2015), σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε απεντερωμένα λαβράκια, σε αερόβιες συνθήκες υπό ψύξη (2°C) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας υπό ψύξη (2°C), παρατήρησαν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής φτάνει τις 9 έως και 13 ημέρες αντίστοιχα. Πράγματι, η εκτίμηση του εμπορικού χρόνου ζωής για ολόκληρους ιχθύες θερμών υδάτων, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι, κατά την αποθήκευσή τους σε πάγο, είναι μεταξύ 14 και 15 ημερών (Cakli et al. 2006; Cakli et al. 2007; Parlapani et al. 2013). Με το φιλετάρισμα αυτών, αναμένεται μείωση του εμπορικού χρόνου ζωής στις 11 ημέρες, γεγονός που ενδέχεται να σχετίζεται με τον χειρισμό των προϊόντων κατά τη διαδικασία του φιλεταρίσματος, κατά τον οποίο πραγματοποιείται επιμόλυνση της σάρκας με μικροοργανισμούς (Erkan & Ozden, 2006). Η αρκετά εμφανής απόκλιση του εμπορικού χρόνου ζωής της παρούσας διατριβής (20 ημέρες), σε σχέση με τις έρευνες που προαναφέρθηκαν, οφείλεται στη δράση των οργανικών οξέων έναντι της αύξησης των πληθυσμών των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την επέκταση του χρόνου (Sallam, 2007).

Οι τιμές του pH, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές, με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 4,24 και 4,68. Οι τιμές του pH στους ζώντες ιχθύες είναι περίπου 7, ενώ έπειτα από την εξ' αλίευση, επεξεργασία και αποθήκευση τους το pH μπορεί να διαφέρει σημαντικά κυρίως λόγω της εποχής,

το είδος του οργανισμού κ.α. (Cakli et al., 2006). Οι Verdos et al., (2019), αναφέρουν πως τα ψάρια αποτελούν εξαιρετικά ευαλλοίωτα προϊόντα με μικρό εμπορικό χρόνο ζωής, κυρίως εξαιτίας του υψηλού μεταθανάτιου pH (>6), της παρουσίας μεγάλων ποσοτήτων μη πρωτεϊνικού αζώτου, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και διαφόρων αυτολυτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, στην έρευνα τους χρησιμοποιήθηκε μαρινάδα αποτελούμενη από 5% v/v οξικό οξύ (από ξύδι του εμπορίου) και 2% w/v NaCl, για την συντήρηση φιλέτων σαρδέλας. Τα αποτελέσματα τους ανέδειξαν σημαντική μείωση του pH, μετά την δεύτερη ώρα μαριναρίσματος φτάνοντας στο 4, ενώ μέχρι και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας παρέμεινε σχεδόν ανεπηρέαστο. Αντίστοιχα, οι Boziaris et al., (2013), σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποίησαν για τον έλεγχο του εμπορικού χρόνου ζωής παραδοσιακώς συντηρημένων ιχθυηρών (αλατισμένος ή και μαριναρισμένος σε οξικό οξύ γαύρος, μαριναρισμένες σε οξικό οξύ σαρδέλες, εν ψυχρώ καπνιστή πέρκα μαριναρισμένη σε κιτρικό οξύ κ.λπ.), αναφέρουν ότι το αρχικό pH, κατά την έναρξη της αποθήκευσης, έχει καθοριστικό ρόλο για τον εμπορικό χρόνο ζωής. Εμφανίστηκε πώς τα προϊόντα τα οποία είχαν επεξεργαστεί με μαρινάρισμα είτε και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές συντήρησης, εμφάνισαν σημαντικά εκτεταμένο εμπορικό χρόνο ζωής, με μερικές περιπτώσεις να αγγίζει ακόμα και τις 180 ημέρες. Και οι δύο μελέτες, συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής παρόλο που πρόκειται για διαφορετικά φιλέτα ψαριών, αποδεικνύονται ότι το μαρινάρισμα των ιχθυών, το οποίο επιφέρει μείωση του pH, όχι μόνο περιορίζει τον αριθμό των ειδών μικροοργανισμών τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν, αλλά καθυστερεί και την ανάπτυξη των διαφόρων αλλοιογόνων και παθογόνων βακτηρίων τα οποία ευδοκιμούν κατά την διάρκεια της συντήρησης, αυξάνοντας εντέλει τον εμπορικό χρόνο ζωής.

Ως προς την μικροβιολογική ανάλυση παρατηρήθηκε ότι οι κύριοι αλλοιωγόντοι μικροοργανισμοί της παρούσας εργασίας παρατηρήθηκε ότι ήταν οι ζυμομύκητες και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.. Οι πληθυσμοί αυτών στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής ήταν 6,82 και 4,9 αντίστοιχα, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης (25^η ημέρα) ήταν 6,42 και 6,33 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα. Έχει αναφερθεί πως τα είδη μικροοργανισμών *Shewanella putrefaciens* και *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους κύριους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς ιχθύων από εύκρατα νερά τα οποία αποθηκεύονται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gram & Huss, 1996; Koutsoumanis & Nychas, 1999; Koutsoumanis et al., 2000, Boziaris et al., 2011, Fogarty et al., 2019). Τα παραπάνω όμως δεν είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς οι πληθυσμοί των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο (συμπεριλαμβανομένου του *Shewanella putrefaciens*) παρέμειναν σταθεροί καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στο 2 log₁₀ cfu/g, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην επίδραση του κιτρικού οξέος στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τον Sallam (2007), σε παρόμοια μελέτη, αναφέρεται ότι τα άλατα κιτρικού οξέος επιδρούν σημαντικά στους πληθυσμούς των βακτηρίων που παράγουν H₂S, σε κομμάτια σολομού τα οποία εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος (2,5% συγκέντρωσης) και αποθηκευτήκαν στους 1°C. Συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί αυτών εμφανίστηκαν περίπου 2 φορές μικρότεροι (σε λογάριθμους), στα φιλέτα που χρησιμοποιήθηκε το κιτρικό οξύ, εν συγκρίσει των φιλέτων που δεν είχαν μαριναριστεί με αυτό.

Σε συνθήκες ψύξης, συνήθως, δεν παρατηρείται φάση προσαρμογής, δηλαδή οι μικροοργανισμοί ξεκινούν να πολλαπλασιάζονται χωρίς να χρειάζεται να προσαρμοστούν, με τους πληθυσμούς τους να φτάνουν υψηλά επίπεδα σε σχετικά σύντομο χρόνο (Jay et al., 2005). Όμως, οι πληθυσμοί των περισσότερων ειδών

μικροοργανισμών φάνηκε να επηρεάστηκαν αρκετά από την χρήση του κιτρικού οξέος ως μέσου συντήρησης, αφού όχι μόνο μειώθηκε ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός στο $2 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (ημέρα 0) σε όλα τα είδη που ελέγχθηκαν, αλλά ανέστειλε και την μικροβιακή ανάπτυξη τους μέχρι και την ημέρα 5.

Ακόμη, η αρχική OMX της παρούσας μελέτης για τα φιλέτα λαβρακιού ήταν $2 \log_{10} \text{ cfu/g}$, κατά την 10^η μέρα ήταν αρκετά αυξημένη στους $7,03 \log_{10} \text{ cfu/g}$. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Galli et al., (1993), για φιλέτα μπακαλίου αποθηκευμένα σε παρουσία οξυγόνου στους 1°C , η OMX ξεπέρασε τους $7 \log_{10} \text{ cfu/g}$ στις 4 ημέρες. Αντίστοιχα, οι Anagnostopoulos et al. (2023), παρατήρησαν ότι η OMX κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης φιλέτων λαβρακιού σε κιτρικό οξύ, εμφάνιζε σταθερή και αργή αύξηση στα φιλέτα που συντηρούνταν υπό συνθήκες κενού, ενώ σε αερόβιες συνθήκες ο ρυθμός αύξησης ήταν ταχύτερος. Επιπλέον, ο πληθυσμός της OMX στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, ήταν $7,3 \log_{10} \text{ cfu/g}$ για τα φιλέτα σε συνθήκες αέρος, οι συγκεκριμένες τιμές συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Αξίζει να αναφερθεί, ότι ιχθύες αλιευμένοι από διαφορετικές περιοχές εμφανίζουν πληθώρα μικροβιακών πληθυσμών, ενώ στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης κυμαίνεται από 7 έως $9 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (Gram & Huss, 1996).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφία αναφέρουν πως ο συνδυασμός μαριναρίσματος των φιλέτων με κιτρικό οξύ και η συντήρησή αυτών σε συνθήκες αέρος στους 4 °C, οδήγησε στην παράταση του εμπορικού χρόνου ζωής των προϊόντων, αφού μπορούν μέχρι και την 20η ημέρα να κριθούν αποδεκτά και ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση. Αντίστοιχα, τα προϊόντα μέχρι και την 5^η ημέρα αξιολογήθηκαν ως «Άριστα» με βάση την οργανοληπτική τους αξιολόγηση, ενώ μέχρι και την 16^η ημέρα αξιολογήθηκαν ως «Πολύ καλά».

Επιπλέον, η μικροβιακή αλλοίωση των ιχθύων οφείλεται κυρίως στους ζυμομύκητες και στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., τα οποία εμφάνισαν πολύ υψηλούς πληθυσμούς την 25^η ημέρα (λήξη του πειράματος). Τα περισσότερα από τα υπό μελέτη είδη μικροοργανισμών, εμφάνισαν αρχικά χαμηλούς πληθυσμούς με τη σταδιακή αύξησή τους να ξεκινάει μετά την 5^η ημέρα, εξαίρεση αποτέλεσαν οι πληθυσμοί των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο καθώς και των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* τα οποία καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος βρίσκονταν στα όρια ανίχνευσης. Τέλος, οι τιμές του pH δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

Anagnostopoulos D. A., Parlapani F. E., Tsara E., Eirinaki M. G., Kokioumi D., Ampatzidou E. και Boziaris I. S., (2023), "Effect of Physicochemical Characteristics and Storage Atmosphere on Microbiological Stability and Shelf-Life of Minimally Processed European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets", *Foods* , 12, 1145.

Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K., & Haard, N. F. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(1-2), 87-121.

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

Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017). Specific spoilage organisms (SSOs) in fish. In *The microbiological quality of food*. Woodhead Publishing.61-98

Boziaris, I. S., Stamatiou, A. P., & Nychas, G. J. E. (2013). Microbiological aspects and shelf life of processed seafood products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1184–1190.

Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T. and Tolasa S. (2006) Effects of Gutting and Ungutting on Microbiological, Chemical, and Sensory Properties of Aquacultured Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Stored in Ice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 519-527.

- Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T. and Tolasa S. (2007) Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. Science Direct Food Control, 18: 391 – 397.
- Dalgaard, P. (2003). Spoilage of seafood. In B. Caballero, L. C. Trugo, & P. M. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food science and nutrition* (pp. 2462-2472). Academic Press
- Dainty, R.H. (1996). Chemical /biochemical detection of spoilage. International Journal of Food Microbiology, 33, 19–33.
- Erkan Nuray & Ozden Ozkan (2006). Gutted and Un-Gutted Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Stored in Ice: Influence on Fish Quality and Shelf-Life. International Journal of Food Properties, 9: 331-345.
- Fogarty, C., Whyte, P., Brunton, N., Lyng, J., Smyth, C., Fagan, J., & Bolton, D. (2019). Spoilage indicator bacteria in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored on ice for 10 days. Food microbiology, 77, 38-42.
- García-Soto, B., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. P. (2014). Use of citric and lactic acids in ice to enhance quality of two fish species during on-board chilled storage. International Journal of Refrigeration, 40, 390–397.
- Gram, L. & Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology, 33, 121– 137.
- Gram, L. & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology, 13, 262–266.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D. (2005). Modern food microbiology. Seventh edition. Springer, New York

Koutsoumanis, K. & Nychas, G.-J.E. (1999). Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean Boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10 C. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 698–706

Koutsoumanis, K., Taoukis, P.S., Drosinos, E.H. & Nychas, G.-J.E. (2000). Applicability of an Arrhenious model for the combined effect of temperature and CO₂ packaging on the spoilage microflora of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3528–3534.

Leistner L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*. 25, 151-158.

Leisner, J.J., Gram, L.,(1999). Spoilage of fish. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 813 - 820

Mei, J., Ma, X., & Xie, J. (2019). Review on Natural Preservatives for Extending Fish Shelf Life. *Foods*, 8(10), 490.

Nielsen, R., Virtanen, J. & Guillen, J. (editors), (2023). Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF), Economic Report on the EU aquaculture (STECF22-17). NPublications Office of the European Union, Luxembourg, 2023,

Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, K. Ar., & Boziaris, I. S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology*, 33(1), 85–89.

Parlapani F. E., Kormas K. Ar., Boziaris I. S. (2014), "Microbial Changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16s rRNA gene analysis", *J Sci Food Agric* 2015; 95: 2386-2394.

- Parlapani, F. F., Haroutounian, S. A., Nychas, G.-J. E., & Boziaris, I. S. (2015). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C. *Food Microbiology*, 50, 44–53.
- Parlapani F. E., (2021), "Microbial diversity of Seafood", *Current Opinion in Food Science* 2021, 37:45-51.
- Rey, M. S., García-Soto, B., Fuertes-Gamundi, J. R., Aubourg, S., & Barros-Velázquez, J. (2012). Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 217–223.
- Sallam, Khalid. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food control*. 18. 566-575.
- Tsagarida, E., Boziaris, I.S. & Nychas, G.-J.E. (2003). Bacterial Synergism or Antagonism in a Gel Cassette System. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7204–7209.
- Verdos, G. I., Makrigiannis, A., Tsigaras, E., & Boziaris, I. S. (2019). Survival of food-borne bacterial pathogens in traditional Mediterranean anchovy products. *Journal of Food Safety*, 39(1), e12576.

Ελληνική

Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Ι. Θ., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., Τριανταφυλλίδης Α. (2015), "Υδατοκαλλιέργειες, οργανισμοί, συστήματα παραγωγής, προοπτικές", ISBN: 978-960-603-184-7, Σελ. 2, 22 - 24.

Κλαουδάτος Σ. (2005), "Πανεπιστημιακές Παραδόσεις του Μαθήματος «Υδατοκαλλιέργειες & Περιβάλλον»", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Σελ. 4.

Κλαουδάτος Δ. Σ. & Κλαουδάτος Σ. Δ. (2010), " Κατασκευές Υδατοκαλλιεργητικών Συστημάτων", Εκδόσεις ΠΡΟΠΟΜΠΟΣ, ISBN 978-960-7860-81-1, Σελ.9.

Κλαουδάτος Σ. & Κλαουδάτος Ν. (2018), "Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών", Εκδόσεις ΠΡΟΠΟΜΠΟΣ, ISBN 978-960-7860-91-0, Σελ. 13, 169, 243-244.

Μποζιάρης Σ. Ι. (2019α), "Πανεπιστημιακές Σημειώσεις του Μαθήματος «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων»" Σελ. 67.

Μποζιάρης Σ. Ι. (2019β), "Πανεπιστημιακές Σημειώσεις του Μαθήματος «Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων»", Έκδοση 3^η, Σελ. 73,127-128

Νεοφύτου Ν. Χ. (2015), "Βιολογία Ιχθύων & Θαλάσσιων Θηλαστικών", Εκδόσεις University Studio Press, ISBN 976-960-12-2227-1, Σελ. 225.

Παπουτσόγλου Ευστρ. Σωφρόνιος (1997), "Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες", Εκδόσεις ΣΤΑΜΟΥΛΗ Α.Ε, ISBN 960-351-121-8, Σελ. 17-19.

Σφλώμος Κ. & Βαρζάκας Θ. (2019), "Εισαγωγή στην Τεχνολογία & Επιστήμη Τροφίμων", Εκδόσεις ΤΣΟΤΡΑΣ, ISBN 978-618-5309-69-5, Σελ. 136,139.

Ηλεκτρονική

Ετήσια Έκθεση Ελληνικής Υδατοκαλλιέργειας (2023). ΕΛΟΠΥ. https://etheas.gr/wp-content/uploads/2023/10/HAPO_AR23_WEB-Inter-1.pdf – Πρόσβαση στις 16/12/2023.

Brandt, A. R.F.T. von and Amundson, . Clyde H. (2023). aquaculture. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/topic/aquaculture> - Πρόσβαση στις 16/12/2023.

FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en> - Πρόσβαση στις 15/12/2023.

FAO (2023). Dicentrarchus labrax. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Bagni, M.. Fisheries and Aquaculture Division. Rome. Updated 2005-04-06 https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/dicentrarchus_labrax/en - Πρόσβαση στις 18/12/2023.

Froese, R. and D. Pauly. Editors. (2024). FishBase. Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758). Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=126975> - Πρόσβαση στις 03/01/2024.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), FISHERIES. <https://www.fisheries.noaa.gov/feature-story/aquaculture-supports-sustainable-earth> Πρόσβαση στις 15/01/2024.

7. ABSTRACT

Food products, and in particular fish, deteriorate rapidly and eventually become spoiled, making them unsuitable for human consumption, due to changes in the smell, taste, appearance and texture. This process is caused by the microbial activity of a particular category of micro-organisms, the Specific Spoilage Organisms (SSOs). One of the main objectives of the food industry is to control quality during preservation and to extend the commercial shelf life of food products, in this case fish. For this reason, many products are now processed by various techniques and methods, such as marinating, which is the immersion of a product in a solution of edible organic acids, because of their antimicrobial and preservative effects.

The aim of this thesis was to monitor for any changes in the population of specific spoilage organisms, changes in the chemical index pH, as well as changes in the organoleptic characteristics (taste, appearance, colour, texture, odour) of raw sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets marinated in citric acid (from natural lemon juice) and packaged in aerobic conditions during their preservation at 4 °C.

In terms of organoleptic assessment, the condition of the fillets from day 0 to day 5 was rated as 'Excellent' with a score of 5. Subsequently, from day 10 to day 16 the product was assessed as 'Very Good' with an overall score of 4 to 4,5. By day 20 the quality of the fillets had deteriorated considerably with an overall score of 3.5 making it "Good", which was the commercial shelf life of the product. At the end of the experiment (day 25), the fillets had the lowest score (2,5) and were rated as 'Unacceptable'. The chemical pH index from the beginning to the end of the experiment showed no significant changes with values ranging between 4,28 and 4,64.

According to the microbiological evaluation, it was observed that the main spoilage microorganisms of the present study were yeasts and bacteria of the genus

Pseudomonas spp. Their populations at the end of the commercial shelf life were 6.82 and 4.93 $\log_{10}$ cfu/g respectively, while at the end of the storage time (25th day) they were 6.42 and 6.33 $\log_{10}$ cfu/g respectively. Lactic acid bacteria, were part of the bacterial population, but their populations were lower than the previous ones throughout the experiment. Finally, the populations of both hydrogen sulphide (H_2S) producing bacteria and bacteria of the Enterobacteriaceae family did not show any growth with their populations being almost below the detection limit of 2 $\log_{10}$ cfu/g.

Keywords: *Sea bass (Dicentrarchus labrax), Marinating, Citric acid, Commercial lifetime, Specific Spoilage Organisms.*