

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Π.Δ.Ε.



ΜΑΝΤΖΟΥΡΙΔΗΣ ΣΤΕΦΑΝΟΣ- ΜΑΡΙΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2018

«Μικροβιολογικές και ιστολογικές μεταβολές σάρκας τσιπούρας μετά από κατάψυξη και απόψυξη»

(Microbiological and histological changes of gilt-head sea bream after freezing and thawing)

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) **Ιωάννης Μποζιάρης (M.Sc., Ph.D.)**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.

- 2) **Παναγιώτης Βερίλλης (Δρ.)**, Επίκουρος Καθηγητής, Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Μποζιόρη, 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 τον Δρ. Παναγιώτη Βερίλλη για την υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές του σχετικά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και στερεοσκόπιο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την αμέριστη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή της, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στο φίλο και συνάδελφο Σωτήρη Οικονόμου που με τις γνώσεις του με βοήθησε τόσο στην ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της πτυχιακής όσο και στην συγγραφή.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των μικροβιολογικών μεταβολών και ιστολογικών μεταβολών, μετά από κατάψυξη. Οι μικροβιολογικές μεταβολές μετρήθηκαν με χρήση καλλιεργητικών τεχνικών, ενώ οι ιστολογικές με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και στερεοσκοπίου προκειμένου να διακριθεί αν είναι δυνατό η νωπή από την κατεψυγμένη τσιπούρα. Αγοράστηκαν τσιπούρες ιχθυοτροφείου από την τοπική αγορά του Βόλου όπου μελετήθηκαν πριν από την καταψυχή τους, καθώς και μετά από την αποψυχή τους προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

Η μικροβιολογική αξιολόγηση έδειξε πως δεν υπήρχαν αλλαγές στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν μετά από κάθε κατάψυξη και απόψυξη. Συγκεκριμένα, η ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα κυμαινόταν σε όλα τα δείγματα από 6 έως 8,5 log cfu/g. Οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια κυμαίνονταν από 6 έως 8,5 log cfu/g, ενώ τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμούς πολύ χαμηλότερους. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης (1 log cfu/g).

Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση (βάσει μετρήσεων με τη χρήση στερεοσκοπίου), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην απόσταση των μυομερών στα δείγματα απεψυγμένης τσιπούρας που καταψύχθηκε έως και 2 μήνες

(63 ημέρες). Η εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως δεν κατέδειξε επίσης αλλαγές.

Λέξεις-κλειδιά:

τσιπούρα (Sparus aurata), ποιότητα, Ειδικοί Αλλοιωγόνι Μικροοργανισμοί (EAM), ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, στερεοσκόπιο

ABSTRACT

The aim of this work is to (i) determine the microbiological changes and histological changes, after freezing. The microbiological changes were measured using cultivation techniques, while histological with the aid of an electron microscope and stereoscope in order to distinguish whether fresh from the frozen seabream. Fish farm bream was purchased from the local market of Volos which were studied before they were frozen, as well as after defrosting them in order to compare the results.

The microbiological assessment showed that there were no changes in the populations of the microorganisms studied after each freezing and thawing. Specifically, the total Aerobic Plate Counts was ranged from 6 to 8.5 log cfu/g. The micro-organisms *Pseudomonas* spp. and (H₂S) bacteria was ranged from 6 to 8.5 logcfu/g, whereas the bacteria of the Enterobacteriaceae were found in populations much lower. The (LAB) were below the detection limit (1 log cfu / g) throughout the experiment.

According to statistical analysis (based on measurements using a stereoscope), no significant changes in the distance of the miomers were observed in the defrosted sea bream samples frozen for up to 2 months (63 days). Scanning by scanning electron microscopy also showed no changes.

Keywords:

sea bream (Sparus aurata), quality, Specific Spoilage Organisms (SSOs), Electron microscope, stereoscope

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .

- 1.1 Αλλοίωση των ιχθύων.....σελ.9
- 1.1.1 Μικροβιακή αλλοίωσησελ.9
- 1.1.2 Μη μικροβιακή αλλοίωσησελ.10
- 1.2 Αποθήκευση σε θερμοκρασίες κατάψυξηςσελ.11
- 1.3 Στοιχεία βιολογίας ιχθύων τσιπούρας και οικονομική σημασία...σελ.12
- 1.4 Σκοπός εργασίας..... σελ.14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1 Προετοιμασία δειγμάτων τσιπούρας.....σελ.15
- 2.2 Μικροβιακή ανάλυση.....σελ.16
- 2.2.1 Μικροβιολογικά υλικά.....σελ. 16
- 2.2.2 Απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμώνσελ.16
- 2.2.3 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και στερεοσκόπιο.....σελ.17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1 Μικροβιακοί πληθυσμοίσελ.19
- 3.2 Παρατήρηση του μυϊκού ιστού των απεψυγμένων φιλέτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσηςσελ.25
- 3.3 Παρατήρηση της μεταβολής των μυομερών του μυϊκού ιστού των απεψυγμένων φιλέτων με στερεοσκόπιο.....σελ.26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑσελ.32

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑσελ.33

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑσελ.36



- **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο :**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αλλοίωση των ιχθύων

Η αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να θεωρηθεί ως μια μεταβολή που υποβαθμίζει οργανοληπτικά την ποιότητα καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Huis in't Veld 1996). Η υποβάθμιση της ποιότητας των ιχθύων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσεως μικροοργανισμών, ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξειδωσης (τάγγιση) κυρίως όμως για τα λιπαρά ψάρια (Ashie et al. 1996 Gram & Huss 1996).

1.1.1 Μικροβιακή αλλοίωση

Οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard 2002). Οι EAM αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό από ότι η υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης (spoilage level) των 10^7 - 10^9 cfu/g παράγουν ουσίες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία δυσάρεστων οσμών κι επομένως την οργανοληπτική απόρριψη (Dalgaard et al. 1993, Gram & Huss 1996).

Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να εκτιμηθεί είτε με μικροβιολογική ανάλυση που γίνεται με απαρίθμηση των μικροοργανισμών κατά τη συντήρηση ή με χημική ανάλυση για τον προσδιορισμό των μικροβιακών μεταβολιτών. Ο πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) και των EAM όπως είναι τα *Pseudomonas*,



Shewanella για τους νοπούς ιχθύες υπό ψύξη σε αερόβιες συνθήκες και τα Lacticacid Bacteria σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και κενού, χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής των νοπών ιχθύων. Η χημική ανάλυση όπως το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N), η τριμεθυλαμίνη (TMA) ή άζωτο της τριμεθυλαμίνης (TMA-N) αποτελεί έναν άλλον τρόπο προσδιορισμού της ποιότητας – αλλοίωσης των ιχθύων. Ωστόσο, το TVB-N παράγεται σε σημαντικές ποσότητες μόνο κατά τα στάδια της προχωρημένης αλλοίωσης των ιχθύων, η τιμή του TMA είναι χαμηλή έως και μηδαμινή σε ιχθύες τσιπούρας που έχουν αλιευθεί από ελληνικά ύδατα και οι βιογενείς αμίνες γενικότερα απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους ιχθύες της Μεσογείου (Drosinos & Nychas 1996, Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis et al. 1999). Έτσι, δεν θεωρούνται αξιόπιστη ουσίες για την αξιολόγηση της ποιότητας των ψαριών.

Αντίθετα, οι μεταβολίτες που παράγονται από τη δράση των μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση των αλιευμάτων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές όπως ethanol, propanol, butanol, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2,3-butadione κ.α. έχουν προταθεί με μεγάλη επιτυχία να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μικροβιακής αλλοίωσης (Boziaris and Parlapani 2016).

1.1.2 Μη μικροβιακή αλλοίωση

Σε πολλά αλιεύματα, οι αυτολυτικές και ενζυματικές αλλαγές αποτελούν την κύρια αιτία στην υποβάθμιση της ποιότητας (Uchiyama & Ehira 1974). Ο προσδιορισμός των προϊόντων διάσπασης ATP μέσω της τιμής K η οποία αυξάνει εξαιτίας κυρίως των αυτολυτικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια

της αποθήκευσης (Huss 1995) αλλά και ο προσδιορισμός της οξειδωσης των λιπιδίων μέσω της μέτρησης των υπεροξειδίων και του θειοβαρβιτουρικού οξέος (Masniyom et al. 2002, Cakli et al. 2007, Kostaki et al. 2009) ή των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Gomes et al. 2003, Goulas & Kontominas 2007, Mexis et al. 2009) αποτελούν τις κυριότερες μεθόδους εκτίμησης μη μικροβιακής αλλοίωσης.

1.2 Αποθήκευση σε θερμοκρασίες κατάψυξης

Η κατάψυξη είναι μια μέθοδος συντήρησης σε θερμοκρασίες -18 με -40°C. Η αποθήκευση στις θερμοκρασίες αυτές προκαλεί κρυστάλλωση των κυτταρικών υγρών και τη δημιουργία παγοκρυστάλλων. Στους κατεψυγμένους ιχθύες, ο μυϊκός ιστός στο κέντρο της μάζας τους είναι κρυσταλλωμένος, ενώ το σώμα τους σκληρό και άκαμπτο. Η κατάψυξη ενδείκνυται για συντήρηση των ιχθυηρών για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η κατάψυξη προκαλεί αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης, έτσι δεν αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί (συμπεριλαμβάνοντας και τους ΕΑΜ) και επομένως η αλλοίωση δεν είναι μικροβιολογικής φύσης.

Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, διάφορες πρωτεάσες όπως είναι οι καθεψίνες ενεργοποιούνται και συμβάλλουν στο μαλάκωμα της σάρκας (υφής). Οι καθεψίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αυτολυτική αποδόμηση του μυϊκού ιστού των ιχθύων (Μποζιάρης, 2010). Επιπλέον, οι καλπαΐνες οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στην τρυφεροποίηση του κόκκινου κρέατος κατά τη συντήρηση σε κατάψυξη, έχουν βρεθεί επίσης σε ιχθύες. Τέλος, οι κολλαγονάσες οι οποίες είναι πρωτεολυτικά ένζυμα που υδρολύουν τις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού των ιχθύων, ευθύνονται για τη ρηγμάτωση (gapping) των ιστών της σάρκας λόγω της διαλυτοποίησης του κολαγόνου. Με τον τρόπο αυτό, δηλαδή τη δράση των

πρωτεολυτικών ενζύμων, η ποιότητα των ιχθύων κατά τη διάρκεια της κατάψυξης υποβαθμίζεται. Ωστόσο, πολλά ψάρια στο εμπόριο αποψύχονται και πωλούνται ως φρέσκα και για λόγους αντιμετώπισης της νοθείας είναι απαραίτητη η εύρεση μεθοδολογιών προκειμένου να τα διακρίνουμε. Συγκεκριμένα, η εργασία **“Histological discrimination of fresh and frozen/thawed fish meat: European hake (*Merluccius merluccius*) as a possible model for white meat fish species”** είχε ως στόχο την δημιουργία μιας μεθοδολογίας, η οποία θα αναγνώριζε ένα κατεψυγμένο ψάρι από ένα νωπό. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα 30 νωπά ψάρια του είδους *Merluccius merluccius*, 30 κατεψυγμένα στους -20°C και 30 ‘γρήγορα’ κατεψυγμένα του ίδιου είδους. Παράλληλα, μέσω μιας ιστολογικής διεργασίας προσπάθησαν να διακρίνουν τα νωπά ψάρια από τα κατεψυγμένα (Lara Tinacci et al., 2018). Μια ακόμα μεθοδολογία που προσπάθησαν να εφαρμόσουν ενάντια στην νοθεία ήταν η σάρωση φιλέτων με υπέρηθρη φασματοσκοπία (Vis-NIRS). Πιο συγκεκριμένα η μελέτη αυτή **“Non-invasive differentiation between fresh and frozen/thawed tuna fillets using near infrared spectroscopy (Vis-NIRS)”** διερευνά την ικανότητα της Φασματοσκοπίας Εγγύς Υπερύθρου (Vis-NIRS) να ανιχνεύσει αν ένα δείγμα τόνου είναι φρέσκο ή εάν έχει καταψυχθεί, προκειμένου να αντιμετωπισθεί η νοθεία στον τόνο, το οποίο είναι ένα ακριβό προϊόν της παγκόσμιας αγοράς. Οι παραπάνω μεθολογίες είναι ένας μελλοντικός τρόπος αντιμετώπισης της πρακτικής της νοθείας στο εμπόριο (M.M Reis et al. 2017)

1.3 Στοιχεία βιολογίας ιχθύων τσιπούρας και οικονομική σημασία

Οι ιχθύες αποτελούν μια πολύ μεγάλη και ιδιαίτερη ομοταξία των σπονδυλωτών ζώων που φέρονται προσαρμοσμένα στην υδρόβια ζωή. Ένας ιχθύς

είναι ένα υδρόβιο σπονδυλωτό ζώο που συνήθως χαρακτηρίζεται από αμφίπλευρη συμμετρία, έχει δίχωρη καρδιά (με ελάχιστα είδη να έχουν τρίχωρη), αναπνέει κυρίως με βράγχια, μπορεί να φέρει λέπια, χρησιμοποιεί πτερύγια για πλοήγηση και κολύμβηση, έχει πλευρική γραμμή και μπορεί να διαθέτει νηκτική κύστη (Στεργίου και συν., 2011).

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Εικόνα 1.2.1) είναι είδος της Μεσογείου και ένα από τα δύο κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές και ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες (Κλαουδάτος Σ. Δ. και Κλαουδάτος Δ. Σ., 2012). Είναι ίσως από τα πρώτα θαλάσσια είδη των ιχθύων της Μεσογείου στα οποία έχει εφαρμοστεί επιτυχώς η εντατική ελεγχόμενη μαζική εκτροφή, της οποίας η έναρξη χρονολογείται από τις αρχές περίπου της δεκαετίας του 1989 στην Ιταλία, στη Γαλλία και στην Ισπανία (Παπουτσόγλου, 2008).



Εικόνα 1.2.1. Τσιπούρα (*Sparus aurata*) (¹[https](https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es))

Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυοκαλλιέργειας της τσιπούρας ανήλθε στους 140000 t το 2008, με κύρια χώρα παραγωγής την Ελλάδα που παρήγαγε 115000 t, το ίδιο έτος. (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es).

1.4 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των μικροβιολογικών μεταβολών και ιστολογικών μεταβολών ,τσιπούρας ύστερα από κατάψυξη και απόψυξη, προκειμένου να εξετάσουμε τις διαφορές όταν αυτή είναι νωπή και κατεψυγμένη.

- **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο :**

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία δειγμάτων τσιπούρας

Τρεις τσιπούρες βάρους 400-500 g η κάθε μία παραλήφθησαν από την ιχθυαγορά στην περιοχή του Βόλου Μαγνησίας τον Μάρτιο του 2017. Οι ιχθύες μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του οικείου Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κάθε τσιπούρα μελετήθηκε πριν από την καταψυχή της και μετά την αποψυχή της, αλλά σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα απόψυξης. Υπό ασηπτικές συνθήκες 2 φιλέτα βάρους 100 gr το καθένα, παραλήφθησαν από κάθε τσιπούρα. Από τα φιλέτα της κάθε τσιπούρας πάρθηκαν τρία δείγματα ποσότητας 20 gr για μικροβιολογικές αναλύσεις, δύο δείγματα μήκους έξι (6) εκατοστών και πλάτους πέντε (5) εκατοστών για αναλύσεις σε στερεοσκόπιο και ένα δείγμα μήκους ενός (1) εκατοστού και πλάτους ενός (1) εκατοστού για αναλύσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Την πρώτη ημέρα του πειράματος μελετήθηκαν τα δείγματα από όλες τις τσιπούρες και μετά την αριθμησή τους, όπου κάθε τσιπούρα θα αντιστοιχούσε και σε διαφορετική ημέρα απόψυξης, αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Συγκεκριμένα τα δείγματα της «τσιπούρα απεψυγμένη 10 ημερών» χρησιμοποιήθηκαν μετά από δέκα ημέρες κατάψυξης για μελέτη, τα δείγματα της «τσιπούρα απεψυγμένη 36 ημερών» μετά από τριάντα έξι ημέρες κατάψυξης και τα δείγματα της «τσιπούρα απεψυγμένη 63 ημερών» μετά από δύο μήνες. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων της πρώτης ημέρας του πειράματος, όπου οι τσιπούρες ήταν



νωπές, με τα αποτελέσματα της αντίστοιχης ημέρας απόψυξης ώστε να παρατηρηθούν οι μεταβολές που θα βοηθούσαν στην διάκριση μιας νωπής και μιας κατεψυγμένης τσιπούρας.

2.2 Μικροβιολογική ανάλυση

2.2.1 Μικροβιολογικά υλικά

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK). Το Iron Agar (IA) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram et al. (1987) όπως περιγράφεται παρακάτω: peptone 20 g l⁻¹, meatextract 3.0 g, yeastextract 3.0 g l⁻¹, ferric citrate 3.0 g l⁻¹, sodiumthiosulphate 0.3 g l⁻¹, NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 g l⁻¹, agar 14 g l⁻¹. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.4.

2.2.2 Απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών

Πέντε (5) g δείγματος σάρκας ιχθύος μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, προστίθονταν 40 ml Maximum Recovery Diluent (MRD-NaCl 0,85% και πεπτόνη 0,1%) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Ακολούθησε η διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν, ήταν: α) Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός σε TSA (Tryptone Soy Agar) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48-72 ώρες, β) βακτήρια που παράγουν H₂S σε IA, με καταμέτρηση μόνο

των μαύρων αποικιών, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 72 ώρες, γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar (Mann, Rogosa, Sharpe agar), με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 72 ώρες, ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC *Pseudomonas* Agar (Cetrimide- Fucidin- Cephaloridine agar) με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48 ώρες. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης λαμβάνοντας 1 ml εναιωρήματος, ενώ του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού, *Pseudomonas* spp., και των βακτηρίων που παράγουν H₂S με την τεχνική της επίστρωσης λαμβάνοντας 0.1 ml εναιωρήματος.

2.2.3 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και στερεοσκόπιο

Έξι μικρά φιλέτα τσιπούρας βάρους 20 g το καθένα αποθηκεύθηκαν στους -20°C. Συγκεκριμένα, δύο φιλέτα αποθηκεύθηκαν για 10 ημέρες, δύο για 36 ημέρες και δύο για 64 ημέρες. Σε κάθε δειγματοληψία (10, 36, 64 ημέρες) λαμβάνονταν τα αντίστοιχα φιλέτα από την κατάψυξη και αφήνονταν να ξεπαγώσουν στους 4°C για 12 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθούσε ανάλυση στο στερεοσκόπιο με μεγέθυνση 6,3X για την σύγκριση των αποστάσεων μεταξύ των μυομερών από την πρώτη μέρα μέχρι την ημέρα απόψυξης. Για τα αποτελέσματα έγινε μετατροπή των αποστάσεων από pixel σε cm μέσω του προγράμματος Gimp 2 και μέσω του στατιστικού προγράμματος Origin έγινε ανάλυση κανονικής κατανομής προκειμένου να

χρησιμοποιηθεί ο αντίστοιχος τρόπος σύγκρισης. Τέλος , πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των μέσων όρων των αποστάσεων για τις διάφορες ημέρες συντήρησης.

Μετά από την οπτική αξιολόγηση με τη χρήση του στερεοσκοπίου ακολουθούσε η προετοιμασία των δειγμάτων για περαιτέρω ανάλυση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου Cambridge Stereoscan 240. Αναλυτικότερα, 1 cm x 1 cm από κάθε φιλέτο τοποθετούνταν σε διάλυμα φορμόλης 10% για 24 ώρες. Στη συνέχεια κάναμε ξήρανση του δείγματος με μια διαδικασία όπου τοποθετούμε το δείγμα μας σε διαλύματα με διαφορετικές περιεκτικότητες αλκοόλης για συγκεκριμένο χρόνο, 50% διάλυμα αλκοόλης για 30 λεπτά, 70% διάλυμα αλκοόλης για 30 λεπτά, 80% διάλυμα αλκοόλης για 20 λεπτά, 90% διάλυμα αλκοόλης για 20 λεπτά, 95% διάλυμα αλκοόλης για 10 λεπτά, 100% διάλυμα αλκοόλης για 10 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ξήρανσης, τα δείγματα τοποθετούνται σε επιμεταλλωτή (Bal- Tec SCD) που δουλεύει με αέριο αργό και δημιουργεί μια λεπτή επίστρωση χρυσού πάνω στο δείγμα ενισχύοντας την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων. Η διαδικασία αυτή απαιτεί συγκεκριμένες ρυθμίσεις χρόνου και ρεύματος. Ο χρόνος που απαιτεί είναι 180 δευτερόλεπτα και η τάση του ρεύματος για την επιμετάλλωση 42 mAber.

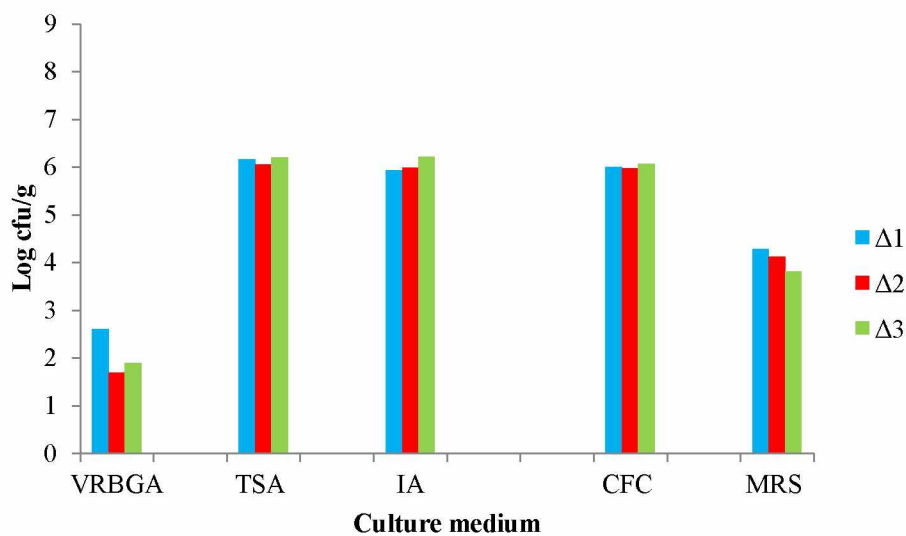
- ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

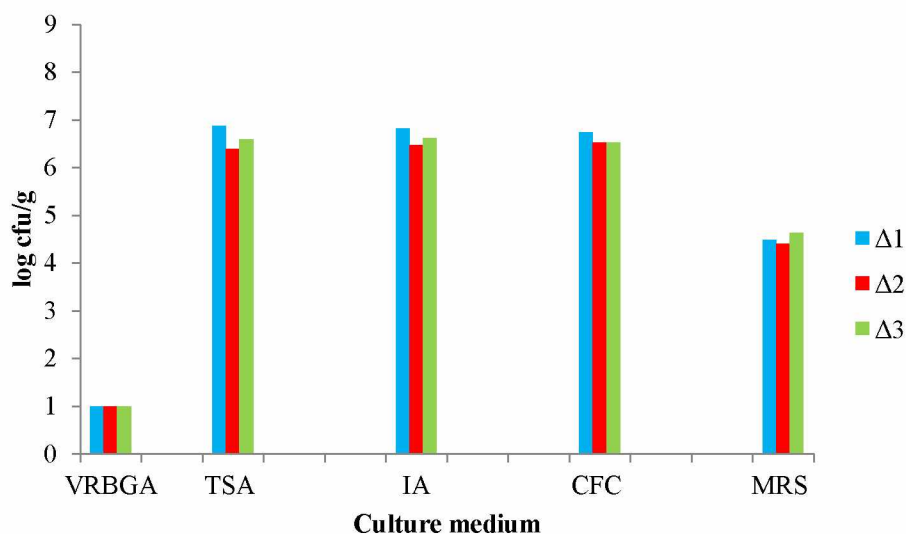
3.1 Μικροβιακοί πληθυσμοί

Οι πληθυσμοί της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών όπως είναι τα *Pseudomonas* spp., τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα *Enterobacteriaceae* πριν και μετά την αποθήκευση στους -20°C για 10, 36 και 63 ημέρες παρουσιάζονται στις Εικόνες 1-3.

Απευψυγμένη τσιπούρα 10 ημερών



(α)



(β)

Εικόνα 1. Μικροβιακοί πληθυσμοί του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (TSA, IA), των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. (CFC), Οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS) και *Enterobacteriaceae* (VRBGA) στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής (α) και 10 ημέρες μετά την αποθήκευση (β) στους -20°C . Τα Δ1, Δ2 και Δ3 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα σάρκας ιχθύος.

Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) ήταν 6.16, 6.05, 6.20 log cfu/g στα σημεία Δ1, Δ2 και Δ3, αντίστοιχα και 6.88, 6.39 και 6.59 log cfu/g μετά από συντήρηση στους -20°C για 10 ημέρες (Εικ. 1). Τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκαν σε πληθυσμούς της τάξεως των 6.00, 5.98 και 6.07 την ημέρα 0 και στα επίπεδα των 6.74, 6.52 και 6.52 την ημέρα 10. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν στους 4.29, 4.13 και 3.81 log cfu/g, για τα δείγματα Δ1, Δ2 και Δ3 αντίστοιχα την ημέρα 0, ενώ βρέθηκε στα επίπεδα των 4.48, 4.41 και 4.64 log cfu/g, αντίστοιχα, μετά από 10 ημέρες συντήρησης σε θερμοκρασία κατάψυξης -20°C . Επιπλέον, τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* κυμάνθηκαν μεταξύ 1.90-2.61 log cfu/g στα δείγματα τσιπούρας πριν την αποθήκευση, ενώ βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης 1 log cfu/g την ημέρα 10 (Εικ. 1). Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε στον παρακάτω **πίνακα 1** τις

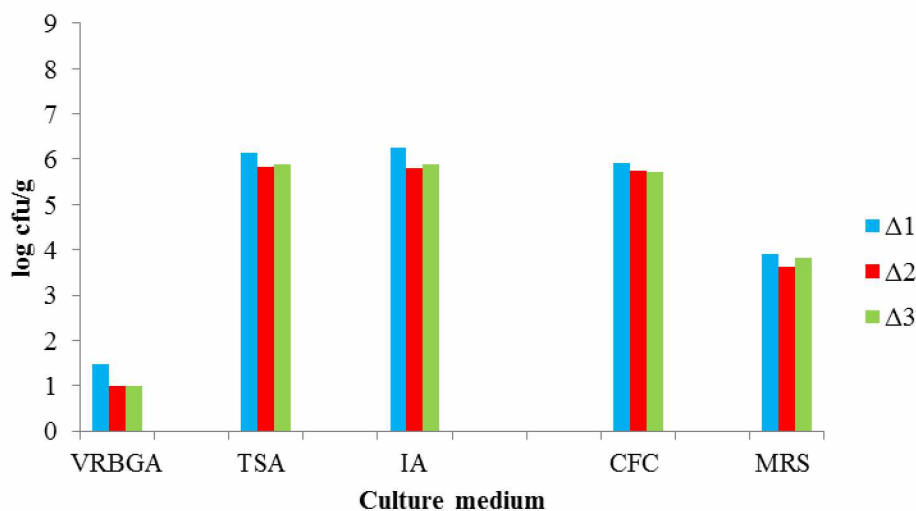


διαφορές με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση, και των τριών δειγμάτων Δ1, Δ2, Δ3 μαζί, αρχικά για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από 10 ημέρες κατάψυξης.

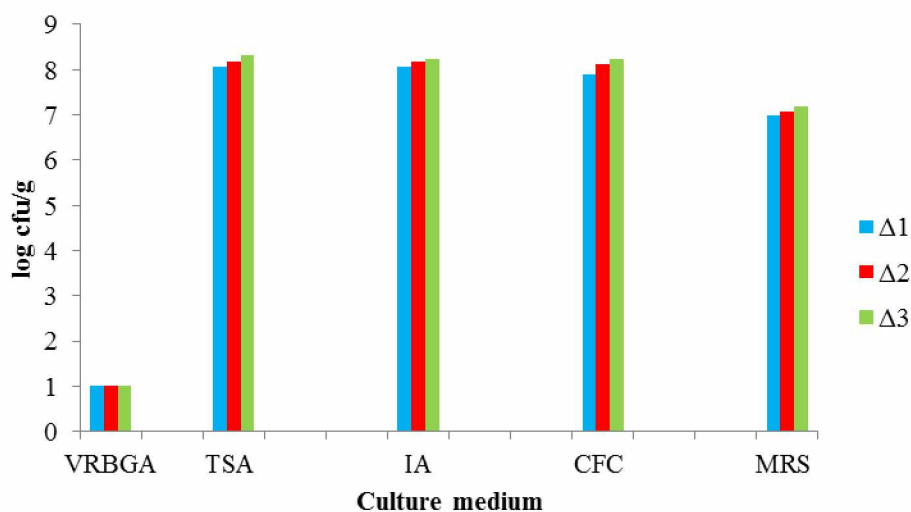
Πίνακας 1 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για το σύνολο των δειγμάτων Δ1, Δ2, Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από δέκα ημέρες κατάψυξης.

Απειψυγμένη τσιπούρα 10 ημερών	AVERAGE (Μέσος όρος)		Standard deviation (Τυπική απόκλιση)	
	0 ημέρες	10 ημέρες	0 ημέρες	10 ημέρες
VRBGA	2,07	1,00	0,48	0,00
TSA	6,14	6,62	0,08	0,25
IA	6,05	6,64	0,15	0,18
CFC	6,02	6,59	0,05	0,13
MRS	4,08	4,51	0,24	0,12

Απειψυγμένη τσιπούρα 36 ημερών



(α)



(β)

Εικόνα 2. Μικροβιακοί πληθυσμοί του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (TSA, IA), των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. (CFC), Οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS) και *Enterobacteriaceae* (VRBGA) στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής (α) και 36 ημέρες μετά την αποθήκευση (β) στους -20°C . Τα Δ1, Δ2 και Δ3 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα σάρκας ιχθύος.

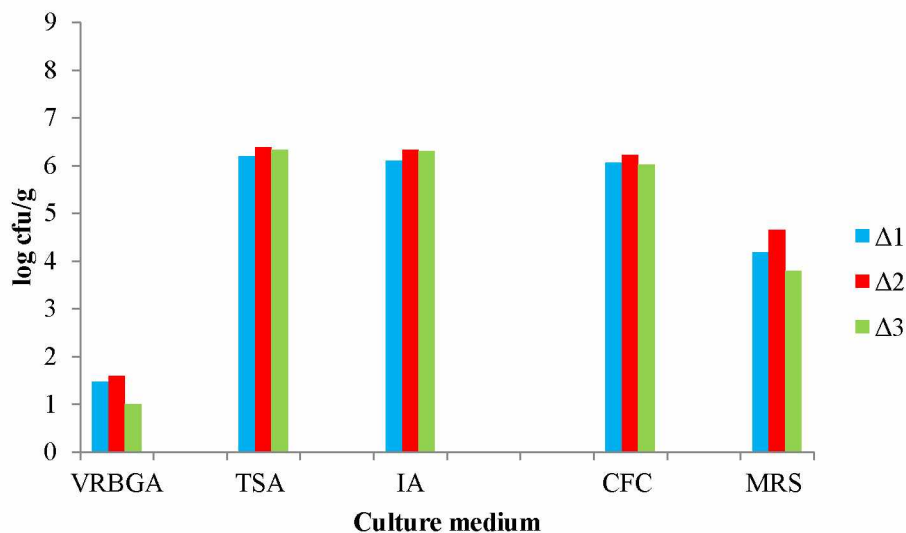
Στην περίπτωση της δεύτερης τσιπούρας, ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) ήταν 6.13, 5.83, 5.88 log cfu/g στα σημεία Δ1, Δ2 και Δ3, αντίστοιχα και έφτασε στους 8.06, 8.17, 8.32 log cfu/g μετά από συντήρηση στους -20°C για 36 ημέρες (Εικ. 2). Τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκαν σε πληθυσμούς της τάξεως των 5.91, 5.74, 5.72 την ημέρα 0 και στα επίπεδα των 7.89, 8.11, 8.24 την ημέρα 36. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν στους 3.90, 3.63, 3.83 log cfu/g, για τα δείγματα Δ1, Δ2 και Δ3 αντίστοιχα την ημέρα 0, ενώ βρέθηκε στα επίπεδα των 6.99, 7.07, 7.19 log cfu/g, αντίστοιχα, μετά από 36 ημέρες συντήρησης σε θερμοκρασία κατάψυξης -20°C . Επιπλέον, τα βακτήρια της οικογένειας

Enterobacteriaceae κυμάνθηκαν μεταξύ 1-1.48 log cfu/g στα δείγματα τσιπούρας πριν την αποθήκευση, ενώ βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης 1 log cfu/g την ημέρα 36 (Εικ. 2). Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε στον **πίνακα 2** τις διαφορές του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης, και των τριών δειγμάτων Δ1, Δ2, Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από 36 ημέρες κατάψυξης.

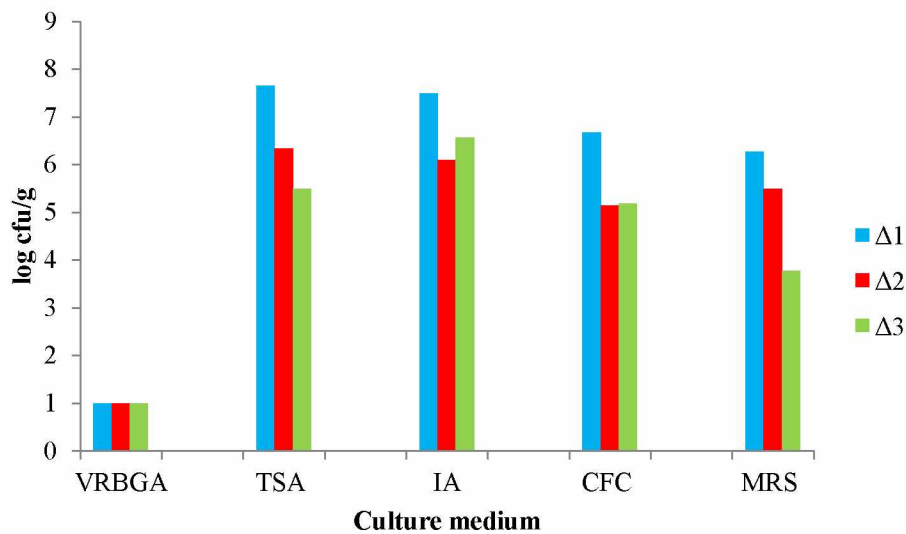
Πίνακας 2 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για το σύνολο των δειγμάτων Δ1, Δ2, Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από τριάντα έξι ημέρες κατάψυξης.

Απεψυγμένη τσιπούρα 36 ημερών	AVERAGE (Μέσος όρος)		Standard deviation (Τυπική απόκλιση)	
	0 ημέρες	36 ημέρες	0 ημέρες	36 ημέρες
VRBGA	1,16	1,00	0,28	0,00
TSA	5,95	8,18	0,16	0,13
IA	5,98	8,16	0,23	0,08
CFC	5,79	8,08	0,10	0,18
MRS	3,79	7,08	0,14	0,10

Απεψυγμένη τσιπούρα 63 ημερών



(α)



(β)

Εικόνα 3. Μικροβιακοί πληθυσμοί του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (TSA, IA), των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. (CFC), Οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS) και *Enterobacteriaceae* (VRBGA) στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής (α) και 63 ημέρες μετά την αποθήκευση (β) στους -20°C . Τα Δ1, Δ2 και Δ3 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα σάρκας ιχθύος.

Στην περίπτωση της τρίτης τσιπούρας, ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) ήταν 6.20, 6.38, 6.33 log cfu/g στα σημεία Δ1, Δ2 και Δ3, αντίστοιχα και έφτασε στους 7.65, 6.34, 5.48 log cfu/g μετά από συντήρηση στους -20°C για 63 ημέρες (Εικ. 3). Τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκαν σε πληθυσμούς της τάξεως των 6.06, 6.22, 6.02 την ημέρα 0 και στα επίπεδα των 6.67, 5.14, 5.18 την ημέρα 63. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν στους 4.19, 4.65, 3.80 log cfu/g για τα δείγματα Δ1, Δ2 και Δ3 αντίστοιχα την ημέρα 0, ενώ βρέθηκε στα επίπεδα των 6.27, 5.49, 3.78 log cfu/g, αντίστοιχα, μετά από 63 ημέρες συντήρησης σε θερμοκρασία κατάψυξης -20°C . Επιπλέον, τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* κυμάνθηκαν μεταξύ 1-1.60 log cfu/g στα δείγματα τσιπούρας πριν την αποθήκευση, ενώ βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης 1 log cfu/g την

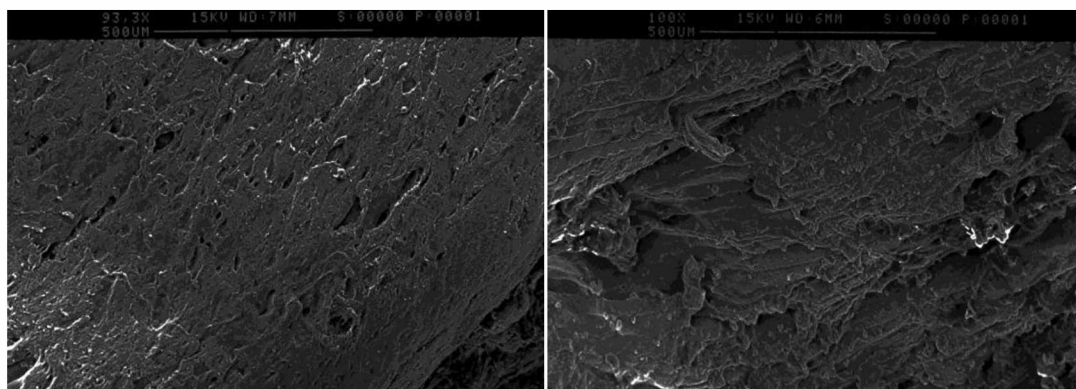
ημέρα 36 (Εικ. 3). Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε στον **πίνακα 3** τις διαφορές με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση, και των τριών δειγμάτων Δ1, Δ2, Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από δύο μήνες.

Πίνακας 3 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για το σύνολο των δειγμάτων Δ1, Δ2, Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από εξήντα τρεις ημέρες κατάψυξης.

Απειψυγμένη τσιπούρα 63 ημερών	AVERAGE (Μέσος όρος)		Standard deviation (Τυπική απόκλιση)	
	0 ημέρες	63 ημέρες	0 ημέρες	63 ημέρες
VRBGA	1,36	1,00	0,32	0,00
TSA	6,30	6,49	0,09	1,09
IA	6,24	6,72	0,13	0,71
CFC	6,10	5,66	0,11	0,87
MRS	4,21	5,18	0,43	1,27

3.2 Παρατήρηση του μυϊκού ιστού των απειψυγμένων φιλέτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

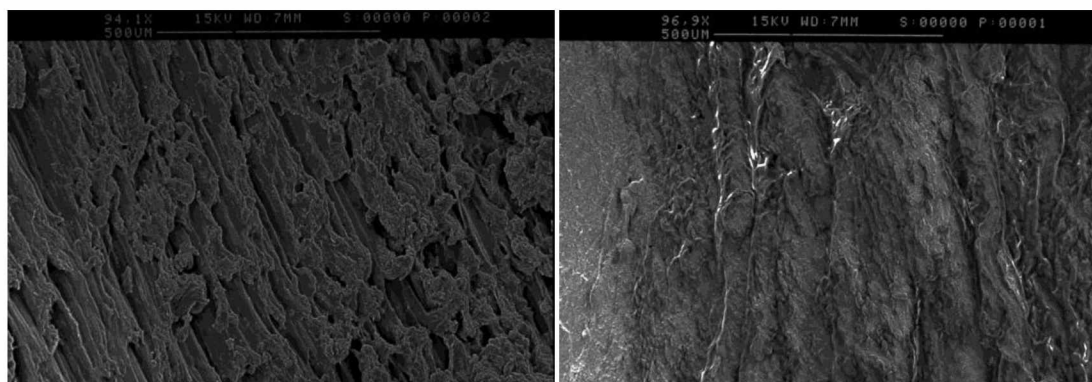
Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην ποιότητα του μυϊκού ιστού της σάρκας των ιχθύων τσιπούρας μεταξύ της ημέρας παραλαβής (ημέρα 0) και μετά από 10, 36 και 63 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία κατάψυξης. Στις παρακάτω εικόνες (Εικ. 4 και 5) απεικονίζεται, η ανάλυση της ποιότητας του μυϊκού ιστού πριν και μετά την κατάψυξη για 10 και 36 ημέρες.



(α)

(β)

Εικόνα 4. Ανάλυση της ποιότητας του ιστού των ιχθύων τσιπούρας μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης.



(α)

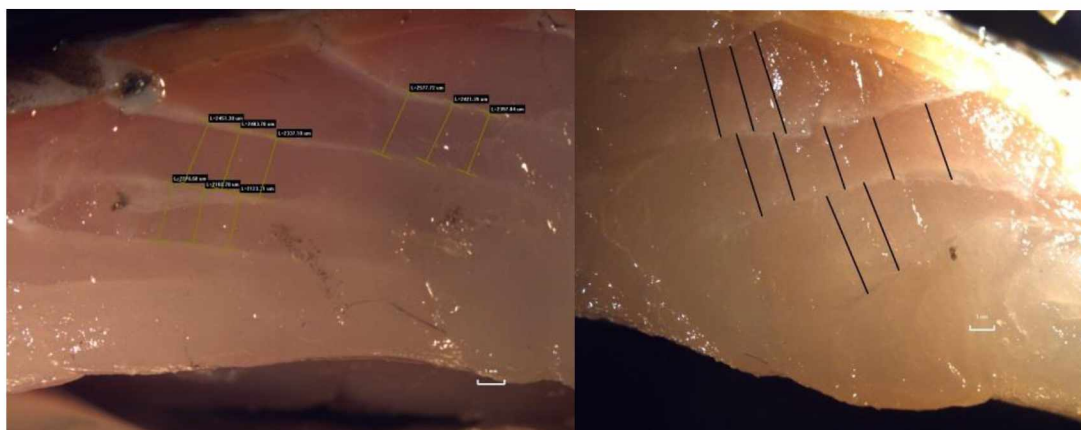
(β)

Εικόνα 5. Ανάλυση της ποιότητας των ιστού των ιχθύων τσιπούρας μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 36 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης.

3.3 Παρατήρηση της μεταβολής των μυομερών του μυϊκού ιστού των απεψυγμένων φιλέτων με στερεοσκόπιο

Για την ανάλυση και σύγκριση των αποστάσεων των μυομερών που πραγματοποιήθηκαν στο στερεοσκόπιο, στα δειγματά μας χρησιμοποιήθηκε στατιστικό πρόγραμμα Origin, καθώς και το πρόγραμμα Gimp 2 για την μέτρηση των αποστάσεων προκειμένου να γίνει σύγκριση των μυομερών από την ημέρα 0

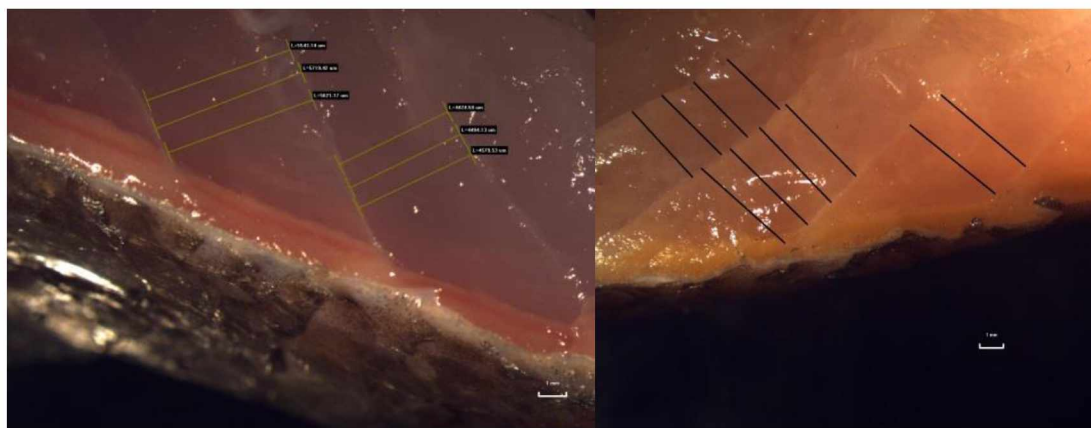
μέχρι την αντίστοιχη ημέρα απόψυξης στις παρακάτω εικόνες (Εικ. 6, 7, 8) φαίνονται οι αποστάσεις που μετρήθηκαν στα ίδια δείγματα για τις διαφορετικές μέρες απόψυξης:



(α)

(β)

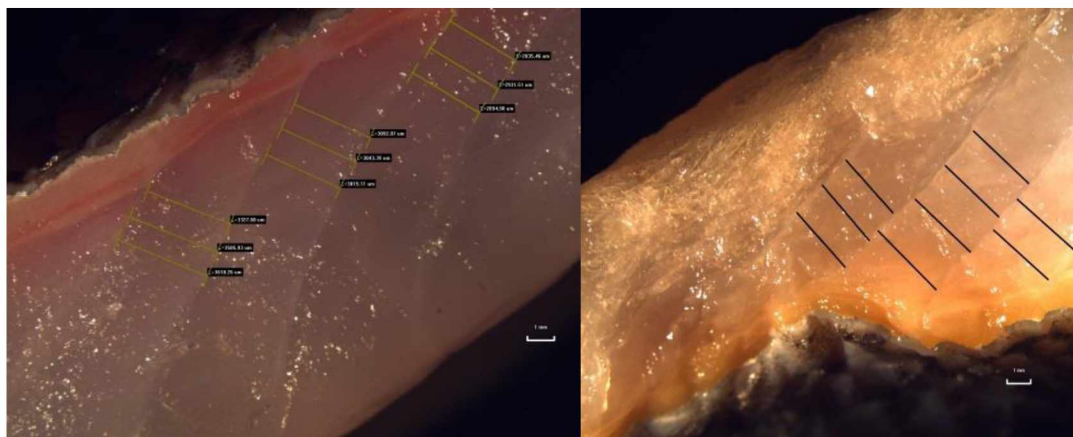
Εικόνα 6. Ανάλυση αποστάσεων των μυομερών της σάρκας των ιχθύων τσιπούρας μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης.



(α)

(β)

Εικόνα 7. Ανάλυση αποστάσεων των μυομερών της σάρκας των ιχθύων τσιπούρας μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 36 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης.



(α)

(β)

Εικόνα 8. Ανάλυση αποστάσεων των μυομερών της σάρκας των ιχθύων τσιπούρας μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 63 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης.

Σε όλες τις περιπτώσεις η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά των αποστάσεων μεταξύ της ημέρας 0 (όπου το σύνολο των αποστάσεων ακολουθεί την κανονική κατανομή) και της ημέρας 10 (όπου το σύνολο των αποστάσεων ακολουθεί την κανονική κατανομή), της ημέρας 0 και της ημέρας 36 (όπου τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή) καθώς και της ημέρας 0 και της ημέρας 63 (όπου τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή) ($p > 0.05$). Για να γίνει η στατιστική ανάλυση και να ελεγχθούν οι στατιστικές διαφορές, στις περιπτώσεις όπου τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Mann–Whitney test, ενώ στις περιπτώσεις που ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το t-test. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στο παράρτημα σε πίνακες.

- **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο:**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νωποί ιχθύες υπό ψύξη αλλοιώνονται κυρίως λόγω μικροβιακής δραστηριότητας. Τα *Pseudomonas* και τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H_2S), όπως είναι το *Shewanella putrefaciens*, αποτελούν τους κυριότερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς των δύο πιο εμπορικών ειδών ιχθύων της ελληνικής υδατοκαλλιέργειας, τσιπούρας και λαβρακιού. Ωστόσο η ψύξη δεν αποτελεί τον μοναδικό τρόπο αποθήκευσης των αλιευμάτων. Τα επεξεργασμένα ψάρια, όπως είναι τα φιλέτα τσιπούρας, συνηθίζεται να αποθηκεύονται επίσης υπό συνθήκες κατάψυξης στις οικιακές κουζίνες και στα εστιατόρια.

Η κατάψυξη αναστέλλει την αύξηση των μικροοργανισμών και επομένως η υποβάθμιση της ποιότητας τους δεν είναι μικροβιακής φύσεως, πράγμα το οποίο προέκυψε και από την παρούσα μελέτη. Οι πληθυσμοί της OMX (σε TSA και IA), αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, όπως είναι τα *Pseudomonas* spp. (σε CFC), Οξυγαλακτικά βακτήρια (σε MRS) και *Enterobacteriaceae* (σε VRBGA) βρέθηκαν σε παρόμοιους πληθυσμούς τόσο πριν όσο και μετά την κατάψυξη. Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* τα οποία συνήθως χρησιμοποιούνται ως δείκτης καλής υγιεινής στα τρόφιμα, είναι δυνατό να βρεθούν σε συγκυριαρχία με τα *Pseudomonas* σε συνθήκες που προσομοιάζουν τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος (Parlapani et al. 2014). Η διαφορά του 1-2 λογαρίθμων που βρέθηκε μετά από 36 ημέρες συντήρησης στους -20 σε σχέση με τα αρχικά δείγματα πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι η μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιείται σε διαφορετικά



τμήματα του φιλέτου. Είναι γνωστό ότι το τρόφιμο και συγκεκριμένα η σάρκα του ιχθύος αποτελεί ένα οικοσύστημα μέσα στο οποίο τα βακτήρια συγκεντρώνονται και πολλαπλασιάζονται στα σημεία όπου έχουν μεγαλύτερη πρόσβαση σε θρεπτικά υλικά. Ωστόσο, υπάρχουν θέσεις πάνω στην σάρκα όπου τα θρεπτικά αυτά που απαιτούνται για την αύξηση των μικροοργανισμών βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση ή μηδαμινή. Έτσι, υπάρχει διαφοροποίηση στον πληθυσμό των μικροοργανισμών ανάλογα με τη θέση τους και την πρόσβασή τους σε θρεπτικά στη σάρκα του ιχθύος (πριν το προϊόν καταψυχθεί).

Αν και η κατάψυξη δεν επιτρέπει την αύξηση των μικροοργανισμών, άρα και την μικροβιακή αλλοίωση των ιχθύων, ποιοτική υποβάθμιση και απόρριψη των προϊόντων υφίσταται κυρίως λόγω αυτολυτικών / ενζυμικών δράσεων. Ένζυμα όπως οι πρωτεάσες, οι καλπαΐνες και οι κολλαγονάσες, είναι δυνατό να δρουν στη σάρκα του ιχθύος με αποτέλεσμα το μαλάκωμα της υφής και τελικώς την ποιοτική υποβάθμιση και απόρριψη του προϊόντος κατά τη διάρκεια της κατάψυξης (Μποζιάρης, 2010). Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε για πρώτη φορά προσπάθεια να εκτιμηθεί αυτή η ποιοτική υποβάθμιση λόγω της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και στερεοσκοπίου. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των αποστάσεων των μυομερών στον ιστό των ιχθύων κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε κατάψυξη. Αλλαγές πιθανόν να είναι εμφανής σε πιο προχωρημένα στάδια της αλλοίωσης/συντήρησης στην κατάψυξη. Επομένως, η ανάλυση των αποστάσεων μεταξύ των μυομερών και τελικώς η εκτίμηση της ποιότητας των ιχθυηρών στην κατάψυξη με τη μεθοδολογία αυτή σε ιχθυηρά μετά

από μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην κατάψυξη, είναι ένα θέμα προς συζήτηση για μελλοντική έρευνα σε μεταπτυχιακό επίπεδο.

- **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο :**

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Δεν υφίσταται μικροβιολογική αλλοίωση κατά τη διάρκεια συντήρησης σε κατάψυξη. Μικρές μεταβολές στους πληθυσμούς των βακτηρίων πιθανόν οφείλονται σε δειγματοληψία τμημάτων του φιλέτου όπου οι μικροοργανισμοί είχαν ήδη αναπτυχθεί πριν την κατάψυξη.
2. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των αποστάσεων των μυομερών στον ιστό των ιχθύων κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε κατάψυξη βάσει της ανάλυσης με στερεοσκόπιο. Αλλαγές πιθανόν να είναι εμφανής σε πιο προχωρημένα στάδια της αλλοίωσης/συντήρησης στην κατάψυξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- **Ashie I. N. A., Smith J. P., Simpson B. K. (1996)** Spoilage and self-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (1- 2): 87- 121
- **Ashie I. N. A., Smith J. P., Simpson B. K. (1996)** Spoilage and self-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (1-2): 87-121.
- **Boziaris, I. S. and Parlapani, F. F. (2014)**.Microbiological examination of seafood. In: *Seafood Processing. Technology, Quality & Safety*.Edited by Boziaris I. S. IFST Advances in Food Science Series Wiley-Blackwell. 387-418
- **Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993)** Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283- 294.
- **Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993)** Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283- 294.
- **Drosinos E. H., Nychas G.-J. E. (1996)***Brochothrixthermosphacta*, a dominant microorganism in Mediterranean fresh fish (*Sparusaurata*) stored under modified atmosphere *Italian Journal of Food Science and Technology*, 4: 323- 330
- **Gram L., Dalgaard P. (2002)** Fish spoilage bacteria: Problems and solutions. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 262- 266.
- **Gram L., Huss H.H. (1996)** Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 121-137
- **Gram L., Trolle G., Huss H. H. (1987)**Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*,4: 65-72.
- **Gomes H.A., Silva E.N., Nascimento M.R.L., Fukuma H.T. (2003)** Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. *Food Chemistry*, 80: 433- 437.



- **Goulas A.E., Kontominas M.G. (2007)** Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparusaurata*): Biochemical and sensory attributes. Food Chemistry, 100: 287-296
- **Huis in't Veld J. H. J. (1996)** Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology, 33: 1-18.
- **Huss H.H. (1995)** Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO, Rome, 195.
- **Kostaki M., Giatrakou V., Savvaidis I. N., Kontominas M.G. (2009)** Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchuslabrax*) fillets. Food Microbiology, 26: 475- 482.
- **Koutsoumanis K., Nychas G.-J. E. (1999)** Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Boopsboops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. Applied and Environmental Microbiology, 65: 698- 706.
- **Koutsoumanis K., Lampropoulou K., Nychas G.-J.E. (1999)** Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream stored aerobically at 0, 8 and 15°C. Journal of Food Protection, 62: 398- 402
- **Masniyom P., Benjakul S., Visessanguan W. (2002)** Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices under modified atmosphere packaging. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82: 873-880.
- **Mexis S.F., Chouliara E., Kontominas M.G. (2009)** Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. Food Microbiology, 26: 598–605.
- **Uchiyama H., Kato N. (1974)** Partial freezing as a means of preserving fish freshness. 1. Changes in amino acid, TMA-N, ATP and its related compounds, and nucleic acid during storage. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 40: 1145.
- **(http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es)**



- **M.M.Reis, E.Martínez, E.Saitua, R.Rodríguez, I.Pérez, I.Olabarrieta (2017)** Non-invasive differentiation between fresh and frozen/thawed tuna fillets using near infrared spectroscopy (Vis-NIRS). LWT - Food Science and Technology, 78: 129-137
- **L. Tinacci, A. Armani, A. Guidi, D. Nucera, D. Shvartzman, V.Miragliotta, A. Coli, E.Giannessi, M. R. Stornelli, B. Fronte, F.D.Iacovo, F. Abramo (2018)** Historical discrimination of fresh and frozen/thawed fish meat : European hake (*Merluccius merluccius*) as a possible model for white meat fish species. Food Control, 92: 154-161
- **Μποζιάρης Ι. (2010).** Υγιεινή και συντήρηση εδώδιμων αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις. σελ. 236

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:

Τα στατιστικά αποτελέσματα του συνόλου των αποστάσεων των μυομερών με τους μέσους όρους και τυπική απόκλιση μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 10, της ημέρας 0 και της ημέρας 36 καθώς και της ημέρας 0 και της ημέρας 63 φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 4

Απευλογμένη τσιπούρα 10 ημερών	MEAN	Standard deviation	N total	Sum	Minimum	Median	Maximum
0 days	3,2706	0,77449	116	379,3897	1,8923	3,455	4,7179
10 days	3,6794	1,01508	116	426,8102	2,0192	3,51	5,9538

Πίνακας 5

Απευλογμένη τσιπούρα 36 ημερών	MEAN	Standard deviation	N total	Sum	Minimum	Median	Maximum
0 days	4,17147	1,15724	116	483,89103	2,45513	3,88974	6,29744
36 days	4,13847	0,71746	116	480,06282	2,93974	3,98205	6,65385

Πίνακας 6

Απευλογμένη τσιπούρα 63 ημερών	MEAN	Standard deviation	N total	Sum	Minimum	Median	Maximum
0 days	3,36903	0,54867	116	390,80769	2,55897	3,19103	4,83205
63 days	3,62549	0,86233	116	420,55641	2,41154	3,22692	5,49103