



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΩΣ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ ΥΠΟ ΨΥΞΗ»**

ΛΑΓΤΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2016

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1. Μποζιάρης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, επιβλέπων,**
- 2. Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος,**
- 3. Ιωάννη Αρβανητογιάννη, Καθηγητής Τεχνολογία Τροφίμων με έμφαση στη Μεταποίηση, την Ποιότητα και την Ασφάλεια, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος,**

Στην οικογένειά μου και τη Θεοδώρα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Γενικά.....	6
1.2 Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	7
1.3 Περιγραφή του είδους και της εκτροφής του.....	8
1.4 Τοπολογία-Βιολογία	10
1.5 Διάρκεια Ζωής των Ιχθυηρών	12
1.6 Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί.....	13
1.7 Συντηρητικά τροφίμων	15
1.8 Το κιτρικό οξύ	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 Γενικά.....	20
2.2 Παραλαβή και αποθήκευση λαβρακίων	20
2.3 Εφαρμογή κιτρικού οξέως.....	20
2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	21
2.5 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	22
2.6 Χημικοί Δείκτες Αλλοίωσης.....	23
2.7 Οργανοληπτική αξιολόγηση	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1 Μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων σε ψύξη	26
3.2 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων σε ψύξη.....	28
3.3 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλλοίωσης κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων σε ψύξη.....	31
3.4 Μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων στους 4°C με και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως	33
3.5 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων στους 4°C με και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως.....	35
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40
ABSTRACT	46

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νωπά ιχθυηρά είναι από τα τρόφιμα με τη μικρότερη διάρκεια ζωής και ο έλεγχος της ποιότητας τους και της επέκτασης του εμπορικού χρόνου ζωής τους αποτελεί έναν από τους βασικότερους στόχους στη βιομηχανία τροφίμων. Κατά τη συντήρησή τους υφίστανται ποιοτική υποβάθμιση και αλλοίωση, δηλαδή μεταβολές οι οποίες καθιστούν το προϊόν ακατάλληλο για κατανάλωση. Μικροβιολογικές και χημικές μεταβολές προκαλούν την αλλοίωση και την αλλαγή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ποιότητας και του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αναλύσεις.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της αύξησης των μικροβιακών πληθυσμών, ο υπολογισμός χημικών δεικτών αλλοίωσης και των οργανοληπτικών μεταβολών κατά τη διάρκεια συντήρησης σε ψύξη για το είδος *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι).

Μελετήθηκαν οι πληθυσμιακές μεταβολές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* sp. και των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο (*Shewanella putrefaciens*). Από τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων προέκυψε ότι ο κυρίαρχος μικροβιακός πληθυσμός σε όλες τις περιπτώσεις είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Ο εμπορικός χρόνος ζωής για την συντήρηση σε πάγο κυμάνθηκε περίπου στις 12 ημέρες, με την τιμή του TVB-N να φθάνει περίπου τα 23 mg/100g και τον ολικό μικροβιακό πληθυσμό περίπου τα 7 log cfu/g.

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας κιτρικού οξέως κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων λαβρακίου στους 4°C. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν παρουσιάστηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή, στους πληθυσμούς των μικροβίων (*Pseudomonas* spp, *Shewanella* spp.), ούτε στη συγκέντρωση του ολικού πτητικού αζώτου, ούτε στον εμπορικό χρόνο ζωής ανάμεσα στους δύο χειρισμούς.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Η συντήρηση συμβάλλει στην σταθεροποίηση των τροφίμων σε σχέση με τους παράγοντες που προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση ή αλλοίωσή τους. Στόχος της συντήρησης είναι η αποφυγή της ανάπτυξης μικροοργανισμών, η επιβράδυνση των αντιδράσεων καταβολισμού, καθώς και ο περιορισμός της απώλειας υγρασίας από το προϊόν και γενικότερα των διάφορων αλλοιώσεων που μπορεί να προκύψουν. Οι αλλοιώσεις των τροφίμων ζωικής προέλευσης προκαλούνται κυρίως από μικροοργανισμούς, οπότε οι περισσότερες μέθοδοι συντήρησης βασίζονται στη λήψη μέτρων για την παρεμπόδιση της αύξησης των μικροοργανισμών (Gram and Huss 1996).

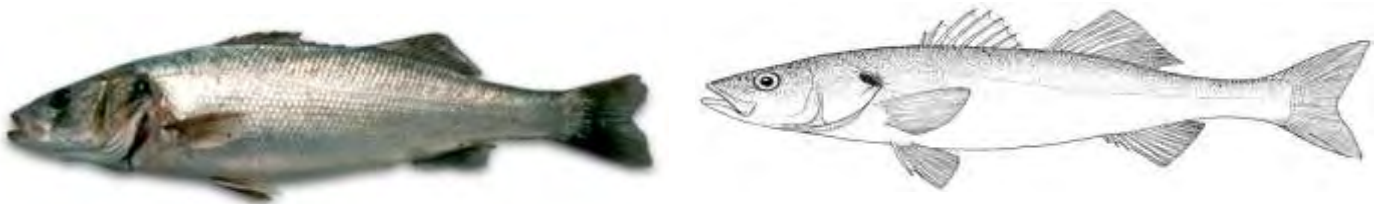
Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στη συντήρηση των αλιευμάτων διότι αποτελούν πολύ ευαίσθητα προϊόντα ως προς την αλλοίωσή τους και η εκτίμηση της φρεσκότητας των νωπών ιχθύων κρίνεται ιδιαίτερος σημαντική. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι για τον προσδιορισμό του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων. Η νωπότητα καθορίζει την ποιότητα τους ως τρόφιμα και για αυτό το λόγο εξειδικευμένοι μέθοδοι μικροβιολογικοί, βιοχημικοί και οργανοληπτικοί χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της νωπότητας και της ποιότητας κατά τη διάρκεια συντήρησης (Olafsoditirr et al, 1992).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετάται η αύξηση των μικροοργανισμών και μετρώνται χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων (*Dicentrarchus labrax*) σε ψύξη. Επίσης πραγματοποιήθηκαν χειρισμοί κατά τους οποίους λαβράκια εμβαπτίζονται σε κιτρικό οξύ και μελετήθηκε η αύξηση του πληθυσμού των Ψευδομονάδων και των βακτηρίων που παράγουν H_2S , αλλά και η συγκέντρωση του ολικού πτητικού αζώτου και η τιμή του pH. Στόχος του πειραματικού σχεδιασμού είναι η μελέτη της επίδρασης του κιτρικού οξέως κατά τη διάρκεια συντήρησης του *Dicentrarchus labrax*.

1.2 Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

Πρόκειται για ένα από τα λεγόμενα «πρώτα» ή ακριβά ψάρια το οποίο έγινε προσιτό και διαδόθηκε στο ευρύ κοινό, μετά την επιτυχή του εισαγωγή στις ιχθυοκαλλιέργειες. Το λαβράκι [*Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)] για αρκετά χρόνια κατατασσόταν στην οικογένεια Serranidae, όταν τελικά το 1994 καταχωρήθηκε στην οικογένεια των Moronidae.

Το λαβράκι έχει σώμα επίμηκες που καταλήγει σε ομόκερκο ουραίο πτερύγιο. Το στόμα του μπορεί να ανοίγει διάπλατα και περιέχει δόντια λεπτά επάνω στις σιαγόνες, τον ουρανίσκο και το φάρυγγα (Loy et al, 2000). Είναι είδος γονοχωριστικό, χωρίς εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που διαχωρίζουν τα 2 φύλα. Το μέγιστο φυσιολογικό μήκος του φτάνει τα 100cm και το βάρος τα 9 kg. Το εμπορεύσιμο μέγεθος στις ιχθυοκαλλιέργειες κυμαίνεται από 250g μέχρι 500g αν και μπορεί να ξεπεράσει αυτό το όριο ανάλογα με τις απαιτήσεις των καταναλωτών.



Εικόνα 1. Εξωτερική μορφολογία του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*).

(http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en)

Πρόκειται για ταχύτατο θηρευτή μακροπανίδας. Κυνηγάει καρκινοειδή, μαλάκια αλλά και ψάρια. Κολυμπάει με γρήγορες κινήσεις του σώματος ή/και του ουραίου πτερυγίου. Το λαβράκι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στα μικρότερα μήκη κύματος φωτός, γεγονός που υποδεικνύει καλύτερη προσαρμογή του ματιού σε ημίφως και μια προτίμηση για δραστηριότητα και κυνήγι τις ώρες του δειλινού (Marchesan et al., 2005). Είναι είδος ευρύθερμο και ευρύαλο, που συναντάται σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου και μετακινείται

στις λιμνοθάλασσες και τις εκβολές ποταμών για τα πρώτα χρόνια της ζωής του. Επιστρέφει στη θάλασσα για να αναπαραχθεί (Kelley, 1988). Βρίσκεται σε βάθη μεταξύ 10 και 100 μέτρων. Τα νεαρά άτομα σχηματίζουν κοπάδι, ενώ τα ενήλικα λιγότερο (Herskin and Steffensen, 1998).

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) έχει επίμηκες σώμα, με δυο επίπεδα αγκαθιών. Το κεφάλι φέρει κυκλοειδής σχηματισμούς. Το στόμα είναι μέτρια εκτατό. Έχει δυο χωριστά ραχιαία πτερύγια, το πρώτο έχει 8-10 αγκάθια και το δεύτερο ένα αγκάθι και 12 ή 13 μαλακές ακτίνες, πρωκτικό πτερύγιο με τρία αγκάθια και 11 - 12 μαλακές ακτίνες (Εικόνα 1). Έχει μια πλευρική γραμμή που εκτείνεται μέχρι το πτερύγιο της ουράς, το οποίο είναι μέτρια διχαλωτό. Έχει αργυρόχρουν γκρι χρώμα με υποκύανη χροιά στο πίσω μέρος, αργυρόχρωμο στα πλάγια και υποκίτρινο χρώμα μερικές φορές στην κοιλιά. Τα νεαρά ψάρια συχνά φέρουν σκούρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματός του σε αντίθεση με τα ενήλικα ψάρια που δεν φέρουν καθόλου κηλίδες. Το μέσο συνολικό μήκος των αρσενικών κυμαίνεται από 25-35 cm, ενώ το μέγιστο ανέρχεται στα 103 cm. Το μέσο βάρος κυμαίνεται από 400-600g, ενώ το μέγιστο βάρος που έχει καταγραφεί είναι 12,0 Kg. Τέλος η μέγιστη καταγεγραμμένη ηλικία είναι 15 ετών.

1.3 Περιγραφή του είδους και της εκτροφής του

Η συστηματική κατάταξη του λαβρακιού *Dicentrarchus labrax* έχει ως εξής (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13489>):

Κλάση: **Osteichthyes**

Υπέρταξη: **Actinopterygii**

Τάξη: **Perciformes**

Υπόταξη: **Percoidei**

Οικογένεια: **Moronidae**

Γένος: **Dicentrarchus**

Είδος: **D. labrax**

Το λαβράκι είναι είδος ιχθύος κοινό της Μεσογείου και των ανατολικών ακτών του Ατλαντικού Ωκεανού (Jennings and Pawson, 1992). Θεωρείται ένα από τα καλύτερα εδέσματα, γι' αυτό άλλωστε έχει αρκετά υψηλή τιμή στην αγορά. Πρόκειται για σαρκοφάγο και εξαιρετικά αδηφάγο είδος. Στο φυσικό περιβάλλον τρέφεται με άλλα είδη ιχθύων, καρκινοειδή, μαλάκια κ. α. (Leaute, 1984; Kelley, 1988). Είναι ευρύαλο είδος, προτιμά όμως τα υφάλμυρα νερά όπου βρίσκεται συνήθως κατά τους ανοιξιάτικους μήνες ενώ επιστρέφει σε θαλάσσια νερά κατά την περίοδο της αναπαραγωγής (Pawson and Pickett, 1996). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα θηλυκά άτομα δεν ωριμάζουν γεννητικά αν η αλατότητα του νερού δεν είναι πάνω από 10 ‰. Εξ' αιτίας της ικανότητας του να προσαρμόζεται εύκολα σε μεταβολές της αλατότητας, φαίνεται να μπορεί να αναπτυχθεί επιτυχώς ακόμα και σε γλυκά νερά (Cataudella et al., 1991; Venturini et al., 1992). Απαντάται συχνά σε νερά λιμνοθαλασσών (estuaries) και ακτών αμμώδους πυθμένα αυξημένης θολότητας, καθώς και στις περιοχές των λιμανιών (Papoutsoglou et al., 1998). Το λαβράκι είναι ευρύθερμο είδος ιχθύος και μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασίες νερού του εύρους 2-32 °C (Papoutsoglou et al., 1998) Καλύτερη ανάπτυξη επιτυγχάνεται στο εύρος 20- 25 °C, ενώ στη θερμοκρασία των 10 °C σταματά να αναπτύσσεται και σε τιμές μικρότερες από 7 °C σταματά να διατρέφεται (Hidalgo and Alliot, 1988; Pastoureaud, 1991; Dalla Via et al, 1998) Για την αναπαραγωγή του όμως, η οποία στο φυσικό περιβάλλον πραγματοποιείται 124 κατά τους μήνες Ιανουάριο-Μάρτιο, απαιτείται θερμοκρασία νερού 13-19 °C (Prat et al, 1990). Σήμερα, στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, ελέγχονται όλα τα στάδια της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, για την πρόκληση της γεννητικής ωριμάσεως, συνήθως χορηγούνται, σε μία ή δύο δόσεις (ενέσιμη μορφή), διαλύματα ορμονών (κυρίως ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη, αλλά και διάλυμα υποφύσεως κυπρίνου ή και LHRH). Η συγκέντρωση των ορμονών ποικίλει ανάλογα με το στάδιο της φυσικής γεννητικής ωριμότητας στην οποία βρίσκονται οι ιχθύες (Alvarino et al., 1992). Πρέπει ωστόσο σε αυτό το σημείο να αναφερθεί, και η επιτυχής, από πολλούς ερευνητές, πρόκληση της γεννητικής ωριμάσεως χωρίς τη χρησιμοποίηση ορμονών, αλλά με

την εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών φωτοπεριοδισμού και θερμοκρασιών (Devauchelle and Coves, 1988; Carillo, et al., 1989; Melotti et al., 1991). Για την επώαση και την εκκόλαψη των γονιμοποιημένων αυγών και την ανάπτυξη των λεκιθοφόρων και νεαρών ιχθυδίων, απαιτούνται απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες, οι οποίες πρέπει να προσομοιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο στις αντίστοιχες του φυσικού περιβάλλοντος. Έτσι, μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας έχουν παρατηρηθεί όταν η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται από 13 έως 20 °C, η αλατότητα από 34 έως 37 ‰, το pH από 7,9 έως 8,2 και το δεσμευμένο οξυγόνο από 6 έως 9 ppm. Τα νεαρά άτομα λαβρακιού, μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, διατρέφονται αρχικά με ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς (*Brachionus plicatilis*, ναύπλιοι, μεταναύπλιοι και τέλεια άτομα *Artemia salina*) μέχρι να αρχίσουν να καταναλώνουν τεχνητά σιτηρέσια.

Η κύρια εκτροφή του λαβρακιού, η οποία συνήθως συνδυάζεται με την εκτροφή της τσιπούρας, πραγματοποιείται σήμερα με όλα τα γνωστά συστήματα παραγωγής, επικρατούν όμως τα ημιεντατικά και εντατικά συστήματα, με τη χρήση δεξαμενών, τεχνητών υδατοσυλλογών και κυρίως πλωτών κλωβών στις παράκτιες θαλάσσιες περιοχές σχεδόν όλων των μεσογειακών χωρών (Papoutsoglou et al., 1996). Χρησιμοποιούνται όμως και ημικλειστά συστήματα, ενώ πολλά υπόσχεται η χρήση εντατικών συστημάτων σε κλειστά ή ημίκλειστα κυκλώματα (Papoutsoglou et al., 1998). Τέλος, έχει αναφερθεί η επιτυχής αξιοποίηση μεγάλων εκτάσεων αλυκών για την εκτροφή του λαβρακιού με εκτατικά ή ημιεντατικά συστήματα παραγωγής (Drake and Agias, 1993), καθώς και η δυνατότητα συνεκτροφής με μη ανταγωνιστικά, ως προς την ηθολογία και τις διατροφικές συνήθειες είδη ιχθύων. Στην Ελλάδα, το λαβράκι εκτρέφεται σχεδόν αποκλειστικά σε πλωτούς κλωβούς και φτάνει το εμπορεύσιμο μέγεθος (250-300 g) σε 16-18 μήνες περίπου.

1.4 Τοπολογία-Βιολογία

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) συναντάτε στη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα όπως επίσης και κατά μήκος των ανατολικών ακτών του Ατλαντικού ωκεανού από τη

Νορβηγία, νοτιότερα το Μαρόκο ως τα Κανάρια Νησιά και τη Σενεγάλη. Αναφορές υπάρχουν και για την Ισλανδία. Το λαβράκι ευδοκιμεί σε μεγάλο εύρος θαλάσσιων θερμοκρασιών (είναι ευρυθερμικό) (8-24°C) και σε μεγάλο εύρος αλατότητας με αποτέλεσμα να συναντάται σε παράκτια ύδατα, σε εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες. Μερικές φορές κολυμπάνε ανάποδα από το ρεύμα που υπάρχει σε φρέσκα ύδατα. Τα ενήλικα ψάρια κατοικούν σε παράκτια ύδατα μέχρι βάθους 100m αλλά πιο συχνά συναντώνται σε ρηγά ύδατα. Το καλοκαίρι κατοικούν σε παράκτια ύδατα και εκβολές ποταμών, ενώ το χειμώνα μεταναστεύουν σε ψυχρότερα κλίματα και πιο βαθιά ύδατα βορειότερων περιοχών. Τα νεαρά ψάρια σχηματίζουν αγέλη, σε αντίθεση με τα ενήλικα ψάρια.

Υπάρχει μια μόνη αναπαραγωγική περίοδος το χρόνο, η οποία είναι το χειμώνα (Δεκέμβρη – Μάρτη) για τα ψάρια της Μεσογείου και μέχρι τον Ιούνιο για τα ψάρια του Ατλαντικού και συγκεκριμένα την Άνοιξη για τα ψάρια που βρίσκονται κοντά στη Μεγάλη Βρετανία. Το λαβράκι αναπαράγεται σε ομάδες. Το λαβράκι γεννά μικρά αυγά (1,02-1,39 mm) σε νερά με αλμυρότητα μικρότερη του 35‰, κοντά σε εκβολές ποταμών ή σε περιοχές όπου η αλμυρότητα είναι μεγαλύτερη (> 30‰). Δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε χαμηλές θερμοκρασίες, μερικά ψάρια ενδέχεται να παραμείνουν όλο το χειμώνα σε παράκτιες λιμνοθάλασσες, αντί να επιστρέψουν στην ανοιχτή θάλασσα. Τα ανήλικα ψάρια τρέφονται με ασπόνδυλα ψάρια, ενώ τα ενήλικα λαβράκια είναι κυνηγοί και η διατροφή του περιλαμβάνει ψάρια, καβούρια, σουπιές, γαρίδες και μαλάκια.

Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής τα αρσενικά είναι δυο με τριών ετών και έχουν μήκος 23-30 cm και βάρος 350- 400 g, ενώ τα θηλυκά είναι τριών με τεσσάρων ετών, έχουν μήκος 31-40 cm. Το θηλυκό γεννά αυγά που έχουν διάμετρο 1,1-1,2 mm, τα οποία μετά από 7-10 μέρες γίνονται larva και μετά από 75 μέρες ζυγίζουν 1,5-2,5g και επιστρέφουν στην ανοιχτή θάλασσα ή χρησιμοποιούνται για ιχθυοκαλλιέργεια. Στους επόμενους 37 μήνες το βάρος του ψαριού θα φτάνει τα 400g.

1.5 Διάρκεια Ζωής των Ιχθυηρών

Η παρακολούθηση της ποιότητας των ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους και ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής τους αποτελεί ένα από τα κυριότερα πεδία έρευνας και απασχολεί όλους όσους εμπλέκονται στην ψυκτική αλυσίδα των προϊόντων αλιείας (Boziaris, 2014, Boziaris et al., 2013; Parlapani et al., 2014 a; b). Ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων έχει πραγματοποιηθεί σχετικά με τις οργανοληπτικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της συντήρησης των ιχθυηρών σε θερμοκρασίες ψύξης και η διάρκεια ζωής τους παρουσιάζει σημαντική διακύμανση ανάλογα με το είδος τους και την προέλευσή τους (Gram & Huss, 1996; Ghaly et al., 2010; Parlapani et al., 2014a;).

Η διακύμανση αυτή δείχνει καθαρά την επίδραση της ενδογενούς μικροχλωρίδας, καθώς και άλλων παραγόντων που συζητήθηκαν προηγουμένως, στη ποιότητα των ιχθυηρών και τονίζει ταυτόχρονα την πολυπλοκότητα της διαδικασίας της αλλοίωσης. Ωστόσο, τα δεδομένα μπορούν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι το σύνολο των δειγμάτων αλλοιώνεται μέσα σε ένα χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων και μόνο λίγα είδη παρουσιάζουν διάρκεια ζωής κοντά στις 3 εβδομάδες (Ghaly et al., 2010).

Όσον αφορά τη διάρκεια ζωής των ιχθυηρών του γλυκού νερού η διακύμανση που παρουσιάζεται είναι μικρότερη. Παρόλα αυτά η διατηρησιμότητά τους δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από αυτή των ιχθυηρών του αλμυρού νερού και κυμαίνεται από 8 έως 20 ημέρες ανάλογα την θερμοκρασία ψύξης που συνήθως κυμαίνεται για τα ιχθυηρά από 0 έως 5°C, με βέλτιστο τους 0-2°C.

Πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό, ότι ενώ η αλλοίωση των ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους υπό θερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης έχει ερευνηθεί σε ευρεία κλίμακα, πολύ λιγότερη προσοχή έχει δοθεί στη επίδραση υψηλών θερμοκρασιών συντήρησης (20-30 °C). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη σχετικά καλών ψυκτικών συστημάτων διανομής στις χώρες του βόρειου ημισφαιρίου. Ωστόσο σε πολλές μη ανεπτυγμένες περιοχές κυρίως του νότιου ημισφαιρίου δεν χρησιμοποιείται ψύξη κατά τη διάρκεια της διανομής. Γενικά, η

συντήρηση των ιχθυηρών σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία αλλοίωση τους. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι η διάρκεια ζωής των διαφόρων ειδών ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασίες 9-20 °C είναι μικρότερη από δύο ημέρες (Smith et al., 1980).

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω εργασιών είναι φανερό ότι τα προϊόντα αλιείας αλλοιώνονται με πολύ ταχύ ρυθμό όταν δεν εφαρμόζεται κανένα μέσο συντήρησης, ενώ η ψύξη είναι ένας από τους πιο δραστικούς παράγοντες για την επιβράδυνση της αλλοίωσης. Η επίδραση της ψύξης όμως έχει διαπιστωθεί ότι εξαρτάται και από την προέλευση του προϊόντος. Ενώ, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα ιχθυηρά από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη αλλοιώνονται σε ένα διάστημα δύο εβδομάδων, η διάρκεια ζωής αυτών από την τροπική ζώνη είναι πολύ μεγαλύτερη (Shewan, 1977, Curran and Disney, 1979).

Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η διατηρησιμότητα ιχθυηρών από την ανατολική Αφρική ξεπερνά τις τρεις εβδομάδες (Watanabe, 1965). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η υψηλότερη θερμοκρασία των νερών στις περιοχές αυτές παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην επιλογή της ενδογενούς μικροχλωρίδας των ιχθυηρών της οποίας η ανάπτυξη παρεμποδίζεται σημαντικά σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η παραπάνω παρατήρηση οδηγεί για μια ακόμα φορά στο συμπέρασμα ότι η αλλοίωση είναι μια περισσότερο δυναμική παρά στατική διαδικασία της λειτουργία της οποίας εξαρτάται από έναν μεγάλο αριθμό ενδογενών και εξωγενών παραγόντων.

1.6 Ειδικό Αλλοιογόνο Μικροοργανισμοί

Η μικροβιακή χλωρίδα των φρέσκων ιχθυηρών εξαρτάται περισσότερο από το περιβάλλον και λιγότερο από το είδος τους (Shewan, 1977). Η ενδογενής μικροχλωρίδα των ιχθυηρών που προέρχονται από ψυχρά και εύκρατα νερά έχει μελετηθεί για πολλά χρόνια με αποτέλεσμα να έχουν προκύψει γενικά συμπεράσματα

αν και η ταξινομική κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί έχει

υποστεί σημαντικές αλλαγές μέχρι σήμερα.

Υπό κανονικές συνθήκες, η ενδογενής χλωρίδα των ιχθυηρών από εύκρατα κλίματα κυριαρχείται από Gram αρνητικούς βακίλους που κατά κανόνα ανήκουν στα γένη *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Vibrio* και *Aeromonas*. Gram θετικοί οργανισμοί όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Coryneforms* και *Clostridium* έχουν επίσης βρεθεί σε διάφορες αναλογίες. Η αναλογία των Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων ποικίλει αλλά γενικά τα κατά Gram θετικά βακτήρια κυμαίνονται από 0-30% της συνολικής χλωρίδας (Shewan et al., 1960; Liston, 1960). Ο συνολικός αριθμός των οργανισμών παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις. Ο Liston (1960) ανέφερε ότι ο αριθμός των μια κανονική Gram θετικών βακτηρίων μπορεί να κυμαίνεται από 10²-10⁷ cfu/g.

Ο συνολικός πληθυσμός ιχθυηρών από εύκρατα κλίματα στο τέλος της διάρκειας ζωής τους και όταν αυτά συντηρούνται σε πάγο κυμαίνεται από 10⁷-10¹⁰ cfu/g. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Shewanella putrefaciens* τα οποία αποτελούν το 80-100 % της συνολικής χλωρίδας των αλλοιωμένων ιχθυηρών (Gram and Huss, 1996; Gram and Dalgaard, 2002; Liston, 1960; Shewan et al., 1960). Αυτό πιστεύεται ότι συμβαίνει λόγω του μικρού χρόνου διπλασιασμού που παρουσιάζουν τα παραπάνω βακτήρια στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Χαμηλές θερμοκρασίες διατήρησης οδηγούν στην κυριαρχία μικροχλωρίδας αποτελούμενης κυρίως από *Pseudomonas spp.*, *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium photoshoreum*, *Aeromonas spp*, *Alteromonas putrefaciens* προκαλώντας αλλοιώσεις στα νωπά αλιεύματα (Bozaris et al., 2013; Parlapani et al., 2014a). Επίπροσθετα, διαφορετικές θερμοκρασίες και ατμόσφαιρες επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη σύνθεση της αλλοίωσης της μικροχλωρίδας των ιχθύων κατά τη συντήρηση. Σε συντήρηση στους 0 έως 5 °C και στον αέρα κυριαρχούν οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas fluorescens*, *Psychrobacter* και *Macroccoccus caseolyticus*. Ενώ έχουν βρεθεί και νέα κυρίαρχα είδη κατά τη συντήρηση στους 5 °C, όπως οι *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens* και *Vagococcus*

fluvialis (Parlapani et al., 2014b). Μετά από παρατεταμένη αποθήκευση ιχθύων σε συνθήκες κατάψυξης τα είδη *Pseudomonas* και *Shewanella* αποτελούν το 80% της τελικής μικροχλωρίδας. Επίσης, σε υψηλότερες θερμοκρασίες, η μικροχλωρίδα των ιχθυηρών που συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες κυριαρχείται από μεσόφιλα βακτήρια των οικογενειών *Vibrionaceae* και *Enterobacteriaceae* (Papadopoulos et al., 2003).

1.7 Συντηρητικά τροφίμων

Με τον όρο «συντηρητικά» εννοούμε ουσίες που μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια της ζωής ενός τροφίμου, παρεμποδίζοντας ή αποτρέποντας τον αποχρωματισμό, την αποσύνθεση ή οποιαδήποτε άλλη αλλοίωση (Russell & Gould, 2003; Μπόσκου, 1997). Ο χρόνος ανάμεσα στην παραγωγή και την κατανάλωση των τροφίμων, συνιστά σε αρκετές περιπτώσεις την χρήση των συντηρητικών για την αποφυγή των αλλοιώσεων στο χρώμα και στη γεύση των τροφίμων. Πολλοί μικροοργανισμοί συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων και των βακτηρίων επηρεάζουν την εμφάνιση, τη γεύση και τη διατροφική αξία των προϊόντων (Μπόσκου, 1997).

Επιπλέον, ορισμένοι εξ αυτών παράγουν τοξίνες, που θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Το ατμοσφαιρικό οξυγόνο μπορεί επίσης να αλλοιώσει τα τρόφιμα, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την ανάπτυξη δυσσομίας των λιπών. Ο όρος «συντηρητικό» έχει διευρυμένη σημασία και δεν αναφέρεται μόνο στην καταστολή της δράσης των μικροβίων, αλλά και στην παρεμπόδιση της χημικής και βιοχημικής υποβάθμισης. Η δράση των συντηρητικών είναι διττή. Δεν έγκειται μόνο στο θάνατο των βακτηρίων (βακτηριοκτόνος δράση), αλλά και στην καθυστέρηση της δράσης τους, καταστέλλοντας την ενεργότητά τους (βακτηριοστατική δράση). Ένα συντηρητικό μπορεί σε ορισμένη συγκέντρωση να θανατώνει τα βακτήρια, σε μικρότερη συγκέντρωση όμως, να παρεμποδίζει την ανάπτυξη τους και σε μεγαλύτερες αραιώσεις να μην είναι αποτελεσματικό (Russell & Gould, 2003).

Για να μπορέσει ένα συντηρητικό τροφίμων να χρησιμοποιηθεί για τους λόγους που

προαναφέρθηκαν, πρέπει να πληροί της εξής προϋποθέσεις

- να μην είναι τοξικό
- να είναι άμεσα διαλυτό
- να είναι οικονομικό και πρακτικό στη χρήση και
- να εμφανίζει αντιμικροβιακές ιδιότητες στο εύρος του pH για το εκάστοτε τρόφιμο.

Πρέπει να είναι δηλαδή δραστικό έναντι των μικροοργανισμών που πιθανόν να αναπτύσσονται στο τρόφιμο. Επιπρόσθετα, δεν θα πρέπει να αδρανοποιείται από το τρόφιμο ή από ουσίες που παράγονται από το μεταβολισμό των μικροβίων. Αν μάλιστα είναι μικροβιοκτόνο, θα πρέπει να αποσυντίθεται σε αβλαβή προϊόντα ή να μπορεί να καταστρέφεται σε υψηλή θερμοκρασία. Τέλος, δεν θα πρέπει να δημιουργεί ανθεκτικά στελέχη μικροοργανισμών (Αργυράκος, 2011).

Σε όλη τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας, ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα ήταν η διατήρηση της τροφής αναλλοίωτης, για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ένα μεγάλο μέρος της αγροτικής παραγωγής, χάνεται μετά τη συλλογή, λόγω μικροβιακής ανάπτυξης ή οξείδωσης.

Ο καπνός ήταν ο πρώτος παράγοντας συντήρησης τροφίμων που ανακαλύφθηκε. Το μαγειρικό αλάτι χρησιμοποιείται και αυτό από πάρα πολύ παλιά. Οι Αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν ξίδι, λάδι και μέλι για τη διατήρηση των τροφίμων τους. Το διοξείδιο του θείου χρησιμοποιούνταν ως ατμογόνο στην αρχαία Ελλάδα, στην Ασσυρία και στην Κίνα. Στο μεσαίωνα, το συγκεκριμένο συντηρητικό χρησιμοποιούνταν ευρέως στην Ευρώπη για τη διατήρηση του κρασιού και για άλλες τέτοιες εφαρμογές. Για πρώτη φορά τέθηκαν σε ισχύ κανόνες για τη ρύθμιση της χρήσης του θείου στην παραγωγή κρασιού στα τέλη του 15^{ου} αιώνα. Η διατήρηση των τροφίμων σε άλμη εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Beukels το 13ο αιώνα. Κανένα άλλο συντηρητικό δεν χρησιμοποιήθηκε μέχρι τα τέλη του 18ου αιώνα, όταν ο Hoffer χρησιμοποίησε μία ουσία με την ονομασία βόραξ (ένυδρο βρωμιούχο νάτριο).

Συνθετικά χημικά συντηρητικά χρησιμοποιήθηκαν στην αρχή του 20ου αιώνα, η ευρεία χρήση των οποίων οδήγησε σε μεγαλύτερες περιόδους συντήρησης των τροφίμων (Αργυράκος, 2011).

1.8 Το κιτρικό οξύ

Το κιτρικό οξύ είναι ένα ασθενές οργανικό τρικαρβοξυλικό οξύ (Εικόνα 2). Είναι διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο, κυρίως στα λεμόνια και τα άλλα εσπεριδοειδή, το ακτινίδιο, τις φράουλες και πολλά άλλα φρούτα. Είναι εξαιρετικό φυσικό συντηρητικό, ενώ χρησιμοποιείται και ως ρυθμιστής οξύτητας και αρωματικό συστατικό. Είναι ενδιάμεσο ενός κύκλου μεταβολισμού των σακχάρων στους ζωντανούς οργανισμούς, μεγάλης βιολογικής σημασίας (κύκλος κιτρικού οξέος – κύκλος του Krebs), μέρος της διαδικασίας κατά την οποία οι ζωντανοί οργανισμοί μετατρέπουν την τροφή σε ενέργεια.

Σε κανονικές συνθήκες είναι σε μορφή άχρωμης κρυσταλλικής σκόνης. Απαντάται είτε σε άνυδρη μορφή είτε σε ένυδρη, η οποία περιέχει ένα μόριο νερού για κάθε μόριο κιτρικού οξέος. Το άνυδρο κιτρικό οξύ κρυσταλλώνεται από διάλυμα με ζεστό νερό ενώ η ένυδρη μορφή από διάλυμα με κρύο νερό. Το τελευταίο μετατρέπεται στην άνυδρη μορφή με θέρμανση πάνω από τους 74 °C.

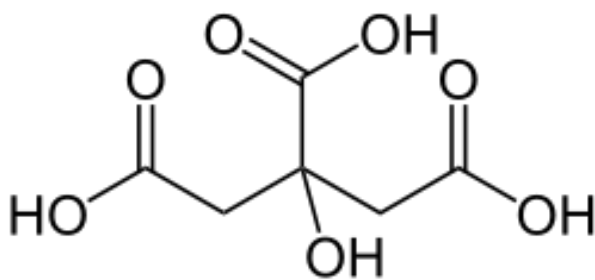
Διαλύεται εύκολα στο νερό, στην αλκοόλη και στον αιθέρα. Ανήκει στην οικογένεια των καρβοξυλικών οξέων και έχει τις χημικές ιδιότητες των καρβοξυλικών οξέων και των υδροξυενώσεων.

Η ανακάλυψη του κιτρικού οξέος αποδίδεται στον αλχημιστή Jabir Ibn Hayyan τον 8ο αιώνα. Για πρώτη φορά απομονώθηκε το 1784 από τον Σουηδό χημικό Carl Wilhelm Scheele κατά τη διάρκεια ενός πειράματος με χυμό λεμονιού. Το κιτρικό οξύ 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.

Στη δεύτερη μέθοδο, το σάκχαρο υφίσταται ζύμωση μέχρι 50% προς κιτρικό οξύ. Στο φιλτραρισμένο αραιό διάλυμα κιτρικού οξέος προστίθεται υδροξείδιο του ασβεστίου οδηγώντας στην κατακρήμνιση αδιάλυτου κιτρικού ασβεστίου, το οποίο στη συνέχεια κατεργάζεται με θειικό οξύ για να δώσει κιτρικό οξύ και θειικό ασβέστιο ως παραπροϊόν.

Το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται ως αρωματικό και συντηρητικό στις τροφές και τα ποτά, κυρίως τα μη αλκοολούχα (π.χ. λεμονάδες). Ως πρόσθετο τροφίμων επισημαίνεται με τον κωδικό E330.

Το κιτρικό οξύ θεωρείται ασφαλές για χρήση στα τρόφιμα και δεν είναι καρκινογόνο. Είναι κανονικό συστατικό των κυττάρων, αποικοδομείται και χρησιμοποιείται από το σώμα χωρίς παρενέργειες. Έχουν αναφερθεί ψευδοαλλεργικές αντιδράσεις (δυσανεξία), αλλά είναι σπάνιες. Επαφή με σκόνη κιτρικού οξέος ή πυκνού διαλύματος αυτού μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα ερεθισμό των ματιών και του δέρματος. Γι' αυτό το λόγο κατά τη διαχείρισή του είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλης προστατευτικής ενδυμασίας, γαντιών και προστατευτικών γυαλιών.



Εικόνα 2. Χημικός τύπος του κιτρικού οξέως

Ο μηχανισμός δράσης των οργανικών οξέων ως προς τους μικροοργανισμούς βασίζεται στη δραστική αλλαγή του pH του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται οι μικροοργανισμοί. Η θεμελιώδης αρχή αυτής της επίδρασης είναι ότι τα μη ιονισμένα οργανικά οξέα μπορούν να διαχέονται στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών και να διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία και ομοιόστασή τους,

αλλάζοντας το pH. Μετά την παθητική διάχυση οργανικών οξέων στο εσωτερικό των μικροοργανισμών, όπου το pH είναι ουδέτερο ή ελαφρώς βασικό, τα οξέα θα απελευθερώσουν ιόντα υδρογόνου και θα μειώσουν το εσωτερικό pH, οδηγώντας σε περιορισμό ή παύση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Επίσης, το ανιοντικό μέρος των οργανικών οξέων, που δεν μπορεί να βγει έξω από τα βακτήρια στην ιοντική του μορφή, θα συσσωρευθεί στο εσωτερικό τους και θα σταματήσει πολλές μεταβολικές λειτουργίες τους, με αποτέλεσμα την αύξηση της οσμωτικής πίεσης και τελικώς τον θάνατο των μικροοργανισμών (Hall et al., 1995; Hill et al., 1995).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά

Στο πλαίσιο της παρούσας πειραματικής εργασίας μελετήθηκαν ο μικροβιολογικός πληθυσμός οι χημικοί δείκτες αλλοίωσης και οι οργανοληπτικές αλλαγές (α) ολόκληρου λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) και (β) φιλέτων λαβρακιού με την προσθήκη ή όχι κιτρικού οξέως, κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία 0 °C

Πιο αναλυτικά μελετήθηκαν:

α) οι μεταβολές του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών κατά την αποθήκευση των ολόκληρων λαβρακίων και των φιλέτων με ή χωρίς προσθήκη κιτρικού σε θερμοκρασία 0 °C. Ειδικότερα, μελετήθηκαν η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) οι Ψευδομονάδες (*Pseudomonas sp.*) και τα βακτήρια που παράγουν H₂S (*Shewanella putrefaciens*).

β) οι οργανοληπτικές μεταβολές του ολόκληρου λαβρακιού

γ) ο προσδιορισμός των χημικών δεικτών αλλοίωσης ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N) και τριμεθυλαμίνη (TMA) κατά τη διάρκεια συντήρησης

δ) η μεταβολή του pH στη σάρκα των λαβρακίων ανάλογα με το χρόνο

2.2 Παραλαβή και αποθήκευση λαβρακίων

Τα λαβράκια αμέσως μετά την εξαλίευσή τους τοποθετούνταν σε κυτία από φελιζόλ στα οποία τοποθετούνταν τριμμένος πάγος σε αναλογία 1:1 (w/w), και εντός τεσσάρων ωρών μεταφέρονταν στο εργαστήριο. Οι θερμοκρασία αποθήκευσης ήταν 0°C (πάγος) όπου και γινόταν προσθήκη τριμμένου πάγου ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία αποθήκευσης.

2.3 Εφαρμογή κιτρικού οξέως

Αφού έγινε παραλαβή των ιχθύων σε πάγο -τα λαβράκια ήταν ανάμεσα σε στρώσεις πάγου και νύλων-, φιλέτα από λαβράκια εμβαπτίστηκαν σε κιτρικό οξύ 1% (pH: 5, 1) ενώ

άλλα εμβαπτίστηκαν σε νερό (pH: 5, 1) και αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Στη συνέχεια έγινε συλλογή της σάρκας με την κατάλληλη ποσότητα για κάθε είδος μέτρησης, ενώ όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν ασηπτικά 10g από τη σάρκα του λαβρακίου, το οποίο τοποθετούνταν σε αποστειρωμένη σακούλα και προσθέτονταν 90ml Maximum Recovery Diluent (MRD-0.85% NaCl, 0.1% βακτηριολογική πεπτόνη). Πραγματοποιούνταν ομογενοποίηση του δείγματος σε συσκευή τύπου Stomacher για 1 min και ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις. Ο εμβολιασμός του βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα έγινε με δύο τεχνικές ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα:

1) Με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) που αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0,1ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό. Εφαρμόζεται γενικά στους αερόβιους μικροοργανισμούς.

2) Με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique) που αποτελείται από τα εξής στάδια: α) Τοποθέτηση γνωστού όγκου (1ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε τρυβλίο και β) μετάγγιση θρεπτικού υλικού που περιέχει άγαρ θερμοκρασίας 45 οC (ρευστή κατάσταση). Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται γενικά στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς.

Όλα τα μικροβιολογικά υλικά προμηθεύτηκαν από την εταιρεία LABM (Lancashire UK), εκτός από το Streptomycin Thallate Actidione Agar (STAA) του οποίου η προμήθεια έγινε από τη Biolife (Biolife Italiana Srl, Milano)

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Ο προσδιορισμός της OMX έγινε με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA) και επώαση για 48 h στους 25 οC

- Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* sp.)

Η καταμέτρηση των Ψευδομονάδων έγινε με επιφανειακή επίστρωση στο θρεπτικό υπόστρωμα Ceftrimide Fusidin Cephaloridine agar (CFC), και επώαση για 48 h στους 25

- Βακτήρια που παράγουν H₂S (*Shewanella putrefaciens*)

Ο προσδιορισμός του πληθυσμού τους έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε Iron Agar (IA), και επώαση για 48 h στους 25

2.5 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Η διαδικασία παρασκευής των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφεται παρακάτω:

- Maximum Recovery Diluent (MRD)

1. Σε μία φιάλη των 1000ml ζυγίζουμε: 8,5g χλωριούχο νάτριο και 1,0g πεπτόνη και προσθέτουμε 1000ml απιονισμένο νερό.
2. Αν χρειάζεται αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθούν τα συστατικά
3. Με τη χρήση διανομέα (dispenser) μεταγγίζουμε 9ml MRD σε δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετούνται τα πώματα.
4. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 οC για 15 λεπτά.

- Iron Agar (IA)

1. Σε μία φιάλη των 1000ml ζυγίζουμε και προσθέτουμε: πεπτόνη 20g, εκχύλισμα κρέατος 3,0g, εκχύλισμα ζύμης 3,0g, κιτρικός σίδηρος 3,0g/l, θειοθειικό νάτριο 0,3g, NaCl 5g, L-κυστεΐνη 0,6g, άγαρ 14g.
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Ρυθμίζουμε το pH στην τιμή 7,4.

4. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 οC για 15 λεπτά.

• Tryptone Soy Agar (TSA)

-1. Σε μία φιάλη των 1000ml ζυγίζουμε και προσθέτουμε: τρυπτόνη 15,0g, πεπτόνη σόγιας 5,0g, χλωριούχο νάτριο 5,0g, άγαρ 15,0g

2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό

3. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 οC για 15 λεπτά.

4. Μοιράζουμε σε τρυβλία

• CFC

1. Σε μία φιάλη των 1000ml ζυγίζουμε και προσθέτουμε: πεπτόνη από ζελατίνη 16.0g, υδρόλυμα καζεΐνης 10,0g, θειικό κάλιο 10,0g, χλωριούχο μαγνήσιο 1,4g, άγαρ 11,0g

2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό

3. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 οC για 15 λεπτά.

4. Προστίθενται τα αντιβιοτικά Ceftrimide, Fusidin και Cephaloridine

5. Μοιράζουμε σε τρυβλία

2.6 Χημικοί Δείκτες Αλλοίωσης

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκαν η τριμεθυλαμίνη (TMA) και το Ολικό Πτητικό Βασικό Άζωτο (TVB-N). Τα δείγματα λαμβάνονταν κάθε δύο μέρες εις τριπλούν.

Διαδικασία προσδιορισμού τριμεθυλαμίνης (TMA)

1. Ποσότητα 10g δείγματος σάρκας λαβρακίου ομογενοποιείται σε συσκευή τύπου Stomacher με 90ml διαλύματος TCA 6% για 2min

2. Ακολουθεί διήθηση μέσω ηθμού Whatman No. 1 σε ογκομετρική φιάλη 100ml.
Προσθέτουμε TCA 6% μέχρι τη χαραγή

3. Ποσότητες 1ml από πρότυπα διαλύματα 0, 0,05, 0,1, 0,15, και 2,0 mg/ml τριμεθυλαμίνης σε TCA 6% αλλά και ποσότητα 1ml διηθήματος μεταφέρονται σε σειρά δοκιμαστικών σωλήνων όπου προστίθεται 3ml τουλουόλιο, 200μl φορμόλη, 500μl καυστικό κάλιο (KOH) 90% και ακολουθεί ανατάραξη σε Vortex (2 x 5 sec) και ηρεμία για 15min

4. Δημιουργούμε δεύτερη σειρά σωλήνων όπου προστίθεται στον καθένα ποσότητα 0,5g θειικό νάτριο (NaSO₄) καθώς και 3 ml πικρικού οξέως (0,02g πικρικό οξύ σε 100 ml τουλουόλιο)

5. Από την πρώτη σειρά σωλήνων λαμβάνεται 1ml της υπερκείμενης φάσης και μεταφέρεται στη δεύτερη σειρά σωλήνων. Ακολουθεί ανατάραξη σε Vortex και ηρεμία για 10 min

6. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων στα 410nm και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς

7. Ακολουθεί έλεγχος της απορρόφησης του άγνωστου διαλύματος στα 410nm σε σχέση με το τυφλό (0,0mg/ml τριμεθυλαμίνη).

8. Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της TMA στο δείγμα σάρκας

Διαδικασία προσδιορισμού Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)

1. Ποσότητα 10 g δείγματος σάρκας λαβρακίου ομογενοποιείται σε συσκευή τύπου Stomacher με 90 ml διαλύματος TCA 6 % για 2 min

2. Ακολουθεί διήθηση μέσω ηθμού Whatman No. 1 σε ογκομετρική φιάλη 100ml.

3. Ποσότητα 50 ml του εκχυλίσματος τοποθετούνται σε συσκευή απόσταξης ατμού

4. Προσθέτουμε στο εκχύλισμα 6 ml NaOH 20 %

5. Η απόσταξη του ατμού ρυθμίζεται ώστε να παράγονται περίπου 100 ml/10 min

6. Ο σωλήνας απαγωγής του αποστάγματος καταδύεται σε δέκτη που περιέχει 100 ml βορικού οξέος 3 % στον οποίο έχουν προστεθεί 3-5 σταγόνες δείκτη (2 g ερυθρό του μεθυλίου και 1 g κυανού του μεθυλενίου διαλύονται σε 1000ml αιθανόλης 95 %)

7. Ο σωλήνας απαγωγής του αποστάγματος απομακρύνεται από το δέκτη και ξεπλένεται με νερό

8. Οι πτητικές βάσεις καθορίζονται με τιτλοδότηση, με τη βοήθεια πρότυπου διαλύματος HCl 0,01 N

9. Στο τυφλό αντί εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται 50 ml TCA 6%

10. Υπολογίζουμε με τον τύπο: $TVBN=(V_1-V_0)*0.14*2*100/M$

Όπου: V_1 = όγκος 0,01 mol διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ml για το δείγμα

V_0 = όγκος 0,01 mol διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ml για την τυφλή δοκιμή

M = βάρος δείγματος σε g

Το TVB-N εκφράζεται σε mg N/ 100 g δείγματος

2.7 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των ιχθύων κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους, πραγματοποιήθηκε από μη-εκπαιδευμένο πάνελ ατόμων με σκοπό την προσομοίωση των απλών καταναλωτών. Για τον προσδιορισμό των οργανοληπτικών μεταβολών, πραγματοποιήθηκε ανά δύο ημέρες παρατήρηση και καταγραφή των εξωτερικών μεταβολών των ιχθύων. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν παράμετροι ποιότητας όπως είναι το δέρμα (χρώμα – εμφάνιση, παραγωγή βλέννας, οσμή, υφή), τα μάτια (διαύγεια, κόρη ματιού, μορφή) και τα βράγχια (χρώμα). Η ολική αξιολόγηση των ιχθύων αποτέλεσε τον μέσο όρο των χαρακτηριστικών. Η κλίμακα αξιολόγησης ήταν από 1 έως 5 για κάθε χαρακτηριστικό (5 – άριστη ποιότητα, 4 – φρέσκο, 3 – υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό, 2 – υποβαθμισμένο και μη αποδεκτό, 1 – αλλοιωμένο).

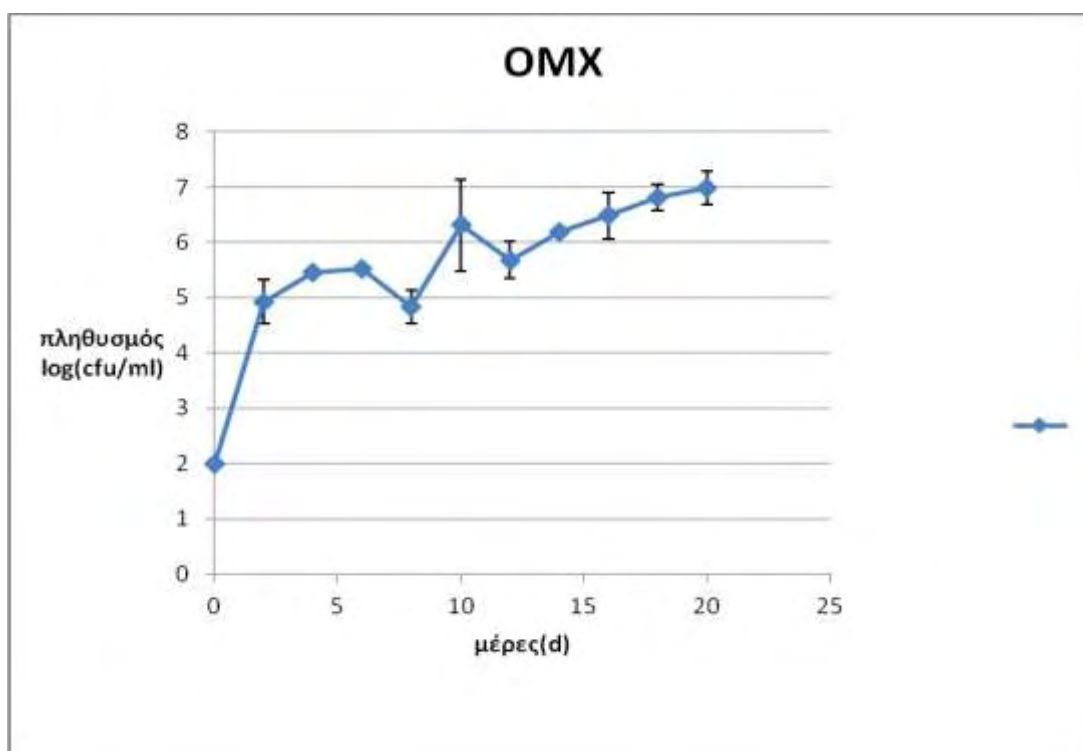
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων σε ψύξη

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων του πειράματος συντήρησης του λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) σε ψύξη 0°C.

Ολική μεσόφιλη γλωρίδα (OMX)

Καταμετρήθηκε η μεταβολή του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (OMX) σε υπόστρωμα TSA, σε ψύξη 0°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.



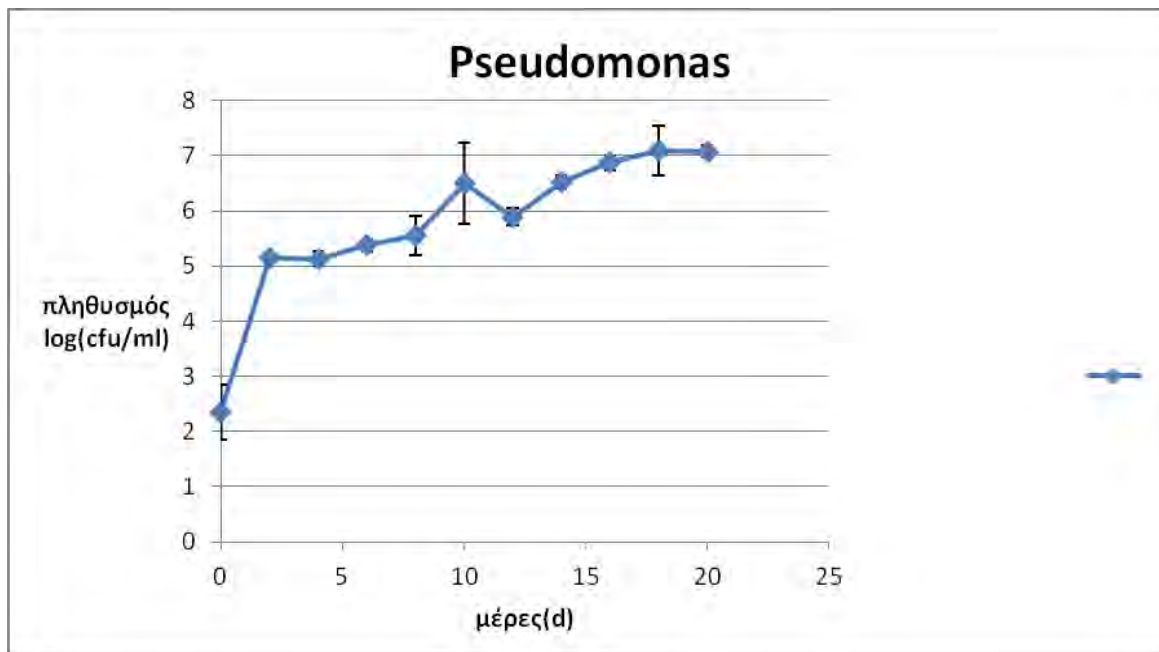
Σχήμα 1: Μεταβολή της OMX του λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) κατά τη διάρκεια συντήρησής της στους 0°C. Οι μετρήσεις είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων ενώ οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Κατά της διάρκεια αποθήκευσης των λαβρακίων (*Dicentrarchus labrax*), η OMX παρουσιάζει μία γρήγορη ανάπτυξη τις πρώτες 3 ημέρες κατά τις οποίες οι μικροοργανισμοί φαίνεται να βρίσκονται στη φάση λογαριθμικής ανάπτυξης. Στη συνέχεια η αύξηση της OMX διατηρείται,

αλλά όχι με το ίδιο ρυθμό και φθάνει ~7 logs gfu/g.

Μεταβολή του πληθυσμού των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* sp.)

Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού των ψευδομονάδων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των λαβρακίων σε ψύξη.

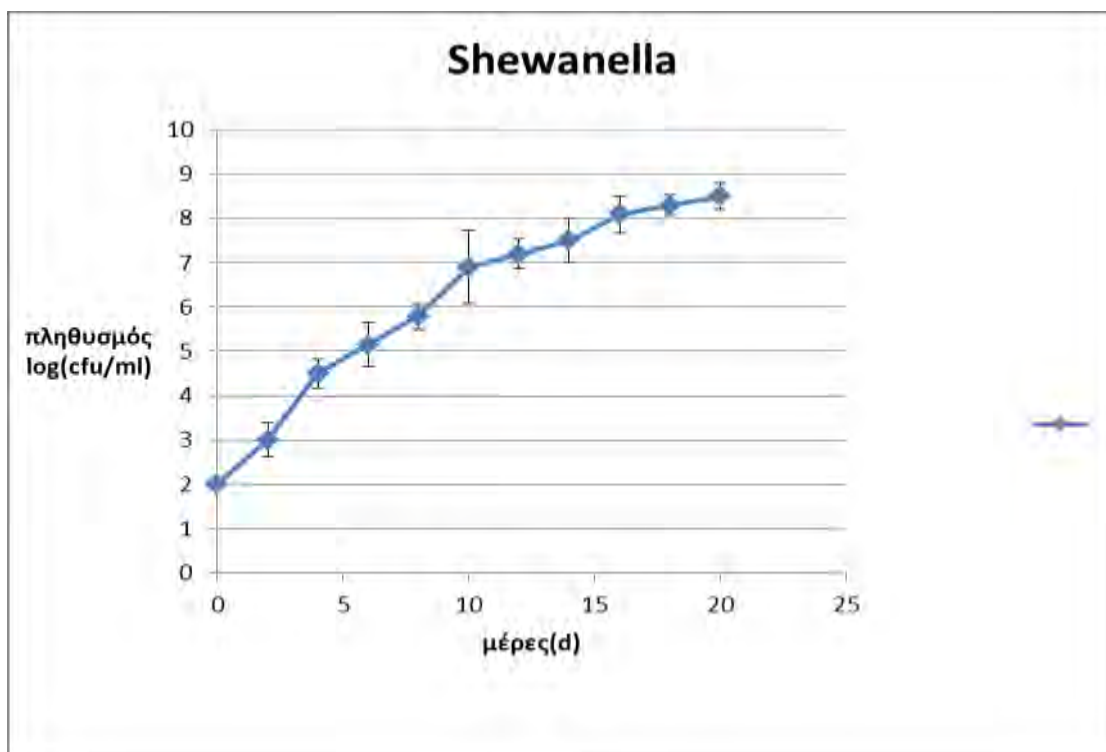


Σχήμα 2: Μεταβολή του πληθυσμού των ψευδομονάδων κατά τη συντήρηση του λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) στους 0°C.

Και σε αυτή την περίπτωση εμφανίζεται μια παρόμοια εικόνα όπως και στην OMX. Δηλαδή ο πληθυσμός των ψευδομονάδων παρουσιάζει μια εκθετική αύξηση τις πρώτες 3 ημέρες (λογαριθμική φάση αύξησης των μικροοργανισμών), ενώ τις επόμενες ημέρες η αύξηση διατηρείται με χαμηλότερο ρυθμό.

Μεταβολή του πληθυσμού των H₂S (*Shewanella* sp.)

Η μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων που παράγουν H₂S κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των λαβρακίων σε ψύξη παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.



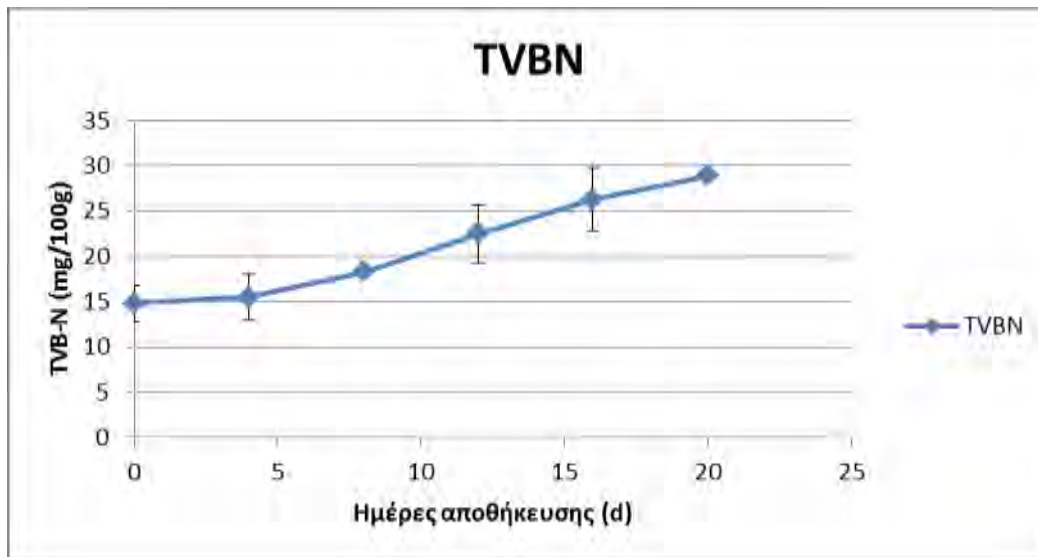
Σχήμα 3: Μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων που παράγουν H₂S κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των λαβρακίων στους 0°C. Τα σημεία αποτελούν τη μέση τιμή τριών επαναλήψεων. Οι ράβδοι δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Παρουσιάζεται μια σχετικά ταχεία ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν H₂S (*Shewanella putrefaciens*). Αρχικά ο πληθυσμός του βακτηρίου *Shewanella putrefaciens* ήταν 1,9 log cfu/g . Στο τέλος του πειράματος ο πληθυσμός είχε φτάσει 8,5 cfu/g για τα λαβράκια που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψύξης (20η ημέρα).

3.2 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων σε ψύξη

Ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVBN)

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται η μεταβολή του πτητικού βασικού αζώτου για τα λαβράκια σε θερμοκρασία αποθήκευσης 0°C.



Σχήμα 4. Μεταβολή του ολικού πτητικού βασικού αζώτου κατά τη διάρκεια συντήρησης των λαβρακίων (*Dicentrarchus labrax*) στους 0°C.

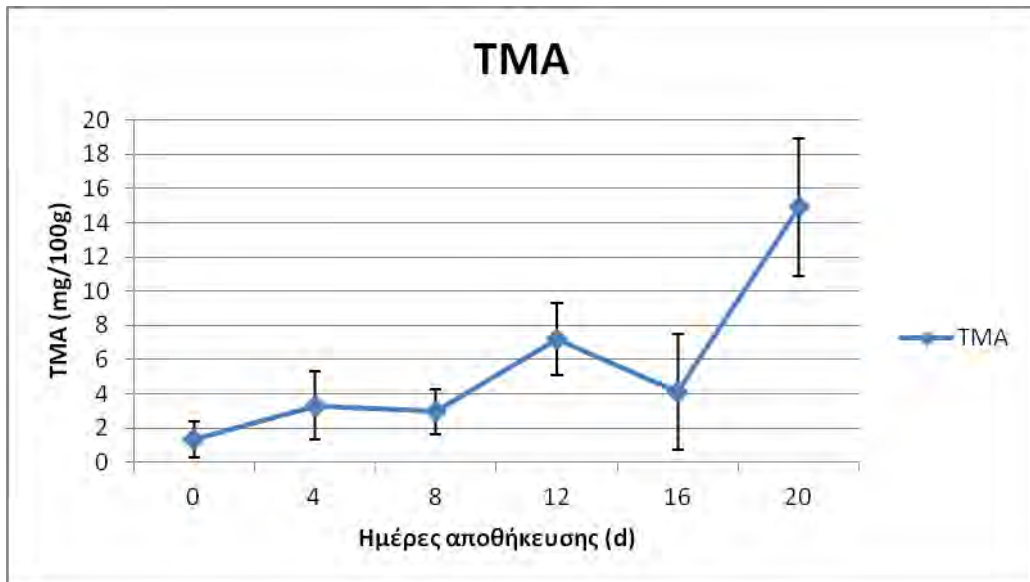
Φαίνεται ότι τις πρώτες ημέρες υπάρχει μια μικρή αύξηση και στη συνέχεια μετά τις 10 ημέρες η αύξηση συνεχίζεται σταδιακά μέχρι και την τιμή των 29,5 mg/100g.

Τριμεθυλαμίνη (TMA)

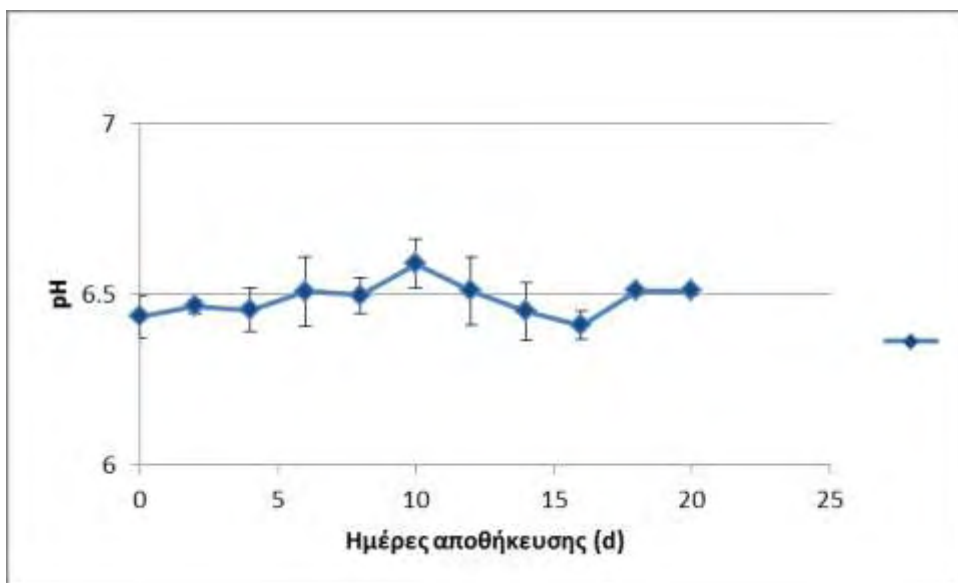
Οι μεταβολές της TMA παρουσιάζονται στη Σχήμα 5. Εμφανίζεται μια μικρή αύξηση τις πρώτες 4 ημέρες, η οποία διατηρείται σχεδόν σταθερή μέχρι και τη 12 ημέρα, ενώ στη συνέχεια μετά από μια μικρή μείωση μέχρι και τη 16^η ημέρα, παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση (~15mg/100g).

Μεταβολή pH

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 6 δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες μεταβολές στην τιμή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης των λαβρακίων σε ψύξη. Η τιμή του pH για όλες τις ημέρες συντήρησης κυμαίνεται από 6,39 μέχρι 6,58.



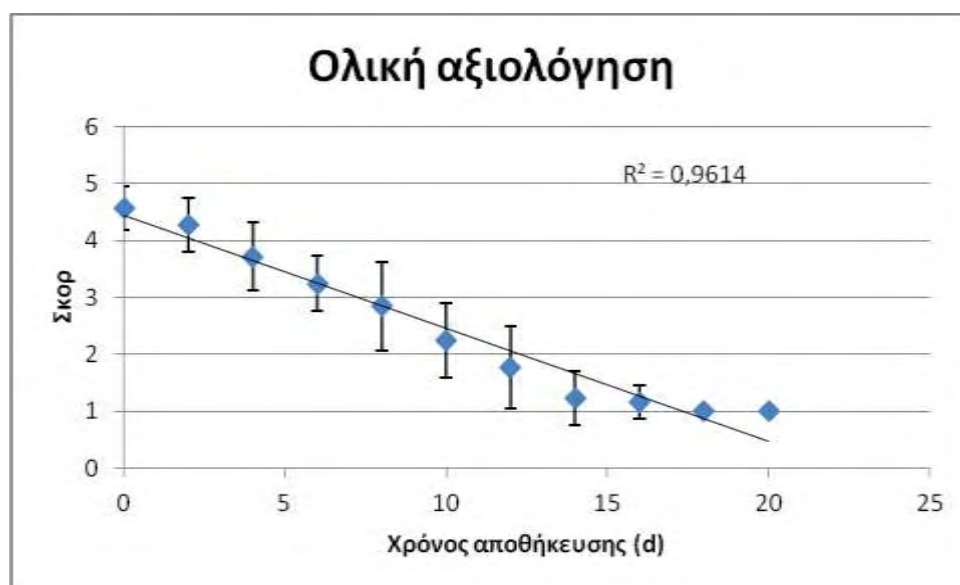
Σχήμα 5. Μεταβολή της τριμεθυλαμίνης (TMA) κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) στους 0°C.



Σχήμα 6. Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων στους 0°C.

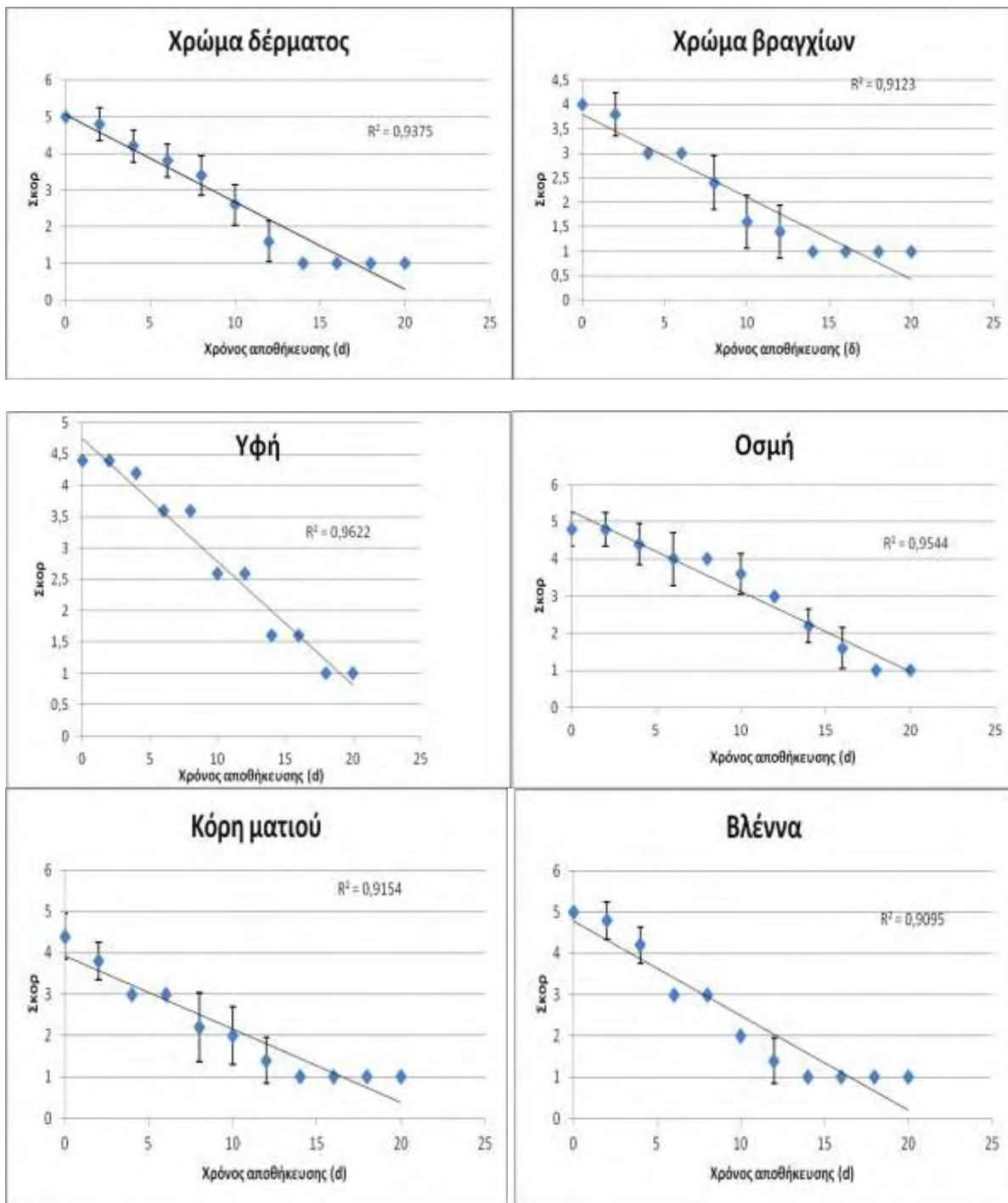
3.3 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλλοίωσης κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων σε ψύξη

Κατά τη διάρκεια συντήρησης των νωπών λαβρακίων στον πάγο, έγινε οργανοληπτική εκτίμηση από πάνελ ατόμων. Τα αποτελέσματα από την οργανοληπτική αξιολόγηση για την ολική εκτίμηση της ποιότητας των λαβρακίων φαίνεται στο σχήμα 7.



Σχήμα 7. Οργανοληπτική αξιολόγηση νωπών λαβρακίων αποθηκευμένων στον πάγο (0 °C). Τα σημεία αποτελούν τη μέση τιμή των επιμέρους χαρακτηριστικών, ενώ οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Το οργανοληπτικό σκορ μειώνεται γραμμικά ($R^2 = 0,9614$) σε σχέση με τον χρόνο παραμονής στον πάγο. Ο χρόνος ζωής του προϊόντος προσδιορίστηκε οργανοληπτικά περίπου στις **12** ημέρες αποθήκευσης στους 0 °C, ενώ από την 12^η ημέρα και έπειτα το προϊόν δεν είναι αποδεκτό. Τα αποτελέσματα για κάθε ποιοτικό χαρακτηριστικό των νωπών λαβρακίων, όπως προσδιορίστηκαν από το πάνελ, φαίνονται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 8: Μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών λαβρακίων που αποθηκεύτηκαν στον πάγο. Τα σημεία αποτελούν τη μέση τιμή βαθμολογίας των κριτών. Οι κάθετες γραμμές δείχνουν την τυπική απόκλιση. Το οργανοληπτικό σκορ μειώνεται γραμμικά για όλες τις παραμέτρους ποιότητας που εξετάστηκαν.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα υπολογίστηκε ο εμπορικός χρόνος ζωής για λαβράκια που συντηρήθηκαν σε πάγο, λαμβάνοντας υπόψη κάθε ποιοτικό χαρακτηριστικό

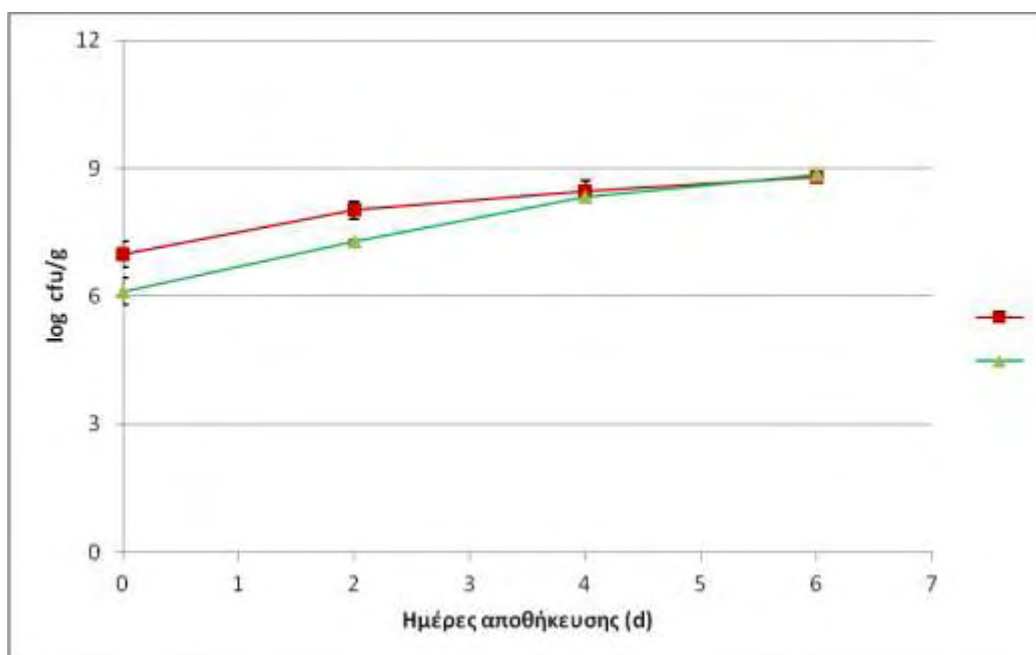
ξεχωριστά. Παρατηρείται ότι για όλα τα χαρακτηριστικά το προϊόν θεωρείται μη αποδεκτό περίπου στις 10-12 ημέρες. Από τα χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν γρήγορα την αλλοίωση είναι εκτός από την υφή, η διαύγεια και η κόρη του ματιού, η γενικότερη μορφή των λαβρακίων καθώς και το χρώμα των βραγχιών τους. Στην αρχή τα μάτια ήταν λαμπερά και διαυγή ενώ μετά τη 9η – 10η ημέρα είχαν χάσει αυτή τη φωτεινότητα και ήταν κυρτά προς τα μέσα. Όσον αφορά τα βράγγια, ενώ αρχικά είχαν έντονο κόκκινο χρώμα, μετά τη 10η ημέρα είχαν σχεδόν χάσει το ζωντανό χρώμα τους και είχαν αποχρωματισθεί. Επίσης, τις πρώτες ημέρες αποθήκευσης η παραγωγή βλέννας ήταν περιορισμένη, αυξανόταν όμως όσο περνούσαν οι μέρες συντήρησης και με βάση την παραγωγή βλέννας, το προϊόν χαρακτηρίστηκε ως μη αποδεκτό την 10η ημέρα. Για όλα τα επιμέρους ποιοτικά χαρακτηριστικά από την 11^η-12^η ημέρα και μετά το προϊόν θεωρείται μη αποδεκτό, αφού λαμβάνει σκορ -1- στην κλίμακα αξιολόγησης.

3.4 Μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων στους 4°C με και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως

Μεταβολή του πληθυσμού των ψευδομονάδων (*Pseudomonas sp.*)

Η μεταβολή του πληθυσμού των ψευδομονάδων κατά τη διάρκεια συντήρησης των λαβρακίων με και χωρίς την παρουσία του κιτρικού οξέως παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.

Φαίνεται ότι και στις 2 περιπτώσεις ο πληθυσμός των ψευδομονάδων αυξάνεται το ίδιο χωρίς καμία μεταβολή ούτε στο ρυθμό αύξησης. Δηλαδή η παρουσία του κιτρικού οξέως με αυτή τη συγκέντρωση και αυτό τον χειρισμό δεν επιδρά στη συγκέντρωση του πληθυσμού των ψευδομονάδων, κατά τη διάρκεια συντήρησης των ιχθύων στους 4°C.

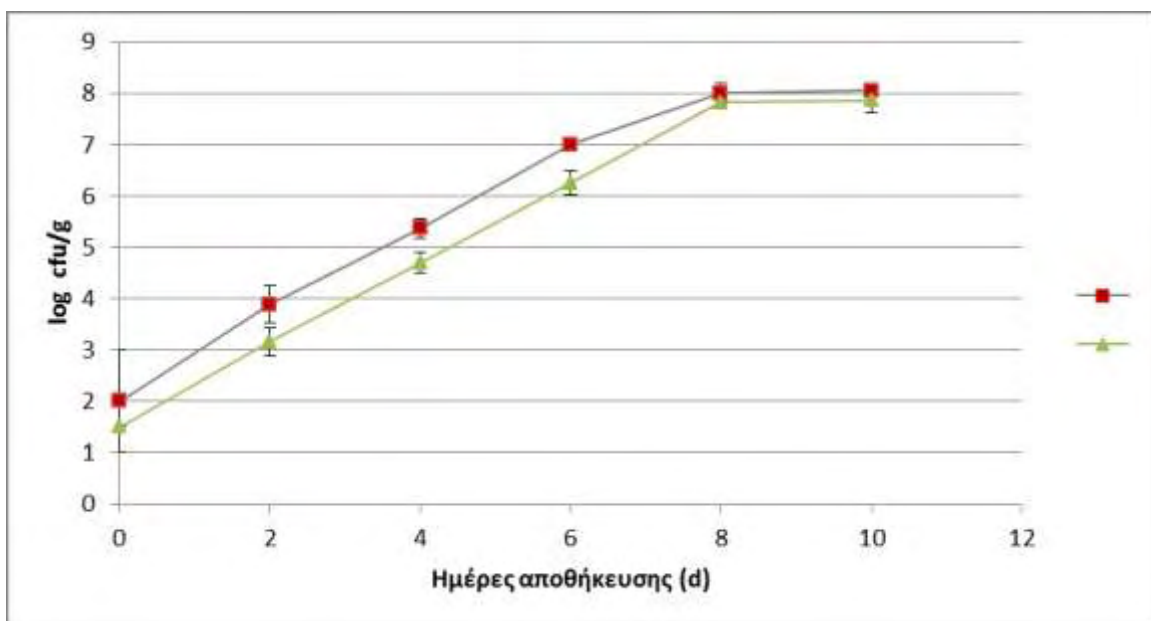


Σχήμα 9. Μεταβολή του πληθυσμού των ψευδομονάδων (*Pseudomonas sp.*) κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων με (πράσινη γραμμή) και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως (κόκκινη γραμμή) στους 4°C.

Μεταβολή πληθυσμού βακτηρίων που παράγουν H₂S (*Shewanella putrefaciens*)

Η μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων που παράγουν H₂S για τις δύο μεταχειρίσεις παρουσιάζονται στο Σχήμα 10.

Και στους δύο χειρισμούς, δηλαδή με και χωρίς την παρουσία του κιτρικού οξέως, παρουσιάζεται το ίδιο πρότυπο ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν H₂S. Οπότε και σε αυτή την περίπτωση το κιτρικό οξύ δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη μεταβολή του πληθυσμού των μικροοργανισμών που παράγουν H₂S.



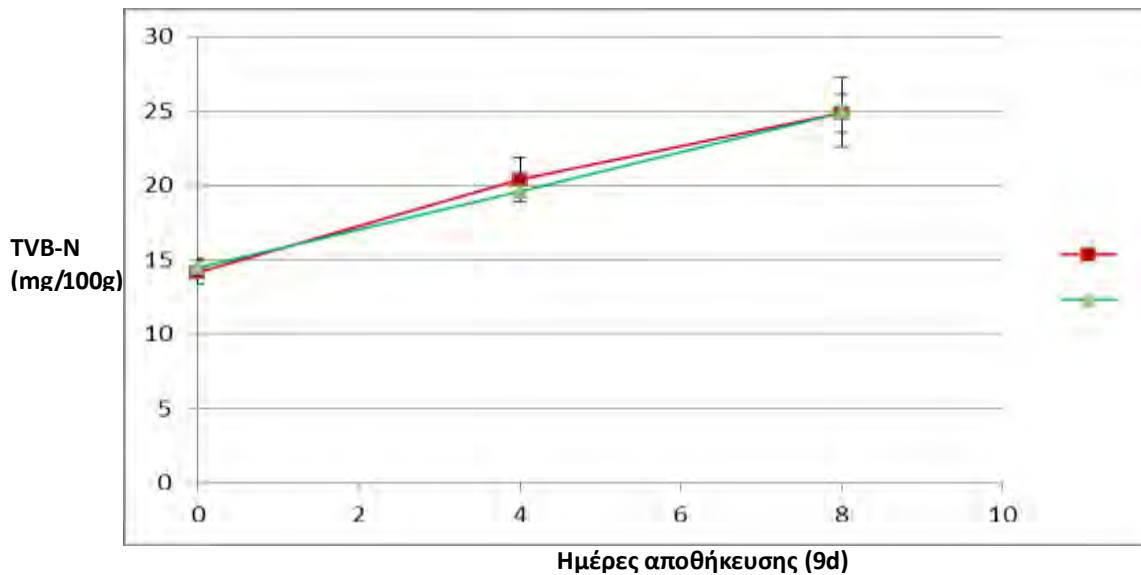
Σχήμα 10. Μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων που παράγουν H₂S κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων με (πράσινη γραμμή) και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως (κόκκινη γραμμή) στους 4°C.

3.5 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων στους 4°C με και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως

Ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N)

Στο Σχήμα 11 παρουσιάζεται η μεταβολή του πτητικού βασικού αζώτου για τους δύο χειρισμούς συντήρησης λαβρακίων με και χωρίς την παρουσία του κιτρικού οξέως στους 4°C.

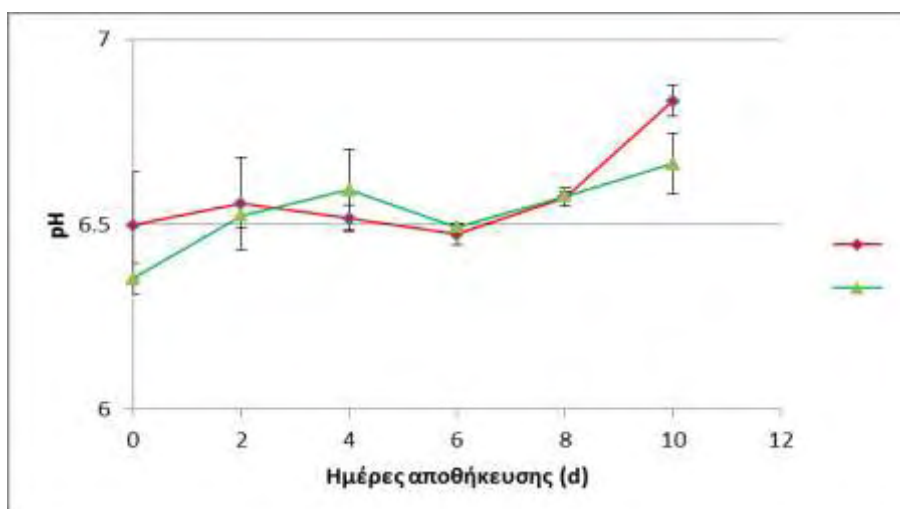
Φαίνεται ότι τις πρώτες ημέρες υπάρχει μια αύξηση του ολικού πτητικού αζώτου και στη συνέχεια μετά τις 4 ημέρες το ολικό πτητικό άζωτο συνεχίζει να αυξάνει μέχρι την τιμή ~25mg/100g. Η παρουσία του κιτρικού οξέως (πράσινη γραμμή στο διάγραμμα) δεν παρουσιάζει κάποια επίδραση στη μεταβολή του ολικού πτητικού βασικού αζώτου κατά τη διάρκεια συντήρησης.



Σχήμα 11. Μεταβολή του ολικού πτητικού βασικού αζώτου κατά τη διάρκεια συντήρησης των λαβρακίων (*Dicentrarchus labrax*) με (πράσινη γραμμή) και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως (κόκκινη γραμμή) στους 4°C.

Μεταβολή pH

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 12 δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στην τιμή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης των λαβρακίων σε ψύξη με ή χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως στους 4°C. Η τιμή του pH για όλες τις ημέρες συντήρησης και για τους δύο χειρισμούς κυμαίνεται από 6,39 μέχρι 6,88. Υπάρχει μόνο μία μικρή αύξηση και στους δύο χειρισμούς στη δέκατη μέρα.



Σχήμα 12. Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης λαβρακίων σε ψύξη με (πράσινη γραμμή) και χωρίς την παρουσία κιτρικού οξέως (κόκκινη γραμμή) στους 4°C.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S (κυρίως *Shewanella* spp.) αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση των ιχθύων λαβρακίου σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η αλλοίωση στα νωπά αλιευτικά προϊόντα είναι αποτέλεσμα μεταβολών κυρίως στην οσμή και τη γεύση που προέρχονται από την παραγωγή ουσιών οι οποίες είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Gram and Huss, 1996). Οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική τους απόρριψη. Η οσμή αποτελεί τον κυριότερο δείκτη αξιολόγησης της φρεσκότητας (Selli and Cayhan, 2009), ενώ μικροβιολογικοί, βιοχημικοί και οργανοληπτικοί μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της φρεσκότητας και της ποιότητας κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης και της αποθήκευσης των ιχθύων. Σε συνθήκες αέρα, όπου τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους πιο επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, παρατηρείται παραγωγή πτητικών αζωτούχων βάσεων, πτητικών οξέων, αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων, παραγωγή υδροθείου και άλλων ουσιών. Οι μεταβολίτες που παράγονται από τη δράση αυτών των μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση των αλιευμάτων είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές όπως αυτή της αμμωνίας από τριμεθυλαμίνη, του σάπιου από καδαβερίνη και πουτρεσκίνη και του θείου από θειούχες πτητικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, το υψηλό pH (6–7) και η υψηλή περιεκτικότητα της σάρκας των ιχθύων σε ελεύθερα αμινοξέα και άλλες αζωτούχες ενώσεις τα καθιστούν κατάλληλα για την γρήγορη αύξηση μικροοργανισμών (Dalgaard, 1995). Ενώ είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στα αλιεύματα προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον όπου οι ιχθύες ζουν (Gram and Huss, 1996).

Η αλλοίωση γίνεται αντιληπτή εξαιτίας των αλλαγών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευτικών προϊόντων. Ουσίες οι οποίες παράγονται κυρίως από μικροβιακή δραστηριότητα όπως είναι το TVBN, TMA, χρησιμοποιούνται ως δείκτες

αλλοίωσης. Η χρήση του TVBN στα αλιεύματα και των άλλων αζωτούχων μεταβολιτών (TMA) αποτελούν έναν καλό δείκτη για την αποδοχή ή όχι αυτών των προϊόντων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αύξηση του πληθυσμού των ψευδομονάδων και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας στα λαβράκια κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους σε ψύξη και βρέθηκε μια σχετική αύξηση και στις δύο περιπτώσεις, ενώ η τιμή του pH παρατηρήθηκε σταθερή. Στην ψύξη δεν παρατηρείται φάση προσαρμογής, δηλαδή οι μικροοργανισμοί δεν χρειάστηκαν χρόνο για να προσαρμοστούν και έτσι ξεκίνησαν άμεσα να πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να φθάνει σε υψηλά επίπεδα σχετικά γρήγορα. Εξάλλου όπως έχει αναφερθεί, βακτήρια όπως είναι τα *Shewanella*, *Brochothrix*, *Pseudomonas* αναπτύσσονται γρήγορα σε θερμοκρασία ψύξης και προκαλούν αλλοιώσεις (Jay et al., 2005). Στις τιμές του pH δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η τιμή του pH στους ζωντανούς ιχθύες είναι κοντά στο 7, ενώ ύστερα από τη συλλογή και αποθήκευσή τους το pH μπορεί να διαφέρει σημαντικά εφόσον διότι εξαρτάται από την εποχή, το είδος και άλλους παράγοντες (Cakli et al., 2006). Επίσης υπολογίσθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης της τριμεθυλαμίνης και του ολικού πτητικού αζώτου κατά τη διάρκεια συντήρησής τους και βρέθηκε πως στην περίπτωση του ολικού πτητικού αζώτου τις πρώτες ημέρες υπάρχει μια μικρή μείωση, ενώ στη συνέχεια μετά τις 8 ημέρες αυξάνει σε μικρό βαθμό και διατηρείται περίπου σταθερό μέχρι και τις 18 ημέρες. Στην περίπτωση της τριμεθυλαμίνης (TMA) υπάρχει μια μικρή αύξηση τις πρώτες 4 ημέρες, η οποία διατηρείται σχεδόν σταθερή μέχρι και τη 12 ημέρα, ενώ στη συνέχεια υπάρχει μια ραγδαία αύξηση και ιδιαίτερα για το ένα από τα 2 λαβράκια (23mg/100g). Αξίζει να σημειωθεί πως το TVB-N παράγεται σε ικανοποιητικές ποσότητες όταν η μικροβιολογική δραστηριότητα είναι ιδιαίτερα αυξημένη. Το TVB-N αποτελείται κυρίως από TMA, NH₃ και βιογενείς αμίνες, οι οποίες παράγονται κατά τα τελευταία στάδια της αλλοίωσης με αποτέλεσμα να μπορούν να ανιχνευτούν μόνο σε αυτά τα τελικά στάδια. Αυτό έχει σαν συνέπεια να είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν για διάκριση της νωπότητας, αλλά μόνο να χρησιμοποιούνται αποδοτικότερα

ως δείκτες αλλοίωσης-απόρριψης.

Έχει αναφερθεί πως τα οργανικά οξέα δρουν έναντι της αύξησης του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής στους ιχθύες (Sallam, 2007). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία του Sallam, (2007) κατά την οποία τα άλατα του κιτρικού οξέος επιδρούν σημαντικά στους πληθυσμούς των *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S σε φέτες σολομού που εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα άλατος κιτρικού οξέος 2,5% v/w για 10 min και αποθηκεύθηκαν στους 1°C. Οι πληθυσμοί των πιο σημαντικών μικροοργανισμών βρέθηκε να είναι περίπου 2 φορές μικρότεροι (σε λογαριθμική κλίμακα) στις φέτες σολομού με κιτρικό οξύ, σε σχέση με τις φέτες χωρίς κιτρικό, ενώ ο πληθυσμός τους δεν ξεπέρασε τα επίπεδα των 7 και 6 log, αντίστοιχα. Ακόμη, στο τέλος της συντήρησης ο εμπορικός χρόνος ζωής του προϊόντος σολομού επιμηκύνθηκε για 4 ημέρες (Sallam, 2007).

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση του κιτρικού οξέως κατά τη διάρκεια συντήρησης των λαβρακίων σε ψύξη. Παρόλα αυτά, δεν φάνηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή, ούτε στους πληθυσμούς των μικροβίων (*Pseudomonas* spp, *Shewanella* spp.), αλλά και ούτε στη συγκέντρωση του ολικού πτητικού αζώτου και στην τιμή του pH, ανάμεσα στους δύο χειρισμούς. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στη συγκέντρωση του κιτρικού οξέως που χρησιμοποιήθηκε (1%). Επίσης είναι πιθανό να υπάρχουν μεταβολές, αλλά να είναι πολύ μικρές και στη διακριτική ικανότητα των μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν. Μελλοντικά θα μπορούσε να επαναληφθεί ο πειραματικός σχεδιασμός με περισσότερα άτομα ιχθύων και διαφορετικές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέως, προκειμένου να εξακριβωθεί η πιθανή επίδραση του κιτρικού οξέως κατά τη διάρκεια συντήρησης των λαβρακίων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alvariño, J. M. R., Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., & Mañanós, E. (1992). Pattern of sea bass oocyte development after ovarian stimulation by LHRHa. *Journal of fish biology*, *41*(6), 965-970.
- Bendag, M. (1995). Systèmes de production du loup et de la daurade. Elevage intensif en bassins en Tunisie. *CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes*, *14*, 97-112.
- Boziaris, I. S. (2014). *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*. Wiley-Blackwell
- 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., Kiling, A., Cadun, T., Dincer, T., Tolosa, S. (2006). Effects of gutting and uncutting 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.
- Carrillo, M., Bromage, N., Zanuy, S., Serrano, R., & Prat, F. (1989). The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, *81*(3), 351-365.
- Cataudella, S., Allegrucci, G., Bronzi, P., Cataldi, E., Cioni, C., Corti, M., & Sbordoni, V. (1991). Multidisciplinary approach to the optimisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) rearing in freshwater—Basic morpho-physiology and osmoregulation. *Aquacult. Env*, *14*, 56-57.

Curran, C. A., & Disney, J. G. (1979, September). The iced storage life of tropical fish. In *IPFC Workshop on Fish Technology. Jakarta, Indonesia.*

Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 319-333.

Dalla Via, J., Villani, P., Gasteiger, E., & Niederstätter, H. (1998). Oxygen consumption in sea bass fingerling *Dicentrarchus labrax* exposed to acute salinity and temperature changes: metabolic basis for maximum stocking density estimations. *Aquaculture*, 169(3), 303-313.

Devauchelle, N., & Coves, D. (1988). The characteristics of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs: description, biochemical composition and hatching performances. *Aquatic living resources*, 1(04), 223-230.

Drake, P., & Arias, A. M. (1993). Larval feeding habits and diel rhythms of four species of marine fish in a tidal creek of Cádiz Bay (Spain). *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*, 153-159.

Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S., & Brooks, M. S. (2010). Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), 859.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal of food microbiology*, 33(1), 121-137.

Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 262-266.

Hall, H. K., Karem, K. L., & Foster, J. W. (1995). Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Advances in microbial physiology*, 37, 229-272.

Herskin, J., & Steffensen, J. F. (1998). Energy savings in sea bass swimming in a school: measurements of tail beat frequency and oxygen consumption at different swimming speeds. *Journal of Fish Biology*, 53(2), 366-376.

Hill, C., O'Driscoll, B., & Booth, I. (1995). Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International journal of food microbiology*, 28(2), 245-254.

Hidalgo, F., & Alliot, E. (1988). Influence of water temperature on protein requirement and protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 72(1), 115-129.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D. (2005). Modern food microbiology. Seventh edition. Springer, New York

Jennings, S., & Pawson, M. G. (1992). The origin and recruitment of bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae to nursery areas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(01), 199-212.

Kelley, D. F. (1988). The importance of estuaries for sea-bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Biology*, 33(sA), 25-33.

Leaute, J. P. (1984). Approche du regime alimentaire des juveniles de bars et de limandes en baie de Somme. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 48(1-2), 55-63.

Liston, J. (1960). The bacterial flora of fish caught in the Pacific. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(3), 469-470.

Loy, A., Boglione, C., Gagliardi, F., Ferrucci, L., & Cataudella, S. (2000). Geometric morphometrics and internal anatomy in sea bass shape analysis *Dicentrarchus labrax* L., Moronidae). *Aquaculture*, 186(1), 33-44.

Marchesan, M., Spoto, M., Verginella, L., & Ferrero, E. A. (2005). Behavioural effects of artificial light on fish species of commercial interest. *Fisheries research*, 73(1), 171-185.

Melotti, P., Roncarati, A., Garella, E., Novelli, A., Gennari, L., & Carnevali, O. (1991). Control of Reproduction in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) by Means of Ecophysiological Manipulation. In *Larvi'91 Fish&Crustacean Larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Special Publication* (No. 15).

Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20(4), 411-420.

Papoutsoglou, S., Costello, M. J., Stamou, E., & Tziha, G. (1996). Environmental conditions at ea-cages, and ectoparasites on farmed European sea-bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), and gilt-head sea-bream, *Sparus aurata* L., at two farms in Greece. *Aquaculture Research*, 27(1), 25-34.

Papoutsoglou, S. E., Tziha, G., Vrettos, X., & Athanasiou, A. (1998). Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering*, 18(2), 135-144.

Parlapani, F. F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2014)a. Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International journal of food microbiology*, 189, 153-163.

Parlapani, F. F., Kormas, K. A., & Boziaris, I. S. (2014)b. Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA genes analysis. *Journal of the science of food and agriculture*.

Pastoureaud, A. (1991). Influence of starvation at low temperatures on utilization of energy reserves, appetite recovery and growth character in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 99(1), 167-178.

Pawson, M. G., & Pickett, G. D. (1996). The annual pattern of condition and maturity in bass, *Dicentrarchus labrax*, in waters around England and Wales. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76(01), 107-125.

Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., De Mones, A., & Fostier, A. (1990). Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General and comparative endocrinology*, 78(3), 361-373.

Russell, N. J., & Gould, G. W. (Eds.). (2003). *Food preservatives*. Springer.

Sallam, I. K. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food control*, 18(5), 566-575.

Selli, S., & Cayhan, G. G. (2009). Analysis of volatile compounds of wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by simultaneous distillation–extraction (SDE) and GC–MS. *Microchemical journal*, 93(2), 232-235.

Shewan, J. M. (1977). *The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action* (pp. 51-66). Torrey Research Station.

Shewan, J. M., Hobbs, G., & Hodgkiss, W. (1960). The Pseudomonas and Achromobacter groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(3), 463-468.

Smith, R. R., Peterson, M. C., & Allred, A. C. (1980). Effect of leaching on apparent digestion coefficients of feedstuffs for salmonids. *The Progressive Fish-Culturist*, 42(4), 195-199.

Venturini, G., Cataldi, E., Marino, G., Pucci, P., Bronzi, P., & Cataudella, S. (1992). Serum ions concentration and atpase activity in gills, kidney and oesophagus of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*, pisces, perciformes) during acclimation trials to fresh water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 103(3), 451-454.

Watanabe, K. (1965). Technological problems of handling and distribution of fresh fish in southern Brazil. *The Technology of Fish Utilization*, 44-6.

Αργυράκος Γεώργιος (2011) *Τα πρόσθετα των τροφίμων*. Εκδόσεις "Ελίκρανον", Αθήνα.

Μπόσκου Δ. (1997) *Χημεία Τροφίμων*. Θεσσαλονίκη

ABSTRACT

Fresh seafood is very perishable product with short shelf-life and their quality evaluation and shelf life extension are important aspects of the current seafood industry. During storage, seafood quality deteriorates due to various spoilage mechanisms. Microbiological and chemical changes cause changes in sensory attributes. Various methods are employed to determine the quality and shelf-life duration of seafood. Those methods measure microbiological, chemical or sensory changes.

The aim of the present work is the monitoring of microbial, organoleptic and chemical spoilage indices changes during preservation at chilling temperatures of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*).

Population changes of total viable counts, *Pseudomonas* sp. and H₂S producing bacteria (*Shewanella putrefaciens*) were monitored. Microbiological results were shown that *Pseudomonas* sp. is the dominant spoilage population. Shelf life of sea bass stored in ice was found about 12 days, with TVB-N value to reach 23 mg/100g and total viable counts about log

cfu/g.

Additionally the effect of citric acid was studied during storage of sea bass fillets at 4°C. The results were shown that there was not any significant effect on microbial populations, TVB-N changes and shelf-life between control and citrate treated fillets.