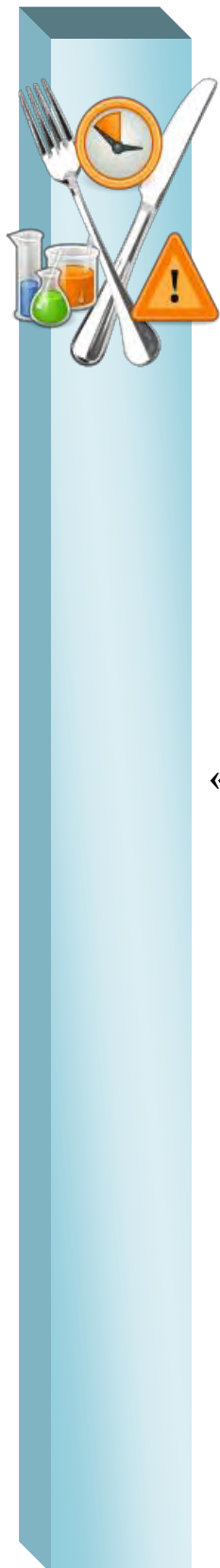




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιακή αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής, απεντερωμένων
εκτρεφόμενων ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού
(*Dicentrarchus labrax*) κατά τη συντήρηση υπό ψύξη»**

ΒΕΡΛΟΣ Ι. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΒΟΛΟΣ, 2014

**«Μικροβιακή αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής, απεντερωμένων
εκτρεφόμενων ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus
labrax*) κατά τη συντήρηση υπό ψύξη»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

- 2) **Κωνσταντίνος Κορμάς (Δρ.)**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος.*

- 3) **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης (M.Sc., Ph.D.)**, Λέκτορας, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος.*



Louis Jean Pasteur (27.12.1822 – 28.09.1895)

«Ποτέ ιθα δεν θα ενέλθει το δόγμα της αυτομάτου
γενέσεως από το δανάριο χύδιμα ιθα του κατέφερε
από το αιόλο ιδείραμα»

(Σορβόνη, 1864)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα μεγάλο, επίπονο, κοπιαστικό μια συνάμα εντυπωσιακό, ευχάριστο και βαθυστόχαστο ταξίδι στο χώρο της γνώσης και στο ναό της ελεύθερης έκφρασης των ιδεών τελειώνει με την ολοκλήρωση, εκπόνηση και παρουσίαση της παρούσας Πρόπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, μα ένα άλλο, πιο σημαντικό, αρχίζει.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Κωνσταντίνο Κορμά και κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω πάρα πολύ τον κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή των χημικών αναλύσεων με τη χρήση συσκευής απόσταξης μεθ' υδρατμών και τον κ. Κωνσταντίνο Κορμά για την μύηση στον φανταστικό κόσμο της Μικροβιολογίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Φωτεινή Παρλαπάτη, 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, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην Ελένη Βουδαντά, συμφοιτήτρια, φίλη και πάνω απ' όλα πολύτιμη συνεργάτη στις ατελείωτες ώρες εργασίας και μαθημάτων τόσο στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής του τμήματος όσο και στις αίθουσες διαλέξεων των μαθημάτων της Σχολής. Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ και στη συνάδελφο Ελίνα Βαλαρούτσου, προπτυχιακή φοιτήτρια και πολύ καλή εγκάρδια φίλη, με την οποία είχα την τιμή, την χαρά και την ευκαιρία να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο, καθώς και σε όλους τους συμφοιτητές μου με τους οποίους διήνυσα μια εκπληκτική πορεία όλα αυτά τα χρόνια.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλλοίωση στα νωπά αλιευτικά προϊόντα οφείλεται στη μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Ο βαθμός αλλοίωσης των προϊόντων αυτών προσδιορίζεται με οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεθόδους. Η σπουδαιότερη χημική παράμετρος που σχετίζεται με τη μικροβιακή δραστηριότητα είναι το Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N). Η ψύξη είναι ένα μέσο για τη διατήρηση των ιχθύων πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση. Όταν ένας ιχθύς αποθηκεύεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, τόσο οι ενζυμικές όσο και οι χημικές αντιδράσεις, καθώς και η μικροβιακή ανάπτυξη, επιβραδύνονται. Απεντερωμένοι ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*) και Ευρωπαϊκού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*), από ιχθυοκαλλιέργεια ελληνικών υδάτων, συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο του 2012 για οργανοληπτικές, χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις κατά τη διάρκεια των 15 ημερών (360 h) αποθήκευσης υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2 ± 1 °C. Οι τιμές του pH δεν παρουσίασαν ουσιαστική αύξηση, αν και οι τιμές της σάρκας του λαβρακιού ήταν μεγαλύτερες από αυτές της τσιπούρας, με μέσο όρο 6.30 αντί 6.15, αντίστοιχα. Οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*) αποτέλεσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς κατά το πέρας της περιόδου αποθήκευσης. Τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta*, καθώς και τα Enterobacteriaceae, επίσης αποτέλεσαν μέρος του βακτηριακού πληθυσμού, αλλά οι πληθυσμοί τους ήταν χαμηλότεροι από τους προηγούμενους. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα ξεπέρασε τους $7 \log_{10}$ cfu/g μετά από 7 ημέρες (168 h) αποθήκευσης, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) δεν βρέθηκαν πάνω από το όριο ανίχνευσης ($2 \log_{10}$ cfu/g) καθ' όλη την διάρκεια. Για τους χημικούς δείκτες αλλοίωσης, το TVB-N παρουσίασε ουσιαστική αύξηση από τα μέσα του χρόνου αποθήκευσης, καταγράφοντας τιμές 29.40 και 25.90 mg N/100 g σάρκας ιχθύος (ημέρα 13, 312 h), για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα, σε σχέση με τις αρχικές τιμές (ημέρα 1, 24 h), οι οποίες ήταν περί τα 8.86 και 8.54 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, αντίστοιχα, χωρίς να φτάσει σε επίπεδα υψηλότερα των 30 - 35 mg N/100 g (Νομοθετικό όριο), καθιστώντας τον αναξιόπιστο χημικό δείκτη αλλοίωσης (CSI). Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδωσε βαθμό “Άριστα” την ημέρα 1 (24 h) για την τσιπούρα, “Πολύ καλό” και “Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό” τις ημέρες 3 (72 h) και 5 (120 h) αντίστοιχα, ενώ την ημέρα 7 (168 h)

έδωσε βαθμό “Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό” → “Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό”. Την ημέρα 9 (216 h) έδωσε βαθμό “Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό”, ενώ τις ημέρες 11 (264 h) έως 15 (360 h) τα προϊόντα χαρακτηρίστηκαν ως πλήρως αλλοιωμένα. Για το λαβράκι, η οργανοληπτική αξιολόγηση έδωσε βαθμό “Άριστα” την ημέρα 1 (24 h), βαθμό “Άριστα” → “Πολύ καλό” και “Πολύ καλό” → “Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό” για τις ημέρες 3 (72 h) και 5 (120 h) αντίστοιχα, ενώ την ημέρα 7 (168 h) έδωσε βαθμό “Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό” → “Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό”. Την ημέρα 9 (216 h) έδωσε βαθμό “Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό”, ενώ τις ημέρες 11 (264 h) έως 15 (360 h) τα προϊόντα χαρακτηρίστηκαν ως πλήρως αλλοιωμένα. Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό ψύξη, είναι 7 ημέρες (168 h), ενώ ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης και για τους δυο ιχθύες είναι 9 ημέρες (216 h).

Λέξεις-κλειδιά: Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), Εμπορικός χρόνος ζωής, Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N).

ABSTRACT


Fresh fish spoilage is caused by the metabolic activity of microorganisms. The degree of spoilage is determined by sensory, microbiological and chemical analysis. Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) is a chemical spoilage index related to microbial activity. Chilling is a mean to preserve fish before processing or consumption. When fish is stored at low temperatures, both enzymatic and chemical reactions and microbial growth are inhibited. Cage-cultured whole gutted gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), from Greek sea waters, were sampled in November of 2012 for sensory, chemical and microbial spoilage indicators during 15 days (360 h) under chill (2 ± 1 °C), aerobic storage. The pH value did not show a major increase during 15 days of storage period, although pH value of European sea bass was higher than gilthead sea bream, with averages 6.30 and 6.15, respectively. *Pseudomonas* spp. and H₂S-producing bacteria (including *Shewanella putrefaciens*) were the dominant bacteria at the end of the 15-day storage period. *Brochothrix thermosphacta* and Enterobacteriaceae were also part of the spoilage microbiota, but their counts were always less than those of Pseudomonads and H₂S-producing bacteria. Mesophilic counts for gutted gilthead sea bream and European sea bass exceeded 7 log₁₀ cfu/g after 7 days (168 h) of storage. Lactic acid bacteria (LAB) were not found above the detection limit (2 log₁₀ cfu/g) throughout storage period. Regarding the chemical indicators of spoilage, TVB-N values were increased substantially from the middle of storage, reaching values of 29.40 and 25.90 mg N/100 g (day 13, 312 h) for gilthead sea bream and European sea bass, compared to the initial values (day 1, 24 h) of 8.86 and 8.54 mg N/100 g, respectively and their values never reached concentrations higher than 30 - 35 mg N/100 g, which is the legislation limit, making TVB-N a poor (unreliable) chemical spoilage index (CSI). Sensory assessment, using the EC freshness scale, gave a grade E for the day 1 (24 h) for gutted gilthead sea bream, a grade A for the day 3 (72 h), a grade B for the day 5 (120 h) and B → C for the day 7 (168 h). At the day 9 (216 h), the grade was C, while on days 11 (264 h) by 15 (360 h) the products were characterized as spoiled. For gutted European sea bass, sensory assessment gave a grade E for the day 1 (24 h), a grade E → A for the day 3 (72 h), a grade A → B for the day 5 (120 h) and B → C for the day 7 (168 h). At the day 9 (216 h), the grade was C, while on days 11 (264 h) by

15 (360 h) the products were characterized as spoiled. Results of this study indicate that the commercial shelf-life of gutted gilthead sea bream and European sea bass stored in chilled, aerobic conditions, as determined by the overall acceptability sensory scores and microbiological data, is 7 days (168 h), while rejection time for both fish is 9 days (216 h).

Keywords: *Gilthead sea bream (Sparus aurata), European sea bass (Dicentrarchus labrax), Specific Spoilage Organisms (SSOs), Shelf-life, Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N).*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Γενικά στοιχεία για τις υδατοκαλλιέργειες.....	12
1.2 Στοιχεία βιολογίας και παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού.....	13
1.3 Διατροφική αξία ιχθύων.....	14
1.4 Αλλοίωση ιχθύων.....	15
1.4.1 Γενικά.....	15
1.4.2 Μεταθανάτιες μεταβολές και μικροβιακή αλλοίωση.....	15
1.4.3 Δείκτες αλλοίωσης ιχθύων.....	20
1.5 Συντήρηση ιχθύων υπό ψύξη.....	24
1.6 Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων υπό ψύξη.....	25
1.7 Σκοπός εργασίας.....	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1 Γενικά.....	28
2.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	28
2.3 Μικροβιολογική αξιολόγηση.....	30
2.4 Μέτρηση pH.....	39
2.5 Χημική αξιολόγηση.....	39
2.5.1 Μέτρηση Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N).....	39
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
3.1 Οργανοληπτική ανάλυση.....	42
3.2 Μικροβιολογική σύνθεση.....	44
3.3 Ανάλυση pH.....	47
3.4 Χημική ανάλυση.....	48
3.4.1 Ανάλυση Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N).....	48

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	58
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	59
6.2 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία.....	65
6.3 Ελληνική βιβλιογραφία.....	66
6.4 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία.....	66
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	68

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τις υδατοκαλλιέργειες

Οι υδατοκαλλιέργειες είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος παραγωγικός τομέας ζωικής παραγωγής στον κόσμο. Σύμφωνα με στοιχεία της Διεθνούς Οργάνωσης Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιεργειών παρουσίασε σημαντική αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, από λιγότερο από 10^6 t το 1950 σε $59.4 \cdot 10^6$ t το 2004, αύξηση που αντιστοιχεί σε $70.3 \cdot 10^9$ \$, ενώ το 2010 η παγκόσμια παραγωγή ανήλθε στους $60 \cdot 10^6$ t, που αντιστοιχεί σε $119 \cdot 10^9$ \$. Οι σημαντικότερες αιτίες της εντυπωσιακής αυτής ανάπτυξης είναι οι εξής (FAO 2007; FAO 2012):

- ✓ Η διαφαινόμενη αδυναμία της φυτικής και ζωικής παραγωγής να καλύψουν τις ανάγκες σε τρόφιμα του παγκόσμιου πληθυσμού που αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς.
- ✓ Η βαθμιαία μείωση της προσφοράς αλιευμάτων που προέρχονται από τη συλλεκτική και ελεύθερη αλιεία των θαλασσών και των εσωτερικών νερών (λιμνών, ποταμών), λόγω υπεραλίευσης ή/και περιβαλλοντικής υποβάθμισης των βιοτόπων τους.
- ✓ Η συνεχής αύξηση της ζήτησης σε αλιεύματα. Αυτή, οφείλεται αφενός στο πρότυπο υγιεινής διατροφής που προβάλλεται πλέον σε πολλές οικονομικά αναπτυγμένες χώρες, στις απαιτήσεις του οποίου ανταποκρίνονται τα διατροφικά χαρακτηριστικά των ιχθύων (πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, μεγάλη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα κυρίως της σειράς ω-3 και χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο) και αφετέρου της σχετικής βελτίωσης του οικονομικού επιπέδου των χωρών του τρίτου κόσμου, καθώς επίσης και στον ολοένα αυξανόμενο ανθρώπινο πληθυσμό, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες (Hanson *et al.*, 1994).

Στην Ευρώπη, η ζήτηση για νωπούς ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού έχει αυξηθεί σημαντικά κατά την τελευταία δεκαετία, λόγω του επιθυμητού αρώματος, της γεύσης και της ποιότητας και κατά συνέπεια η υψηλή διατροφική αξία των προϊόντων αυτών κάνει την εκτροφή τους μια επικερδή επιχείρηση, κυρίως στη Νότια Ευρώπη (Alasalvar *et al.*, 2001; Lougovois *et al.*, 2003; Papadopoulos *et al.*, 2003; Chouliara

et al., 2004), ενώ η αύξηση της παραγωγής σε όλες τις μεσογειακές χώρες, από το 1990, έχει αλλάξει σημαντικά την ισορροπία της προσφοράς και της ζήτησης, δεδομένου ότι όταν, για παράδειγμα, η τσιπούρα διατίθεται νωπή, η αυξανόμενη ποσότητα δεν μπορεί να απορροφηθεί εύκολα (Bilgin *et al.*, 2008).

1.2 Στοιχεία βιολογίας και παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού

Οι ιχθύες (Pisces) 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, τη Γαλλία και την Ισπανία (Παπουτσόγλου, 2008).



Εικόνα 1.2.1. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

(¹[https](https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en))

Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυοκαλλιέργειας της τσιπούρας ανήλθε στους 159730 t το 2012 (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en), με κύρια χώρα παραγωγής την Ελλάδα η οποία, σύμφωνα με στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ, παρήγαγε 51308.56 t το 2011 (<http://www.statistics.gr>).

Το Ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (**Εικόνα 1.2.4**) θεωρείται ένα από τα πιο αξιόλογα είδη εκτρεφόμενων ιχθύων, όχι μόνο για την Ελλάδα, αλλά και για όλες τις μεσογειακές και ευρωπαϊκές χώρες. Τούτο οφείλεται στην παραδοσιακή ευρύτατη συμμετοχή του στο διαιτολόγιο, κυρίως των παράκτιων πληθυσμών, αφενός, και αφετέρου, στη σημαντική του εμπορική αξία, η οποία είναι αποτέλεσμα της μεγάλης ετήσιας ελεγχόμενης παραγωγής του, που σε συνδυασμό με τη σχετικά προσιτή τιμή του, συνετέλεσε σημαντικά στην επίτευξη υψηλού επιπέδου διαθεσιμότητάς του σε όλες τις αγορές των ευρωπαϊκών και μεσογειακών χωρών (Παπουτσόγλου, 2008).



Εικόνα 1.2.4. Ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*).

(²[https](https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en))

Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυοκαλλιέργειας λαβρακιού ανήλθε στους 153182 t το 2012 (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en), με κύρια χώρα παραγωγής την Ελλάδα η οποία, σύμφωνα με στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ, παρήγαγε 37088.96 t το 2011 (<http://www.statistics.gr>).

1.3 Διατροφική αξία ιχθύων

Τα τρόφιμα είναι προϊόντα πρωτογενούς παραγωγής ή προϊόντα που προέρχονται από αυτά, με κατάλληλη επεξεργασία, τα οποία προσλαμβάνει ο άνθρωπος από το στόμα. Τα θρεπτικά στοιχεία των τροφίμων αποτελούν οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, οι βιταμίνες, τα λίπη και τα ανόργανα στοιχεία. Παρέχουν ενέργεια στον οργανισμό με τη διάσπαση των λιπών και των υδατανθράκων, προάγουν την ανάπτυξη και τη συντήρηση του οργανισμού και ρυθμίζουν βασικές λειτουργίες με τη συμβολή των πρωτεϊνών, των αλάτων και των βιταμινών (Μπλούκας, 2004).

Οι ιχθύες θεωρούνται μια πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών στη διατροφή του ανθρώπου. Η σημασία της αλυσίδας των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων έχει κερδίσει την

προσοχή, λόγω της πρόληψης καρδιαγγειακών ασθενειών (συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας νόσου) και εγκεφαλικών επεισοδίων στον άνθρωπο (Domingo, 2007). Εκτός από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, των οποίων τα οφέλη είναι γνωστά στο ευρύ κοινό, περιέχουν και μια ποικιλία βιταμινών (B₁₂ και D), καθώς και ιχνοστοιχεία (Ιώδιο, I και Σελήνιο, Se) (Leduc *et al.*, 2012). Επομένως, η λευκή τους σάρκα και η ήπια γεύση, σε συνδυασμό με τα λιπαρά οξέα, είναι οι πιο σημαντικές ιδιότητες που ζητούνται από τους καταναλωτές (Kyra and Lougonois, 2002).

1.4 Αλλοίωση ιχθύων

1.4.1 Γενικά

Οι νωποί ιχθύες είναι ιδιαίτερα ευπαθή προϊόντα σε σύγκριση με άλλα προϊόντα διατροφής λόγω της βιολογικής σύνθεσής τους (Ashie *et al.*, 1996). Η αλλοίωση είναι πιο ταχεία σε πρωτεϊνούχα τρόφιμα, όπως οι ιχθύες. Αυτά τα τρόφιμα είναι ιδιαίτερα θρεπτικά, διαθέτουν ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο pH, υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και συνεπώς επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός εύρους μικροοργανισμών (Huis in't Veld, 1996). Επιπλέον, το υψηλό μεταθανάτιο (post mortem) pH (>6.0) και η χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (<0.5 %) επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων (Gram and Huss, 1996). Η αλλοίωση μπορεί να οφείλεται σε φυσικές βλάβες, ανάπτυξη μικροοργανισμών, κτλ και εκτιμάται πως το ¼ της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων χάνεται λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Huis in't Veld, 1996), ενώ η Εφαρμογή Ορθών Πρακτικών Παραγωγής και Επεξεργασίας (GMP), Υγιεινής (GHP) και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP) είναι απαραίτητα για την παραγωγή, διανομή, αποθήκευση και λιανικό εμπόριο καταψυγμένων ή υπό ψύξη προϊόντων (Li *et al.*, 2012).

1.4.2 Μεταθανάτιες μεταβολές και μικροβιακή αλλοίωση

Αλλοίωση ενός τροφίμου, γενικότερα, εννοούμε την μείωση της ποιότητάς του όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως η γεύση, η οσμή, η εμφάνιση και η υφή (Ashie *et al.*, 1996). Ένα τρόφιμο θεωρείται αλλοιωμένο όταν έχουν πραγματοποιηθεί αλλαγές σε αυτό που το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη

κατανάλωση (Huis in't Veld, 1996) λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Gill, 1986; Lambert *et al.*, 1991; Gram and Dalgaard, 2002).

Η υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων μπορεί να προκληθεί, κυρίως, λόγω μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξειδωσης (τάγγιση) (Ashie *et al.*, 1996, Gram & Huss 1996), παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αρχική απώλεια της νωπότητας (Li *et al.*, 2012). Όμως, μόνο οι μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών ευθύνεται για την συνολική αλλοίωση των νωπών ιχθύων (Gram & Dalgaard, 2002), ενώ το εύρος των συνθηκών στο οποίο κυριαρχεί το φαινόμενο της αλλοίωσης είναι απαραίτητο για την ποσοτική προσέγγιση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής στο ράφι (Koutsoumanis *et al.*, 2002; Erkan, 2007; Sallam, 2007).

Επομένως, η υποβάθμιση της ποιότητας των ιχθύων οδηγεί σε απώλεια της ποιότητας και σε επακόλουθη αλλοίωση (Gram and Huss, 1996) λόγω του σχηματισμού αμινών, σουλφιδίων, αλκοολών, κετονών, αλδευδών και οργανικών οξέων (Gram and Dalgaard, 2002; Parlapani *et al.*, 2014). Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων (7 έως 9 log₁₀ cfu/g) βρίσκεται κανονικά σε αλλοιωμένα τρόφιμα, στο σημείο δηλαδή της απόρριψης των προϊόντων (Gram *et al.*, 1987; Dalgaard *et al.* 1993; Gram and Huss, 1996; Huis in't Veld, 1996; Ólafsdóttir *et al.* 1997; Stohr *et al.*, 2001).

Η ποικιλομορφία και αφθονία του βακτηριακού πληθυσμού ενός ιχθύος εξαρτάται από το περιβάλλον στο οποίο έχει αλιευτεί και όχι από το είδος (Banja, 2002), ενώ η αρχική ποιότητα των αλιευμάτων επηρεάζεται από το είδος, τις εποχιακές βιολογικές αλλαγές, τις συνθήκες εκτροφής και τις τεχνικές εξαλίευσης (Erkan and Özden, 2008).

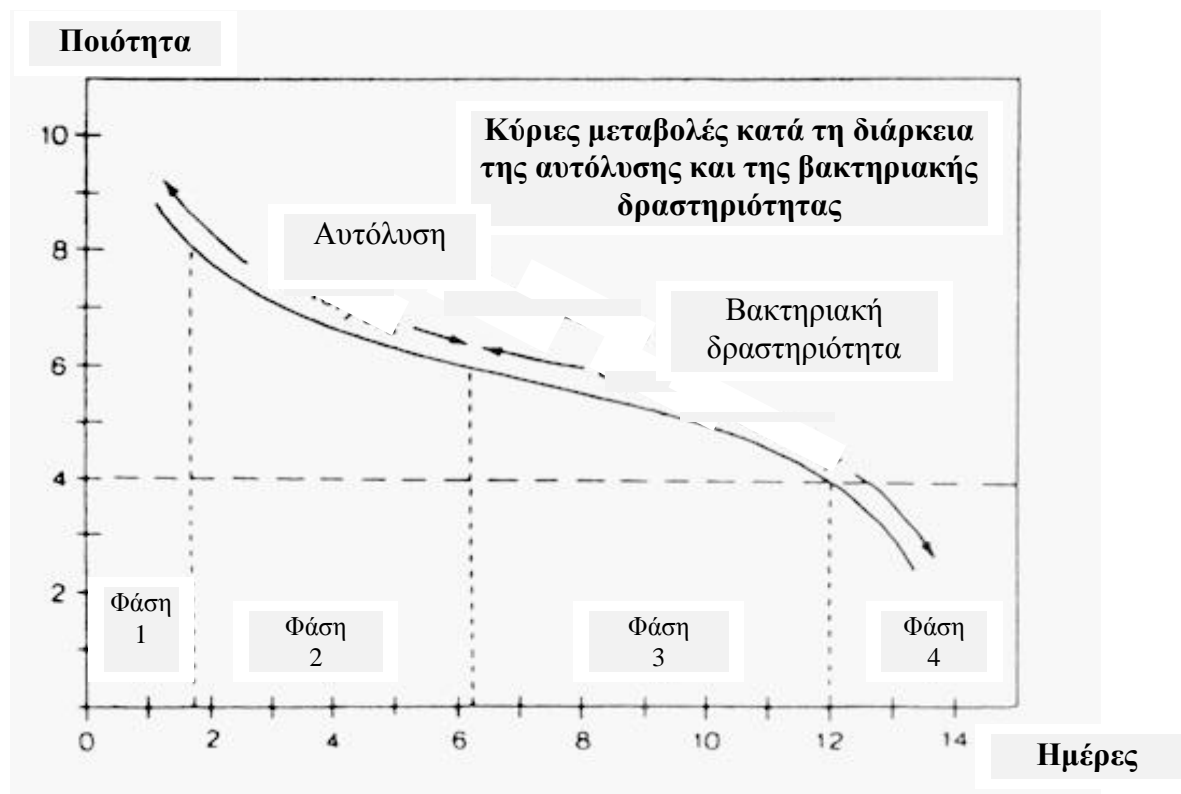
Έτσι, σημαντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην μικροβιακή πολυπλοκότητα των αλιευμάτων (Gram and Huss, 1996):

- Ειδική-μη ειδική μόλυνση του ιχθύος από το περιβάλλον ή την επεξεργασία,
- Συνθήκες που οφείλονται σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (T °C, pH, Eh, a_w, μικροβιακές αλληλεπιδράσεις),
- Ποικιλόθερμη φύση των ιχθύων,
- Υψηλό pH (>6.0) της μεταθανάτιας σάρκας,
- Ποσοστό μη πρωτεϊνικού αζώτου,
- Παρουσία οξειδίου τριμεθυλαμίνης (TMAO).

Γενικά, η υποβάθμιση χαρακτηρίζεται από απώλεια της νοπής γεύσης των ιχθύων. Μετά από μια περίοδο, όπου οι οσμές και το άρωμα περιγράφονται ως ουδέτερα, οι πρώτες ενδείξεις είναι ανιχνεύσιμες. Αυτό σταδιακά θα γίνει πιο έντονο και θα οδηγήσει σε απόρριψη (Πίνακας 1.4.2.1).

Πίνακας 1.4.2.1. Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων (Προσαρμοσμένο από Gram and Huss, 1996).

Μικροβιακή δραστηριότητα	Οργανοληπτική εκδήλωση
Αποικοδόμηση συστατικών του τροφίμου	Παραγωγή δυσάρεστων οσμών
Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαρτικού υλικού	Σχηματισμός “βλέννας”
Ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων	Ορατές οσμές ή άχρωμες αποικίες
Διοξείδιο του άνθρακα CO ₂ από υδατάνθρακες ή αμινοξέα	Παραγωγή αερίου
Παραγωγή χρωστικών που διαχέονται	Αποχρωματισμός-Αλλαγή χρώματος



Εικόνα 1.4.1.1. Στάδια υποβάθμισης της ποιότητας νοπών ιχθύων συντηρημένων σε πάγο (0 °C). Το επίπεδο απόρριψης ορίζεται με την οριζόντια διακεκομμένη γραμμή που περνά από την τιμή 4 του κατακόρυφου άξονα (Προσαρμοσμένο από Huss, 1995).

Σύμφωνα με τους Gram and Huss, (1996) οι οσμές και οι γεύσεις σε έναν ιχθύ εξαρτώνται από το είδος και τη γεωγραφική προέλευση, με την αλλοίωση των ιχθύων από ύδατα της εύκρατης ζώνης να χαρακτηρίζεται από υδροθειούχες (H₂S) οσμές.

Ο χρόνος ζωής ενός νωπού ιχθύος, όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (**Εικόνα 1.4.2.1**), μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 4 φάσεις (Μποζιάρης, 2010):

Φάση 1: Ο ιχθύς είναι πολύ φρέσκος, μυρίζει “θάλασσα” και έχει σχετικά γλυκιά, μεταλλική και εκλεπτυσμένη γεύση.

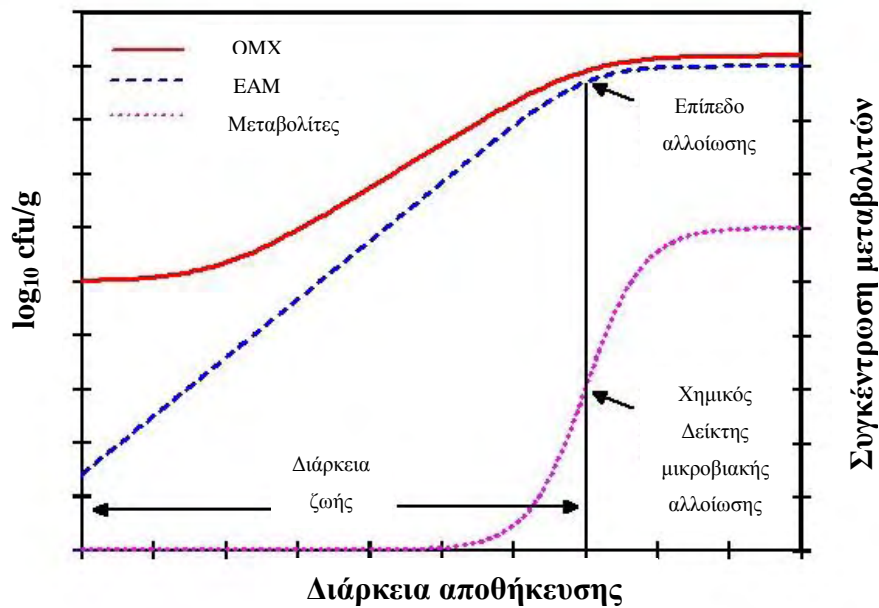
Φάση 2: Υπάρχει απώλεια εκλεπτυσμένης γεύσης, δεν υπάρχουν όμως άσχημες οσμές, ενώ η υφή είναι ακόμα καλή.

Φάση 3: Αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές διάφορες οσμές, λόγω παραγωγής τριμεθυλαμίνης (TMA). Κατόπιν, αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές οσμές αμμωνιακής φύσεως.

Φάση 4: Οι ιχθύες χαρακτηρίζονται αλλοιωμένοι και απορρίπτονται.

Ωστόσο, ένας μικρός αριθμός του βακτηριακού πληθυσμού φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως Ειδικό Αλλοιωγόνο Μικροοργανισμοί (EAM, Specific Spoilage Organisms, SSO's), παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη (Gram and Dalgaard, 2002), ενώ αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram and Huss, 1996; Gram and Dalgaard, 2002).

Αρχικά, οι EAM εμφανίζονται σε χαμηλούς μικροβιακούς πληθυσμούς και αποτελούν μόνο ένα μικρό κλάσμα του φυσικού βακτηριακού πληθυσμού, ενώ αναπτύσσονται ταχύτερα και παράγουν μεταβολίτες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για οσμές και γεύσεις που τελικά προκαλούν οργανοληπτική απόρριψη (**Εικόνα 1.4.2.2**) (Gram and Dalgaard, 2002).



Εικόνα 1.4.2.2. Μεταβολές στον Ολικό Μικροβιακό Πληθυσμό (OMX), στους Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς (EAM), καθώς και στους Χημικούς Δείκτες μικροβιακής αλλοίωσης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης (Προσαρμοσμένο από Huis in't Veld, 1996).

Η κυτταρική συγκέντρωση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών καλείται “ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης” και η συγκέντρωση των μεταβολιτών που αντιστοιχεί στο επίπεδο της αλλοίωσης, “αντικειμενικός χημικός δείκτης αλλοίωσης” (Chemical Spoilage Index, CSI) (Εικόνα 1.4.2.2) (Gram and Dalgaard, 2002; Huis in't Veld, 1996).

Επιπρόσθετα, το μη πρωτεϊνικό άζωτο (NPN) αποτελείται από χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις που περιέχουν υδατοδιαλυτό άζωτο (N), όπως αμινοξέα και νουκλεοτίδια τα οποία είναι άμεσα διαθέσιμα, ως υπόστρωμα, για βακτηριακή ανάπτυξη. Η αποσύνθεση των αμινοξέων που περιέχουν θείο (S) (μεθειονίνη, κυστεΐνη) είναι ιδιαίτερα σημαντικό φαινόμενο στην αλλοίωση, καθώς προκαλούν οσμές λόγω σχηματισμού υδρόθειου (H_2S) και μεθυλμερκαπτανών (Gram and Huss, 1996). Οι EAM παράγουν επίσης αμμωνία (NH_3), βιογενείς αμίνες, οργανικά οξέα, υποξανθίνη από τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), οξικό και γαλακτικό οξύ [το γαλακτικό οξύ αυξάνει το pH της σάρκας των ιχθύων, ενώ η ευαισθησία του βακτηρίου *Shewanella putrefaciens* αυξάνεται (Gram and Huss, 1996)]. Η

τριμεθυλαμίνη (TMA) παράγεται από βακτήρια που χρησιμοποιούν το οξείδιό της (TMAO) στην αναερόβια αναπνοή (Gram and Dalgaard, 2002). Υπό αερόβιες συνθήκες αποθήκευσης, η αλλοίωση των ιχθύων συχνά σχετίζεται με τη μεταγλυκοζητική χρησιμοποίηση των αμινοξέων από τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. Επομένως, η γλυκόζη φαίνεται να προσφέρει έναν τρόπο προσδιορισμού του χρόνου έναρξης της αλλοίωσης, καθώς και προσδιορισμό της διάρκειας ζωής (Dainty, 1996). Επιπρόσθετα, ορισμένοι μεταβολίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ποιότητας. Οι κλασικοί δείκτες (Classical Single-compounds Quality Index) για τα αλιεύματα είναι το Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N), η τριμεθυλαμίνη (TMA) και η υποξανθίνη (Gram and Dalgaard, 2002).

1.4.3 Δείκτες αλλοίωσης ιχθύων

Δείκτες μικροβιακής ποιότητας ή διάρκειας ζωής είναι προϊόντα μεταβολισμού των οποίων η παρουσία σε συγκεκριμένα επίπεδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της υφιστάμενης ποιότητας ενός προϊόντος (Jay, 2000).

Η νωπότητα καθορίζει την ποιότητα των ιχθύων, ως τρόφιμα, τόσο για εκείνα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για οικιακό μαγείρεμα όσο και για εκείνα που προορίζονται για εμπορική επεξεργασία, δεδομένου ότι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά είναι σαφώς ορατά στους καταναλωτές και απαραίτητα για την ικανοποίησή τους (Papadopoulos *et al.*, 2003; Özogul *et al.*, 2007), ενώ παρέχουν μια άμεση πληροφόρηση για την ποιότητα (Alasalvar *et al.*, 2001). Έτσι, η οσμή είναι η πιο σημαντική παράμετρος για τον προσδιορισμό της νωπότητας των ιχθύων (Béné *et al.*, 2001), συμπεριλαμβανομένων της γεύσης, της υφής και της εμφάνισης (Koutsoumanis *et al.*, 2002).

Ως *οργανοληπτική αξιολόγηση* ορίζεται η τεχνική που χρησιμοποιείται για την μέτρηση, ανάλυση και ερμηνεία των χαρακτηριστικών των τροφίμων, όπως αυτά γίνονται αντιληπτά από τις ανθρώπινες αισθήσεις (όραση, όσφρηση, γεύση, ακοή) (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). Έτσι, η χαρακτηριστική οσμή των νωπών ιχθύων συνδέεται, κυρίως, με αλδεΐδες και κετόνες και αλλάζει ως αποτέλεσμα της ενζυμικής και βακτηριακής δράσης κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης (Edirisinge *et al.*, 2007). Όμως, η οργανοληπτική ανάλυση έχει ορισμένα μειονεκτήματα, δηλαδή εξαρτάται από εκπαιδευμένο προσωπικό, είναι υποκειμενική και δαπανηρή, ενώ μπορεί να εισάγει σοβαρούς κινδύνους ασφάλειας, όπως η παραγωγή τοξινών (Baixas-Nogueras *et al.*,

2003; Papadopoulos *et al.*, 2003). Κατά τα τελευταία 50 χρόνια ένας μεγάλος αριθμός από οργανοληπτικά συστήματα έχει αναπτυχθεί για την ανάλυση των νωπών ιχθύων. Στην Ευρώπη, η πιο κοινή και αποδεκτή μέθοδος είναι το σύστημα που εισήχθη το 1996 (2406/96/EOK). Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει 4 περιγραφικά επίπεδα και βαθμούς νωπότητας από E έως C (E - Άριστο, A - Πολύ καλό, B - Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό, C - Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό). Ωστόσο, η καταλληλότητα της μεθόδου έχει αμφισβητηθεί, διότι με τη χρήση γενικών παραμέτρων δεν λαμβάνονται υπόψη οι ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ ειδών (Baixas-Nogueras *et al.*, 2003). Διαθέτει όμως και αρκετά πλεονεκτήματα, όπως τάχος, αξιοπιστία και εξαρτάται από ελάχιστο ή καθόλου εξοπλισμό (Erkan and Özden, 2008). Μια εναλλακτική οργανοληπτική μέθοδος είναι η Μέθοδος Δείκτη Ποιότητας (Quality Index Method, QIM), η οποία έχει αναπτυχθεί για διάφορα είδη ιχθύων. Βασίζεται σε λεπτομερείς περιγραφές οι οποίες ομαδοποιούνται σε διαφορετικούς χαρακτήρες στο πλαίσιο γενικών χαρακτηριστικών, όπως οι οφθαλμοί και τα βράγχια. Σε αντίθεση με τα παραδοσιακά συστήματα, η QIM είναι ακριβής, αντικειμενική και ανεξάρτητη. Έχει επίσης χαρακτηριστεί ως ταχεία και αξιόπιστη προσέγγιση για την αξιολόγηση της ποιότητας των ιχθύων. Οι ιχθύες για τους οποίους έχει σχεδιαστεί το σύστημα αυτό είναι ο γάδος, η τσιπούρα και άλλα (Baixas-Nogueras *et al.*, 2003).

Επίσης, η δραστηριότητα των μικροοργανισμών είναι σημαντικός παράγοντας για τη διάρκεια ζωής των νωπών ιχθύων. Οι αλιεύοντες ιχθύες περιέχουν διαφορετικό βακτηριακό πληθυσμό και ως εκ τούτου η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα κυμαίνεται από 2 έως 6 \log_{10} cfu/g για ολόκληρους ιχθύες ή φιλέτα. Στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης η OMX είναι συνήθως της τάξης των 7 έως 9 \log_{10} cfu/g (Ólafsdóttir *et al.*, 1997; Mol *et al.*, 2007). Οι αερόβιοι βακτηριακοί πληθυσμοί, επομένως, μπορούν να αποτελέσουν ένα στοιχείο μικροβιολογικών κριτηρίων για την εκτίμηση της ποιότητας ενός προϊόντος, όταν αυτά τα κριτήρια χρησιμοποιούνται α) για τον έλεγχο τροφίμων ως προς τη συμμόρφωσή τους με κανονισμούς ή οδηγίες καθορισμένες από διάφορες ρυθμιστικές υπηρεσίες, β) για τον έλεγχο τροφίμων ως προς τη συμμόρφωσή τους με τις προδιαγραφές αγοράς και γ) για τον έλεγχο της τήρησης της Ορθής Πρακτικής Παρασκευής και Επεξεργασίας (Good Manufacturing Practice, GMP) (Montivelle and Matthews, 2010).

Ως εκ τούτου, η καταμέτρηση των EAM που εμπλέκονται στην αλλοίωση των ιχθύων θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο στην πρόβλεψη της υπολειπόμενης διάρκειας ζωής τους (Jørgensen *et al.*, 1988). Έτσι, η ανίχνευση των

EAM, όπως *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Photobacterium phosphoreum*, κτλ, θεωρείται η πιο αξιόπιστη μέθοδος εκτός της OMX για να αξιολογήσει με ακρίβεια τη νωπότητα ή το επίπεδο αλλοίωσης των αλιευμάτων (Ólafsdóttir *et al.*, 2006). Παρεμπιπτόντως, το *Photobacterium phosphoreum* δεν έχει βρεθεί να αποτελεί αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στους ιχθύες από τα μεσογειακά ύδατα (Boziaris *et al.*, 2011; Parlapani *et al.*, 2013).

Σύμφωνα με τους Jay, (2000) και Montivelle and Matthews, (2010) οι μικροοργανισμοί, όταν χρησιμοποιούνται ως δείκτες ποιότητας, θα πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις:

- Θα πρέπει να είναι παρόντες και ανιχνεύσιμοι στα τρόφιμα προς αξιολόγηση,
- Η ανάπτυξή τους και ο αριθμός τους θα πρέπει να έχουν άμεση αρνητική συσχέτιση με την ποιότητα του προϊόντος,
- Θα πρέπει να εντοπίζονται εύκολα και να διακρίνονται από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς,
- Θα πρέπει να είναι καταμετρήσιμοι σε σύντομο χρονικό διάστημα,
- Η ανάπτυξή τους δεν θα πρέπει να επηρεάζεται δυσμενώς από τον υπόλοιπο βακτηριακό πληθυσμό του τροφίμου.

Όμως, η χρήση συμβατικών μεθόδων (φαινοτυπικά χαρακτηριστικά) δεν είναι πάντα αποτελεσματική για τον εντοπισμό των στελεχών σε επίπεδο είδους, ενώ οι μοριακές μέθοδοι έχουν αποδειχθεί ένα ισχυρό εργαλείο, όχι μόνο για την αναγνώριση σε επίπεδο είδους, αλλά και σε επίπεδο στελέχους (Tryfinopoulou *et al.*, 2007; Boziaris and Parlapani, 2014).

Ακόμα, ο Dainty, (1996) αναφέρει πως οι μικροβιολογικές μέθοδοι είναι χρονοβόρες, ενώ οι οργανοληπτικές είναι υποκειμενικές, οπότε οι χημικές μέθοδοι και κυρίως ο προσδιορισμός των κατάλληλων χημικών δεικτών είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για ταχύ και αξιόπιστο ποιοτικό έλεγχο.

Έτσι, εκτός από μικροβιολογικές δοκιμές, μια ποικιλία χημικών μεθόδων έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της διάρκειας ζωής των ιχθύων. Αυτές περιλαμβάνουν μέτρησεις pH, Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N), τριμεθυλαμίνης (TMA), κτλ (Scherer *et al.*, 2006; Mol *et al.*, 2007).

Η περιεκτικότητα των ιχθύων σε TVB-N, TMA και μεμονωμένων νουκλεοτιδίων, καθώς και αναλογίες αυτών (K, Ki, H, G-values) έχουν προταθεί ως δείκτες υποβάθμισης της ποιότητας των ιχθύων. Σύμφωνα με τους Drosinos *et al.*, (1997) οι χημικές αλλαγές, ως δυνητικό διαγνωστικό ή δείκτες ποιότητας, δεν έχουν μελετηθεί

στην ίδια έκταση με τις μικροβιολογικές αλλαγές. Το TVB-N αναμένεται να σχετίζεται με διάφορες οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως η γεύση, ενώ είναι πιο αξιόπιστο από τα προαναφερόμενα. Περιλαμβάνει μετρήσεις NH_3 , διμεθυλαμίνης (DMA) και TMA. Επομένως, είναι ένας καλός δείκτης, κατάλληλος και με εύκολη εφαρμογή (Antoine *et al.*, 2007). Ωστόσο, οι περισσότερες χημικές ενώσεις και οι μικροβιακοί μεταβολίτες αυξάνουν όταν η αλλοίωση βρίσκεται σε προχωρημένα στάδια, επομένως δεν έχουν προγνωστική αξία, επειδή οι ιχθύες δεν έχουν εναπομείναντα χρόνο ζωής (Jørgensen *et al.*, 1988). Επιπλέον, η αξία του TVB-N περιορίζεται στο γεγονός ότι σημαντικές ποσότητες των ενώσεων αυτών έχουν παραχθεί όταν οι ιχθύες βρίσκονται ήδη στο αρχικό στάδιο αλλοίωσης (Lougonois *et al.*, 2003). Έτσι, παρέχει πληροφορίες μόνο για το τελικό στάδιο αλλοίωσής τους (Özogul *et al.*, 2007), ενώ σχετίζεται θετικά με τη μικροβιακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλοίωσης στους μεσογειακούς ιχθύες κατά τη λήξη της περιόδου αποθήκευσης (Boziaris *et al.*, 2011).

Τέλος, τα μεταβολικά προϊόντα που αναφέρονται παραπάνω μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση και πρόβλεψη της ποιότητας των προϊόντων. Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν είναι οι εξής (Jay, 2000):

- Να είναι προϊόντα μεταβολισμού ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού,
- Η αρχική τους συγκέντρωση, στο υπό εξέταση τρόφιμο, να είναι μηδενική ή ελάχιστη,
- Η συγκέντρωση να αυξάνεται κατά τη διάρκεια της συντήρησης,
- Να μην αυξομειώνεται,
- Να σχετίζεται με κάποιο οργανοληπτικό χαρακτηριστικό,
- Ο προσδιορισμός να είναι ταχύς, εύκολος και ακριβείς.

Επομένως, η ανίχνευση των μικροβιακών μεταβολιτών θα ήταν χρήσιμο εργαλείο, ως εναλλακτική ή συμπληρωματική πληροφορία, στην μικροβιακή απαρίθμηση σε μοντέλα για την ταχεία αξιολόγηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής των προϊόντων αλιείας (Dainty, 1996; Ólafsdóttir *et al.*, 2006). Όμως, οι περισσότερες από τις προαναφερθείσες μεθόδους είναι ιδιαίτερα δαπανηρές και χρονοβόρες και ως εκ τούτου υπάρχει η ανάγκη εύρεσης νέων και ταχέων τεχνικών για την εκτίμηση της νωπότητας των ιχθύων που σχετίζονται με την έρευνα και την βιομηχανία (Edirisinge *et al.*, 2007).

1.5 Συντήρηση ιχθύων υπό ψύξη

Συντήρηση τροφίμων (food preservation) ορίζεται η λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση των αιτιών που προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση ή την αλλοίωση των τροφίμων, έτσι ώστε αυτά να είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή και ασφαλή για την υγεία του για καθορισμένο χρονικό διάστημα, όταν διατηρούνται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Μπλούκας, 2004).

Ως *ψύξη (cold storage)* εννοούμε τη διατήρηση των τροφίμων σε περιβάλλον με θερμοκρασίες, κατά κανόνα, από ~ 16 έως - 2 °C (Montivelle and Matthews, 2010). Για ευαλλοιώτα προϊόντα, όπως οι ιχθύες, η διατήρηση σε ψύξη πραγματοποιείται από 0 έως 7 °C το πολύ (Μποζιάρης, 2010). Η ψύξη είναι ένα μέσο για τη διατήρηση των ιχθύων πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση. Όταν ένα ψάρι αποθηκεύεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, τόσο οι ενζυμικές όσο και οι χημικές αντιδράσεις (Chomnawang *et al.*, 2007; Erkan and Özden, 2008), καθώς και μικροβιακή ανάπτυξη, επιβραδύνονται (Μπλούκας, 2004).

Επίσης, *διάρκεια ζωής* ορίζεται ως το χρονικό διάστημα κάτω από καθορισμένες συνθήκες αποθήκευσης για το οποίο ένα προϊόν διατροφής παραμένει ασφαλές και κατάλληλο προς χρήση (Erkan, 2007; Sallam, 2007). Επομένως, η περίοδος από την εξαλίευση μέχρι την κατανάλωση έχει σημαντική επίδραση σε τέτοια χαρακτηριστικά και καθορίζει την εμπορική χρήση και την εξέταση των καταναλωτών (Pastoriza *et al.*, 2008). Έτσι, η αποθήκευση των ιχθύων σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους (Lambert *et al.*, 1991; Gökodlu *et al.*, 1998). Το ποσοστό της υποβάθμισης, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης υπό ψύξη, ποικίλει ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του υποστρώματος και μεταβολιτών του ιστού, τη μικροβιακή μόλυνση και τις συνθήκες αποθήκευσης μετά την εξαλίευση (Özyurt *et al.*, 2009), ενώ η ποιότητα των ιχθύων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις θερμοκρασίες αποθήκευσης (Gökoğlu *et al.*, 2004).

Εν κατακλείδι, η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι μια μέθοδος συντήρησης που χρησιμοποιείται για την επιβράδυνση της μικροβιακής αλλοίωσης από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Έχει το πλεονέκτημα της διατήρησης της νωπότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, όμως η αδυναμία της να θανατώσει πλήρως τους μικροοργανισμούς, εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία (Ashie *et al.*, 1996). Έτσι, οι χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνουν την βακτηριακή ανάπτυξη και παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Lambert *et al.*, 1991).

Ενδεικτικά παραδείγματα διάρκειας ζωής ιχθύων, αποθηκευμένων υπό συνθήκες ψύξης, φαίνονται στον Πίνακα 1.4.4.1.

Πίνακας 1.4.4.1. Ενδεικτικά παραδείγματα διάρκειας ζωής ιχθύων κατά τη συντήρησή τους υπό ψύξη.

ΕΙΔΟΣ ΙΧΘΥΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ	ΠΗΓΗ
Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	Ολόκληροι ιχθύες Πάγος (melting ice), 0 °C	17 ημέρες	Kyrana <i>et al.</i> , (1997)
Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Ολόκληροι και απεντερωμένοι ιχθύες, Πάγος, 0 °C	8 ημέρες	Papadopoulos <i>et al.</i> (2003)
Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Ολόκληροι ιχθύες, Πάγος (melting ice), 0 °C	15 ημέρες	Kyrana and Lougonois, (2002)
Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Ολόκληροι ιχθύες και φιλέτα, Πάγος, 0 °C	12-13 ημέρες	Taliandourou <i>et al.</i> , (2003)
Ιριδίζουσα πέστροφα (<i>Onchorynchus mykiss</i>)	Ολόκληροι ιχθύες και φιλέτα, Πάγος, 0 °C	15 ημέρες	Chytiri <i>et al.</i> , (2004)
Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	Ολόκληροι απεντερωμένοι ιχθύες Πάγος, 0 °C	16 ημέρες	Parlapani <i>et al.</i> , (2013)
Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	Φιλέτα 0, 5 και 15 °C	14, 5 και 2 ημέρες	Parlapani <i>et al.</i> , (2014)

1.6 Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων αποθηκευμένων υπό χαμηλές θερμοκρασίες

Η βακτηριακή αλλοίωση σε καταψυγμένους ή υπό ψύξη ιχθύες και θαλασσινά, αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες, που προέρχονται από ύδατα της εύκρατης ζώνης, προκαλείται από Gram⁻ ψυχρότροφα βακτήρια, όπως *Pseudomonas* spp., *Alteromonas*, *Shewanella*, *Flavobacterium* (Gram and Huss, 1996), *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Vibrio* (Gram *et al.*, 1990; Lambert *et al.*, 1991; Debevere and Boskou, 1996; Jay, 2000), καθώς επίσης και από κάποια Gram⁺ μεσόφιλα βακτήρια, όπως *Micrococcus*, coryneforms, *Bacillus*, *Brochothrix thermosphacta* και *Lactobacillus* (Gram *et al.*, 1990; Ashie *et al.*, 1996; Jay, 2000). Έχει προταθεί ότι οι ιχθύες από εύκρατα ύδατα αλλοιώνονται πιο εύκολα από τους αντίστοιχους των τροπικών ή ζεστών υδάτων επειδή είναι εκ των προτέρων επιμολυσμένα με Gram⁻

βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις. Όταν οι ιχθύες αποθηκεύονται υπό συνθήκες ψύξης η μικροβιακή δραστηριότητα επιβραδύνεται, όμως ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός είναι πολύ ετερογενής και με το χρόνο τα ψυχρότροφα βακτήρια (*Pseudomonas* spp. και *Moraxella*) θα κυριαρχήσουν ως αποτέλεσμα του βακτηριακού ανταγωνισμού (Ashie *et al.*, 1996).

Επομένως, το δυναμικό αλλοίωσης εξαρτάται από τα βακτήρια τα οποία θα κυριαρχήσουν, καθώς και στην ικανότητά τους να σχηματίζουν δύσοσμες ενώσεις, όπως H_2S , πτητικές αμίνες, εστέρες, κτλ (Gill, 1996).

Τα υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια, ενώ αποτελούν τους ΕΑΜ για τους ιχθύες που προέρχονται από τις Βόρειες θάλασσες και έχουν αποθηκευτεί υπό συνθήκες ψύξης ($0\text{ }^{\circ}C$) (Gram *et al.*, 1987; Jørgensen and Huss, 1998), είναι οι δεύτεροι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί στα αλιεύματα που προέρχονται από τη Μεσόγειο (Tryfinopoulou *et al.*, 2007). Το βακτήριο *Shewanella putrefaciens* παράγει ΤΜΑ (Drosinos *et al.*, 1997), ενώ το δυναμικό του να αναπτύσσει ενώσεις θείου (S) οι οποίες συμβάλουν στην απώλεια του αρώματος των ιχθύων σε προχωρημένα στάδια αποθήκευσης, είναι γνωστή. Το συγκεκριμένο βακτήριο έχει ταυτοποιηθεί ως ο ΕΑΜ στον γάδο (*Gadus morhua*), καθώς και σε φιλέτα μπακαλιάρου (*Melanogrammus aeglefinus*), αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες (Dalgaard *et al.*, 1993; Ólafsdóttir *et al.*, 2006). Όταν τα επίπεδα του οξυγόνου (O_2) εξαντλούνται, το ΤΜΑΟ χρησιμεύει ως τελικός αποδέκτης για την αναερόβια αναπνοή και ανάγεται σε ΤΜΑ (Debevere and Boskou, 1996).

Επίσης, τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. είναι οι κυρίαρχοι ΕΑΜ των ιχθύων που προέρχονται από τη θάλασσα της Μεσογείου και αποτελούν συνάρτηση του εμπορικού χρόνου ζωής (Ólafsdóttir *et al.*, 2006; Tryfinopoulou *et al.*, 2007). Τα βακτήρια αυτά είναι ο πιο κοινός μικροοργανισμός αλλοίωσης, ιδιαίτερα υπό αερόβια αποθήκευση (Gill, 1996; Huis in't Veld, 1996). Μεταβολίζουν το κλάσμα του αζώτου (N) που περιέχεται σε μη πρωτεϊνικές ενώσεις. Στη συνέχεια, η παραγωγή λιπασών θα απελευθερώσει οξέα και αμινοξέα, τα οποία θα οδηγήσουν στην παραγωγή δυσάρεστων οσμών, γεύσεων, καθώς και τάγγισης (Huis in't Veld, 1996), ενώ ανιχνεύονται οργανοληπτικά ως σαπρές οσμές και γεύσεις (Gill, 1996).

Ακόμη, σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 5 έως $10\text{ }^{\circ}C$, τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae κυριαρχούν των *Pseudomonas* spp. (Huis in't Veld, 1996), ενώ τα Vibrionaceae αλλοιώνουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες ιχθύες οι οποίοι δεν βρίσκονται κάτω από συνθήκες συντήρησης (Gram and Dalgaard, 2002).

Ωστόσο, η παρουσία των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae υποδηλώνει πιθανή μόλυνση από κόπρανα ή ανεπαρκή επεξεργασία (Huis in't Veld, 1996).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) αλλοιώνουν τρόφιμα ζυμώνοντας τη γλυκόζη προς σχηματισμό γαλακτικού οξέος, βλέννας, διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και αυξάνοντας το pH. Αναπτύσσονται βραδέως σε αερόβιες συνθήκες ψύξης (Huis in't Veld, 1996). Επίσης, κυριαρχούν υπό συνθήκες κενού σε ιχθύες που έχουν υποστεί κάπνιση κατά το τέλος της περιόδου αποθήκευσης (Leroi *et al.*, 1998).

Τέλος, τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta*, χρησιμοποιούν τη γλυκόζη και τα προϊόντα μεταβολισμού, όπως το οξικό οξύ και η ακετόνη (Lambert *et al.*, 1991), ενώ είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί σε συνθήκες κενού (Vacuum) και τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP) (Huis in't Veld, 1996).

Συμπερασματικά, υπό αερόβιες συνθήκες, οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν είναι τα Gram⁻ ψυχρότροφα, μη ζυμωτικά ραβδόμορφα βακτήρια. Έτσι, υπό συνθήκες ψύξης, ο βακτηριακός πληθυσμός των ιχθύων που αλιεύονται σε εύκρατα, υποτροπικά και τροπικά ύδατα αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από βακτήρια *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια, ενώ αποτελούν τους επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε αλιεύματα που προέρχονται από ελληνικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Tryfinopoulou *et al.*, 2007; Boziaris *et al.*, 2011).

1.7 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν η διερεύνηση των μικροβιολογικών και οργανοληπτικών μεταβολών, καθώς και των αζωτούχων μεταβολικών προϊόντων για τον προσδιορισμό της ποιότητας και την τεκμηρίωση του εναπομείναντος εμπορικού χρόνου ζωής των προϊόντων τσιπούρας και λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά

Ολόκληροι απεντερωμένοι ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού βάρους 500 g, της εταιρίας «ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΙΑ ΚΕΦΑΛΛΟΝΙΑΣ ΑΒΕΕ», μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο Μικροβιολογίας και Υγιεινής του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος 24 h μετά την αλίευσή τους. Οι ιχθύες αλιεύτηκαν στις 21/10/2012. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ισοθερμικά κιβώτια με πάγο και έφτασαν στο εργαστήριο στις 22/10/2012 και κατόπιν αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C). Οι μετρήσεις ξεκίνησαν λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ιχθύες είχαν αλιευτεί και διακινηθεί σε πάγο 24 h πριν φτάσουν στο εργαστήριο.

Καταμετρήθηκαν, ανά 2 ημέρες, η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, καθώς και οι πληθυσμοί των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως *Pseudomonas* spp., υδροθειούχα βακτήρια (H_2S) (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), Οξυγαλακτικά (LAB) και Enterobacteriaceae, καθώς και οι μεταβολές του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N) ανά 4 ημέρες. Το pH των ψαριών ορίστηκε αυτό που μετρούνταν κατά την πρώτη αραίωση στο ομογενοποιημένο δείγμα.

Επιπλέον, αξιολογήθηκαν μια σειρά από οργανοληπτικά στοιχεία (γεύση, χρώμα, οσμή, εμφάνιση, κτλ) για να προσδιοριστεί ο εμπορικός χρόνος ζωής των προϊόντων και να συσχετισθεί με τις μικροβιακές και φυσικοχημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

2.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πενταβάθμια κλίμακα αρεσκείας (hedonic scale). Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ποιότητας των ιχθύων με τις αισθήσεις ήταν εκείνα που περιγράφονται στον Πολύγλωσσο Οδηγό της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη Βαθμονόμηση της Νωπότητας των αλιευτικών προϊόντων (Multilingual Guide to EU Freshness Grades for Fishery Products, Howgate *et al.*, 1992), καθώς και στον

Κανονισμό 2406/96/ΕΚ. Έτσι, το Ε αντιστοιχήθηκε με το 5 και βαθμολογήθηκε ως άριστο, τα Α, Β και C με 4, 3 και 2 αντίστοιχα, ως φρέσκο, αποδεκτό και μη αποδεκτό, ενώ το 1 αντιστοιχήθηκε στην προχωρημένη αλλοίωση (κάτι που δεν υπάρχει στον Οδηγό). Σύμφωνα με τη γενική βαθμολογία, ως χρόνος απόρριψης είναι ο χρόνος όπου το προϊόν βαθμολογήθηκε με 2, ενώ ως εμπορικός χρόνος ζωής είναι ο χρόνος όπου το προϊόν βαθμολογήθηκε με 2.5.

Επιπλέον, αξιολογήθηκε η γεύση του μαγειρεμένου ιχθύος χρησιμοποιώντας ξανά πενταβάθμια κλίμακα αρεσκείας. Κομμάτι σάρκας 20 g τυλίχθηκε σε αλουμινόχαρτο και ψήθηκε σε προθερμασμένο φούρνο (250 °C) για 15 min. Το δείγμα αφέθηκε για 10 min εκτός φούρνου και δοκιμάστηκε. Με 5 βαθμολογήθηκε η έντονη ευχάριστη γεύση και με 4, 3, 2, 1 το γευστικό χωρίς ιδιαίτερη γεύση, το άνοστο αλλά χωρίς ανεπιθύμητη γεύση, το άνοστο μη ελκυστικό με σχετικά όξινη αλλά όχι πικρή γεύση και το πικρό με ανεπιθύμητη οσμή.

Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της νωπότητας των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί παρακάτω (Πίνακας 2.4.1).

Πίνακας 2.4.1. Κριτήρια νωπότητας για λευκούς ιχθύες σύμφωνα με το σχήμα οργανοληπτικού ελέγχου (Κανονισμός 2406/96/ΕΚ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης περί καθορισμού κοινών προδιαγραφών εμπορίας ορισμένων αλιευτικών προϊόντων.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΝΩΠΟΤΗΤΑΣ

ΣΗΜΕΙΟ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗΣ	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΟ (E)	ΠΟΛΥ ΚΑΛΟ (A)	ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΜΕΝΟ ΑΛΛΑ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (B)	ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΜΕΝΟ ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (C)	ΑΠΑΡΑΔΕΚΤΟ (spoiled)
Δέρμα	Χρώμα ζωηρό και ιριδίζον ή οπαλίζον χωρίς αποχρωματισμό	Ζωηρός αλλά όχι λαμπρός χρωματισμός	Αποχρωματισμός, θαμπό χρώμα	Θαμπός χρωματισμός	Πολύ θαμπό, τραχύ, έντονα αποχρωματισμένο, ρυτιδωμένο
Δερματική βλέννα	Υδαρής και διαυγή	Ελαφρώς θολή	Γαλακτόχρωμη	Κιτρινωπή, γκριζα, αδιαφανής	Καφέ, πολύ πηκτή, έντονα κολλώδης
Οφθαλμός	Κυρτός (προεξέχον), κόρη μαύρη και στιλπνή, κερατοειδής διαφανής	Κυρτός και ελαφρώς βυθισμένος, μαύρη και μη στιλπνή κόρη, ελαφρώς οπαλίζον κερατοειδής	Επίπεδος, οπαλίζον κερατοειδής, αδιαφανής κόρη	Κοίλος στο κέντρο, γκριζα κόρη, θολός κερατοειδής	Τελείως βυθισμένος, γκριζα κόρη, θαμπός και αποχρωματισμένος κερατοειδής

Βράγχια	Χρώμα ζωηρό, έλλειψη βλέννας	Λιγότερο ζωηρό χρώμα, διαφανής βλέννα	Φαιόγκριζα αποχρωματισμένα, παχεία και αδιαφανής βλέννα	Βολή (κιτρινωπή) βλέννα	Καφέ, κολλώδης και γκριζοκίτρινη βλέννα
Περιτόναιο (σε εκσπλαχνισμένα ψάρια)	Λείο, στιλπνό, αποσπώμενο από τη σάρκα	Ελαφρώς θαμπό, εύκολη απόσπαση από τη σάρκα	Κηλιδωτό, εύκολη απόσπαση από τη σάρκα	Δεν προσφύεται στη σάρκα	Δεν προσφύεται στη σάρκα
Οσμή βραγχίων και κοιλιακής κοιλότητας	Οσμή φυκιών, οσμή φρέσκου ελαίου	Έλλειψη οσμής φυκιών, ουδέτερη οσμή	Οσμή ζύμωσης, ελαφρώς υπόξινη	Όξινη	Αμμωνιακή
Σάρκα	Ανθεκτική και ελαστική, λεία επιφάνεια	Λιγότερο ελαστική	Ελαφρώς μαλακή, λιγότερο ελαστική, επιφάνεια κηρώδης και θαμπή	Μαλακή, εύκολη απόσπαση λεπιών από το δέρμα, επιφάνεια αρκετά ρυτιδωμένη	Πολύ μαλακή
Αιμοφόρα αγγεία (κοιλιακοί μύς)	Έντονο περίγραμμα, ζωηρό κόκκινο χρώμα	Έντονο περίγραμμα, σκοτεινότερο χρώμα αίματος	Ασαφές περίγραμμα, καστανόχρωμα	Τελείως ασαφές περίγραμμα, κιτρίνισμα σάρκας, καστανόχρωμα	Τελείως ασαφές περίγραμμα, κιτρίνισμα σάρκας, καστανόχρωμα

2.3 Μικροβιολογική αξιολόγηση

A. Μικροβιολογικά υλικά

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK), εκτός από το STAA (Streptomycin Sulphate, Thallus Acetate, cycloheximide actidione agar) το οποίο προερχόταν από την Biolife Italiana srl (Milano, Italy). Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

B. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Το TSA (LAB011) είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την

ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται παρακάτω:

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2 .

2. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.

Το θρεπτικό μέσο (LAB108) παρέχει όλα εκείνα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού κάνει το θρεπτικό εκλεκτικό για *Pseudomonas* spp. Η πεπτόνη ζελατίνης και η καζεΐνη από ενζυματική πέψη παρέχουν το άζωτο (N), το θείο (S) και τις βιταμίνες που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί. Το χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και το θειικό κάλιο (K_2SO_4) παράγουν χρωστική. Η γλυκερόλη συμπληρώνεται ως πηγή άνθρακα (C). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες Sodium Nalidixate, Fucidin και Cephaloridine είναι εκλεκτικά υλικά και χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν Gram⁺ και ορισμένα Gram⁻ βακτήρια.

Συστατικά: g/1000 ml

Gelatin Peptone	16.0
Potassium Sulphate	10.0
Enzymatic Digest of Casein	10.0
Magnesium Chloride	1.4
Bacteriological Agar	13.0

Συστατικά εκλεκτικού μέσου CFC

(κάθε φιαλίδιο περιέχει ποσότητα mg/500 ml θρεπτικού)

Cetrimide	5.0
Fucidin	5.0
Cephaloridine	25.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 25.2 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκαν 500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 5 ml γλυκερόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθεί το θρεπτικό. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min. Το τελικό pH ήταν 7.1 ± 0.2 στους 25 °C. Στη συνέχεια το θρεπτικό αφέθηκε να κρυώσει σε υδατόλουτρο μέχρι τους 45 έως 50 °C και προστέθηκε ένα φιαλίδιο με εκλεκτικό υλικό CFC, αφού πρώτα διαλύθηκε σε 5 ml αποστειρωμένο νερό με 50 % αιθανόλη. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 8 έως 15 °C για μελλοντική χρήση.

3. Μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta*

Ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* είναι ένας από τους κυριότερους αλλοιωγόνους παράγοντες των τροφίμων που διατηρούνται κάτω από συνθήκες ψύξης. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός με εύρος ανάπτυξης 0 έως 30 °C και βέλτιστο σημείο τους 20 έως 25 °C. Ως προαιρετικό αναερόβιο, το *Brochothrix thermosphacta*, είναι ικανό να αναπτυχθεί και σε συσκευασίες τροποποιημένης

ατμόσφαιρας (MAP). Τα συστατικά παρέχουν τις απαραίτητες αζωτούχες ενώσεις, τις βιταμίνες και άλλα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, ενώ η στρεπτομυκίνη είναι ένας εκλεκτικός παράγοντας που αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών, πέραν των συγκεκριμένων.

Συστατικά: g/1000 ml

Peptic Digest of Animal Tissue	20.0
Yeast Extract	2.0
Dipotassium Hydrogen Phosphate	1.0
Magnesium Sulphate, Heptahydrate	1.0
Agar	13.0

Συστατικά εκλεκτικού μέσου STAA (Ref. 402079)

(κάθε φιαλίδιο περιέχει ποσότητα mg/500 ml θρεπτικού)

Streptomysin Sulphate	250 mg
Thallus Acetate	25 mg

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 17.3 g αφυδατωμένης σκόνης και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 500 ml απιονισμένου νερού μαζί με 7.5 g γλυκερόλη. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 °C προστέθηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, ένα φιαλίδιο με ενυδατωμένο εκλεκτικό μέσο STAA. Το τελικό pH ήταν 7.0 ± 0.1 . Στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

4. Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, LAB088). Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στη δράση των χολικών

αλάτων (biles) και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτηρίδια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ζελατίνη από ενζυματική πέψη παρέχει άζωτο (N), αμινοξέα και άνθρακα (C). Το εκχύλισμα ζύμης προσφέρει τις απαραίτητες βιταμίνες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες (H/C). Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο παρουσία δείκτη pH (Ουδέτερο κόκκινο, Neutral red).

Συστατικά: g/1000 ml

Yeast Extract	3.0
Peptone	7.0
Sodium Chloride	5.0
Bile Salts	1.50
Glucose	10.0
Neutral Red	0.03
Crystal Violet	0.002
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 38.5 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα (δεν χρειάζεται περαιτέρω αποστείρωση). Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 °C, στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH ήταν 7.4 ± 0.2.

5. Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα de Man - Rogosa - Sharpe agar (MRS, LAB093). Το οξικό νάτριο (C₂H₃NaO₂) καθώς και το βασικό pH καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ενζυματική πέψη ζωικού ιστού καθώς και το εκχύλισμα βοδινού και ζύμης είναι οι πηγές άνθρακα (C), αζώτου (N) και βιταμινών. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμούμενος

υδατάνθρακας (H/C). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) είναι ανασταλτικός παράγοντας, ενώ μαζί με το κιτρικό αμμώνιο ($C_6H_{17}N_3O_7$) δρουν ως εκλεκτικοί παράγοντες. Το φωσφορικό κάλιο (K_3PO_4) δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας, ενώ το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το θειικό μαγγάνιο ($MnSO_4$) παρέχουν θετικά ιόντα για τον μεταβολισμό. Το πολυσορβικό (Polysorbate, Tween [®] 80) είναι επιφανειοδραστικό, διευκολύνοντας την πρόσληψη των θρεπτικών από τους μικροοργανισμούς. Το άγαρ χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής.

Συστατικά: g/1000 ml

Mixed Peptones	10.0
Yeast Extract	5.0
Beef Extract	10.0
Glucose	20.0
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Triammonium Citrate	2.0
Magnesium Sulphate	0.2
Manganese sulphate	0.05
Tween [®] 80	1.08
Agar	15.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 70.0 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό θερμάνθηκε μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και έπειτα αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 °C, ρυθμίστηκε το pH στα 6.4 ± 0.2 και στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

6. Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H_2S) (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*)

Το Iron Agar (LAB53) χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H_2S). Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη, καθώς και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και βιταμίνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), τη δεξτρόζη, τη λακτόζη και την σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_2$) ανάγεται προς υδρόθειο (H_2S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου (Fe) και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες.

Συστατικά: g/1000 ml

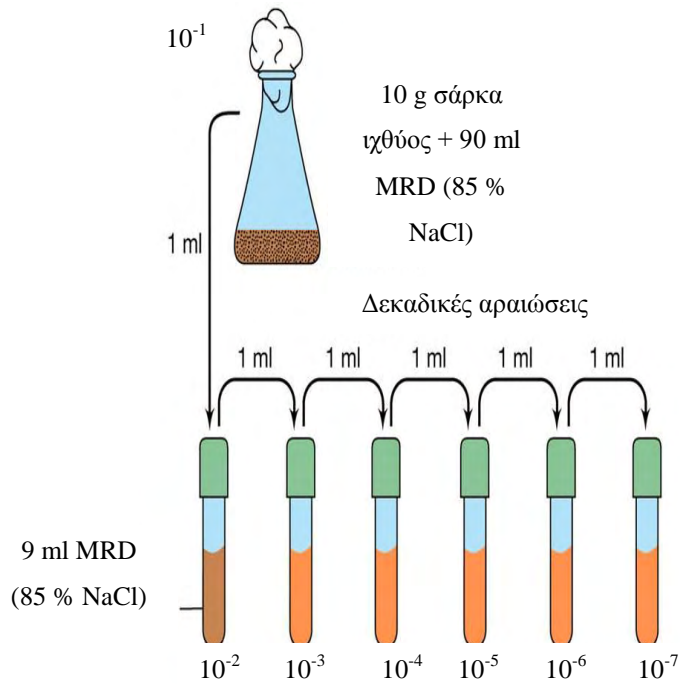
Beef Extract	3.0
Yeast Extract	3.0
Balanced Peptone N° 1	20.0
Sodium Chloride	5.0
Lactose	10.0
Ferric citrate	0.3
Sucrose	10.0
Glucose	1.0
Sodium Thiosulphate	0.3
Phenol Red	0.025
Agar N° 2	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 65.0 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 °C, μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

Γ. Προετοιμασία δειγμάτων για καταμέτρηση μικροβιακής χλωρίδας - Παρασκευή αραιώσεων

Λήφθησαν ασηπτικά, ανά 2 ημέρες, 10 g σάρκας ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού εις διπλούν ($n = 2$) και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher. Στη συνέχεια προστέθηκαν 90 ml αραιωτικού διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v peptone) και η σακούλα οδηγήθηκε σε συσκευή ομογενοποίησης (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK), όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων (**Εικόνα 2.3.Γ**) με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.



Εικόνα 2.3.Γ. Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2007).

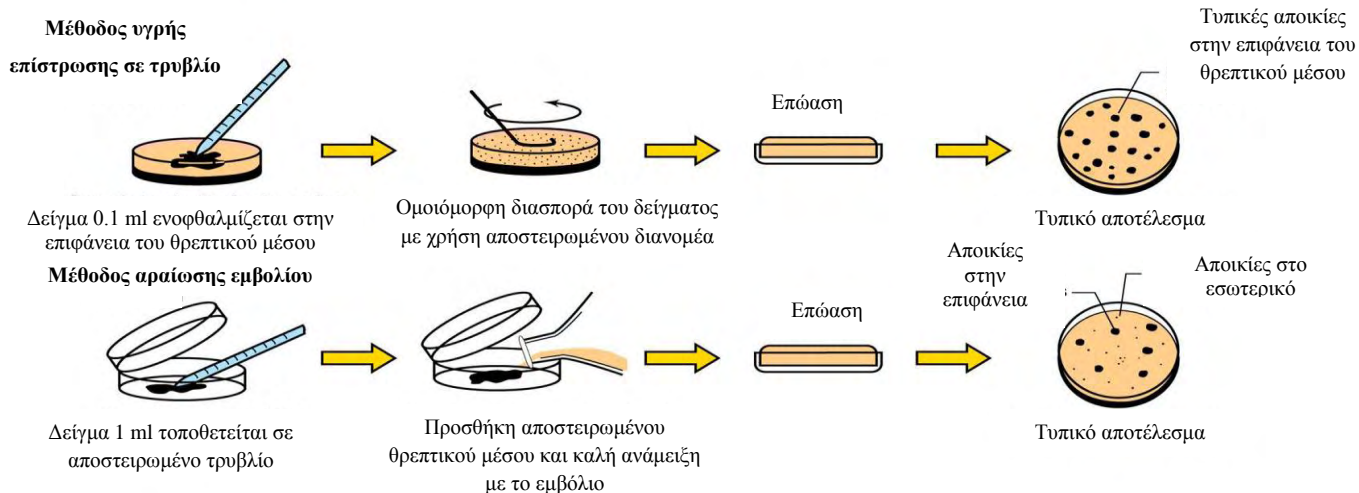
Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος από κάθε αραιώση σε θρεπτικό υπόστρωμα με 2 τεχνικές, αυτή της επίστρωσης και αυτή της ενσωμάτωσης.

Στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) για τα θρεπτικά υλικά TSA, STAA, CFC. Η τεχνική αυτή αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0.1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια ειδικού διανομέα. Εφαρμόζεται, γενικά, στους αερόβιους μικροοργανισμούς.

Στην δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique) για τα θρεπτικά υλικά Iron Agar, VRBGA, MRS. Αρχικά γίνεται ενοφθαλμισμός γνωστού όγκου (1 ml) από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος σε τρυβλίο και στην συνέχεια γίνεται μετάγγιση τηγμένου θρεπτικού υλικού, θερμοκρασίας 45 °C περίπου. Στη συνέχεια, και αφού το θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay). Εφαρμόζεται, γενικά, στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς (**Εικόνα 2.3.Δ**).

Δ. Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν: α) Ολικός Μεσόφιλος Πληθυσμός σε TSA, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 έως 72 h, β) βακτήρια που παράγουν H₂S σε IA, με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 έως 72 h, γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA, με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο μετά από επώαση στους 37 °C για 24 h, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar, με καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους 25 °C για 48 h, ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC, με καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους 25 °C για 48 h και ζ) *Brochothrix thermosphacta* σε STA Agar, με καταμέτρηση των αποικιών κίτρινου χρώματος μετά από επώαση στους 25 °C για 48 έως 72 h (**Εικόνα 2.3.Δ**).



Εικόνα 2.3.Δ. Μέθοδοι μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας βακτηρίων με καταμέτρηση αποικιών επί τρυβλίο (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2007).

2.4 Μέτρηση pH

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH της σάρκας των ιχθύων ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ως μέτρηση pH ορίστηκε η μέτρηση που λαμβάνονταν κατά την πρώτη αραιώση του ομογενοποιημένου δείγματος. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού πεχάμετρου, τύπου pH 730 inoLab WTW GmbH series (Weilheim, Germany), πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της πρώτης αραιώσης που χρησιμοποιούταν κάθε φορά για την επίστρωση ή ενσωμάτωση των τρυβλίων. Το πεχάμετρο καθαριζόταν κάθε φορά, πριν και μετά την χρήση του, με απιονισμένο νερό, για να αποφευχθεί η μεταφορά δείγματος που θα επηρέαζε το pH των υπόλοιπων δειγμάτων.

2.5 Χημική αξιολόγηση

2.5.1 Προσδιορισμός Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N)

Ο προσδιορισμός του TVB-N πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Vyncke *et al.*, (1987), Antonacopoulos and Vyncke, (1989), με βάση την Απόφαση της Επιτροπής

της 8^{ης} Μαρτίου 1995 (95/149/EK) για τον καθορισμό των οριακών τιμών του TVB-N για ορισμένες κατηγορίες προϊόντων αλιείας και των μεθόδων που πρέπει να χρησιμοποιούνται, με βάση τον ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ (ΕΚ) αριθ. 2074/2005 της επιτροπής της 5^{ης} Δεκεμβρίου 2005 για θέσπιση μέτρων εφαρμογής για ορισμένα προϊόντα βάσει του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και για την οργάνωση επίσημων ελέγχων βάσει των κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 854/2004 και (ΕΚ) αριθ. 882/2004, για την παρέκκλιση από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 852/2004 και για τροποποίηση των κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και (ΕΚ) αριθ. 854/2004, καθώς επίσης και με βάση τον ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ (ΕΚ) αριθ. 1022/2008 της επιτροπής της 17^{ης} Οκτωβρίου 2008 για τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2074/2005 όσον αφορά τα όρια ολικού πτητικού βασικού αζώτου (TVB-N).

A. Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

- Ομογενοποιητής τύπου Stomacher (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK)
- Συσκευή απόσταξης μεθ' υδρατμών Kjeldahl (Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf, Germany)

B. Αντιδραστήρια

- Διάλυμα υπερχλωρικού (PA, HClO₄) ή τριχλωροοξικού (TCA, C₂HCl₃O₂) οξέος 6 %
- Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου NaOH 20 %
- Διάλυμα βορικού οξέος H₂BO₃ 3 %
- Πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος HCl 0.01 N για την τιτλοδότηση
- Μεικτός δείκτης Tashiro (2 g ερυθρό μεθυλίου και 1 g κυανό μεθυλενίου διαλυμένα σε 1000 ml αιθανόλης 95 %).

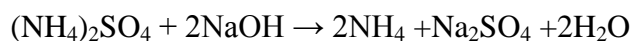
Ποσότητα 10 g σάρκας ιχθύος ομογενοποιήθηκε σε συσκευή Stomacher με 90 ml διαλύματος HClO₄ 6 % για 2 min, ακολούθησε διήθηση μέσω ηθμού Whatman N^ο 1 σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και το διήθημα οδηγήθηκε σε συσκευή απόσταξης μεθ' υδρατμών (Kjeldahl).

Έπειτα ποσότητα 50 ml διηθήματος τοποθετήθηκε σε αποστακτική φιάλη μαζί με 6 ml NaOH 20 % και οδηγήθηκαν στην συσκευή ενώ παράλληλα ο σωλήνας απαγωγής του αποστάγματος καταδύθηκε σε δείκτη που περιείχε 50 ml H₂BO₃ 3 % και 4 έως 5 σταγόνες μεικτού δείκτη Tashiro. Η απόσταξη ολοκληρώθηκε σε 10 min.

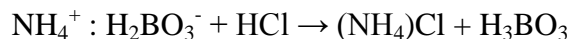
Το απόσταγμα τιτλοδοτήθηκε με πρότυπο διάλυμα HCl 0.01 N έως ότου εμφανιστεί το αρχικό χρώμα. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του “τυφλού” δείγματος στο οποίο το εκχύλισμα αντικαταστάθηκε από 10 ml HClO₄ 6 %. Η συγκέντρωση εκφράζεται σε mg N/100 ml.

(Η μέθοδος είναι σωστή αν η διαφορά των δύο αναλύσεων δεν ξεπερνά τα 2 mg N/100 ml)

ΑΠΟΣΤΑΞΗ



ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ



Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της ποσότητας του

$$\text{TVB-N είναι ο εξής: } \text{TVB-N (mg N/100 g)} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot 0.14 \cdot 2 \cdot 100}{M}$$

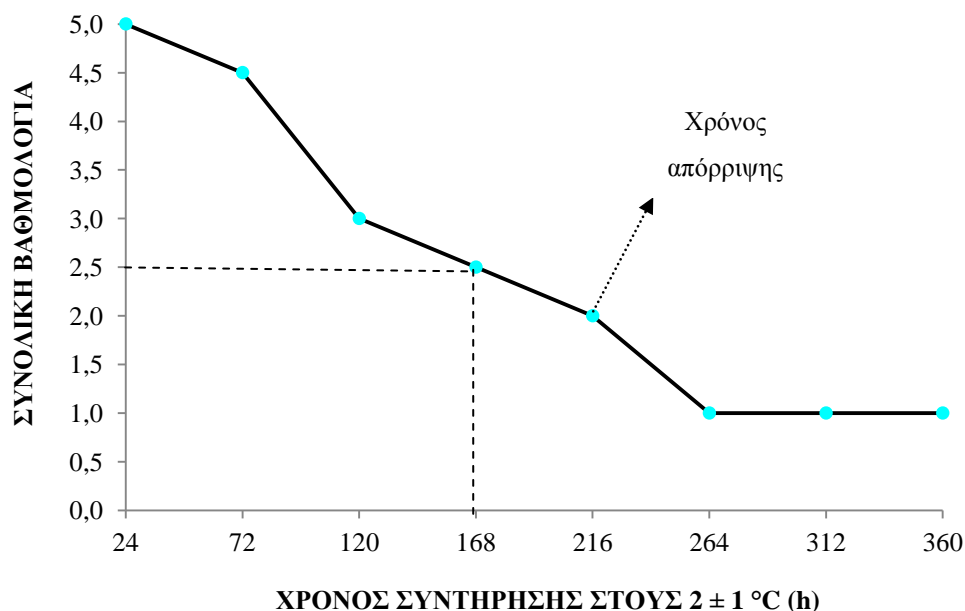
όπου, V₁ = όγκος 0.01 N διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ml για το δείγμα, V₀ = όγκος 0.01 N διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ml για την “τυφλή” δοκιμή και M = βάρος δείγματος σε g.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Οργανοληπτική ανάλυση

A. Απεντερωμένοι ιχθύες τσιπούρας

Μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση, οι απεντερωμένοι ιχθύες τσιπούρας που είχαν αποθηκευθεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), την ημέρα 1 (24 h) αξιολογήθηκαν ως “Άριστα” (E). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης άρχισε να λαμβάνει χώρα υποβάθμιση, με αποτέλεσμα τις ημέρες 3 (120 h) και 5 (72 h) η κατάσταση των ιχθύων να χαρακτηρίζεται ως “Πολύ καλή” (A) και “Υποβαθμισμένη αλλά αποδεκτή” (B), αντίστοιχα. Τις ημέρες 7 (168 h) και 9 (216 h) οι ιχθύες χαρακτηρίστηκαν ως “Υποβαθμισμένοι αλλά αποδεκτοί” (B) → “Υποβαθμισμένοι αλλά μη αποδεκτοί” (C) και “Υποβαθμισμένοι αλλά μη αποδεκτοί” (C), αντίστοιχα. Τις ημέρες 11 (264 h), 13 (312 h) και 15 (360 h), οι ιχθύες χαρακτηρίστηκαν ως πλήρως αλλοιωμένοι (Σχήμα 3.1.1).



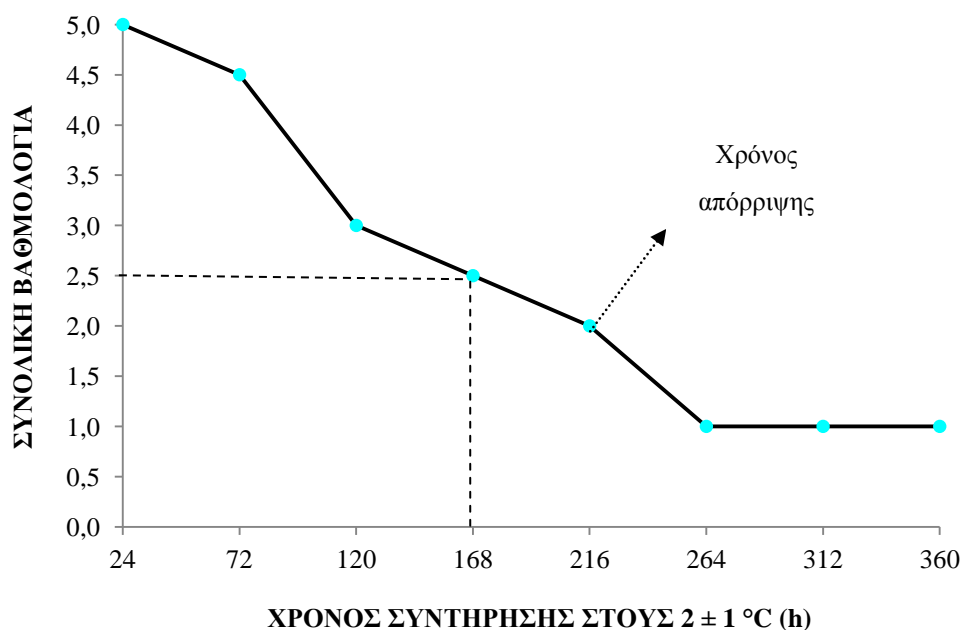
Σχήμα 3.1.1. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

(Με οριζόντια και κάθετη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων)

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω, ο χρόνος της οργανοληπτικής απόρριψης των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας ήταν οι 9 ημέρες (216 h), ενώ ο εμπορικός χρόνος ζωής προσδιορίστηκε στις 7 ημέρες (168 h).

B. Απεντερωμένοι ιχθύες λαβρακιού

Μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση, οι απεντερωμένοι ιχθύες λαβρακιού που είχαν αποθηκευθεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), την ημέρα 1 (24 h) αξιολογήθηκαν ως “Άριστα” (E). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης άρχισε να λαμβάνει χώρα υποβάθμιση, με αποτέλεσμα τις ημέρες 3 (120 h) και 5 (72 h) η κατάσταση των ιχθύων να χαρακτηρίζεται ως “Άριστη” (E) → “Πολύ καλή” (A) και “Πολύ καλή” (A) → “Υποβαθμισμένη αλλά αποδεκτή” (B), αντίστοιχα. Τις ημέρες 7 (168 h) και 9 (216 h) οι ιχθύες χαρακτηρίστηκαν ως “Υποβαθμισμένοι αλλά αποδεκτοί” (B) → “Υποβαθμισμένοι αλλά μη αποδεκτοί (C) και “Υποβαθμισμένοι αλλά μη αποδεκτοί” (C) αντίστοιχα, ενώ τις υπόλοιπες ημέρες χαρακτηρίστηκαν ως πλήρως αλλοιωμένοι (Σχήμα 3.1.2).

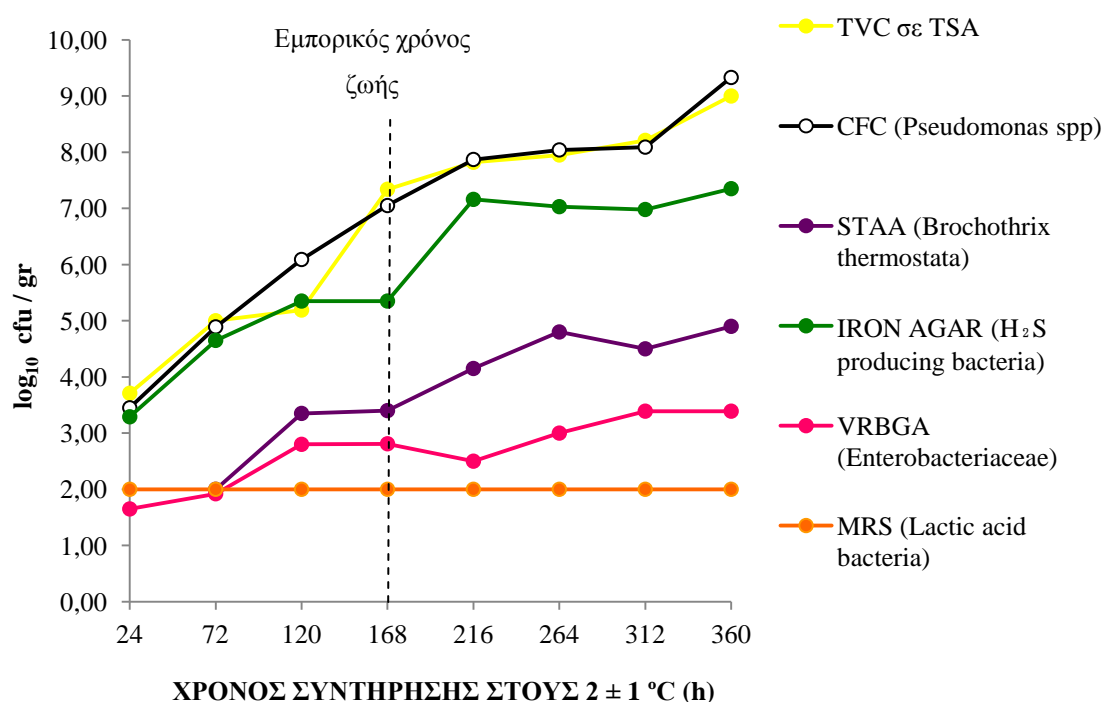


Σχήμα 3.1.2. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των απεντερωμένων ιχθύων λαβρακιού κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C). (Με οριζόντια και κάθετη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων)

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, ο χρόνος της οργανοληπτικής απόρριψης των απεντερωμένων ιχθύων λαβρακιού ήταν οι 9 ημέρες (216 h), ενώ ο εμπορικός χρόνος ζωής προσδιορίστηκε στις 7 ημέρες (168 h).

3.2 Μικροβιολογική αξιολόγηση

A. Απεντερωμένοι ιχθύες τσιπούρας



Σχήμα 3.2.1. Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX [●] αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών [*Pseudomonas* spp. [○], βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S) [●], *Brochothrix thermosphacta* [●], Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) [●], Enterobacteriaceae [●]] σε απεντερωμένους ιχθύες τσιπούρας (φυσική μικροβιακή σύνθεση) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

(Με κάθετη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων)

Οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών [*Pseudomonas* spp., υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια, *Brochothrix thermostata*, Enterobacteriaceae και οξυγαλακτικά βακτήρια] των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3.2.1.**

Κατά τη συντήρηση των ιχθύων και στο πέρας του εμπορικού χρόνου, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, με πληθυσμούς $3.29 \log_{10}$ cfu/g (ημέρα 1, 24 h), $7.05 \log_{10}$ cfu/g την ημέρα που προσδιορίστηκε ως εμπορικός χρόνος ζωής (ημέρα 7, 168 h), $7.87 \log_{10}$ cfu/g στο χρόνο απόρριψης των ιχθύων και $9.33 \log_{10}$ cfu/g στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 15, 360 h).

Ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. ακολουθήθηκε από τον πληθυσμό των υδροθειούχων (H_2S) βακτηρίων, με $3.29 \log_{10}$ cfu/g στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 1, 24 h), $5.35 \log_{10}$ cfu/g στον εμπορικό χρόνο ζωής (ημέρα 7, 168 h), $7.16 \log_{10}$ cfu/g την ημέρα απόρριψης (ημέρα 9, 216 h) των ιχθύων και $7.35 \log_{10}$ cfu/g στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

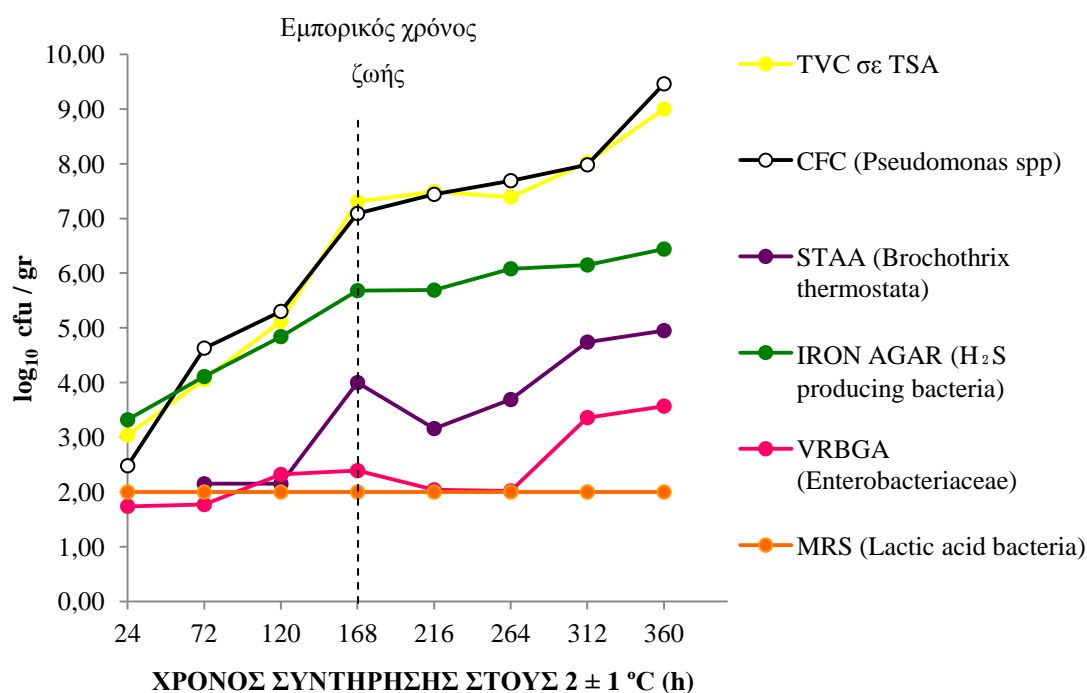
Τα *Brochothrix thermosphacta* στην έναρξη του πειράματος δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου, την ημέρα 3 (120 h) βρίσκονταν στο όριο ανίχνευσης ($2.00 \log_{10}$ cfu/g), ενώ στον εμπορικό χρόνο ζωής, καθώς και στον χρόνο απόρριψης των ιχθύων, βρίσκονταν στους 3.40 και $4.15 \log_{10}$ cfu/g αντίστοιχα, ενώ στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας καταγράφηκε η μέγιστη τιμή ($4.90 \log_{10}$ cfu/g).

Τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμό κάτω του ορίου ανίχνευσης (1.65 και $1.92 \log_{10}$ cfu/g) τις ημέρες 1 (24 h) και 3 (120 h) αντίστοιχα, ενώ στον εμπορικό χρόνο ζωής έφτασαν τους $2.81 \log_{10}$ cfu/g, χωρίς να ξεπεράσουν τους $3.99 \log_{10}$ cfu/g στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας.

Η OMX, στην αρχή του πειράματος ήταν στους $3.45 \log_{10}$ cfu/g, έφτασε τους $7.34 \log_{10}$ cfu/g στον εμπορικό χρόνο ζωής, ενώ στο πέρας του πειράματος άγγιξε τους $9.00 \log_{10}$ cfu/g.

Τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, δεν ξεπέρασαν το όριο ανίχνευσης των $2.00 \log_{10}$ cfu/g.

B. Απεντερωμένοι ιχθύες λαβρακιού



Γράφημα 3.2.2. Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX [●] αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών [*Pseudomonas* spp. [○], βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H_2S) [●], *Brochothrix thermosphacta* [●], Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) [●], Enterobacteriaceae [●]] σε απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού (φυσική μικροβιακή σύνθεση) κατά τη διάρκειά της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

(Με κάθετη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων)

Οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών [*Pseudomonas* spp., υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια, *Brochothrix thermostata*, Enterobacteriaceae και οξυγαλακτικά βακτήρια], των απεντερωμένων ιχθύων λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.2.2.

Κατά τη συντήρηση των ιχθύων και στο πέρας του εμπορικού χρόνου, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, με πληθυσμούς $2.48 \log_{10}$ cfu/g (ημέρα 1, 24 h), $7.09 \log_{10}$ cfu/g την ημέρα που προσδιορίστηκε ως εμπορικός χρόνος ζωής (ημέρα 7, 168 h), $7.44 \log_{10}$ cfu/g στο χρόνο απόρριψης των ιχθύων και $9.46 \log_{10}$ cfu/g στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 15, 360 h).

Ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. ακολουθήθηκε από τον πληθυσμό των υδροθειούχων (H₂S) βακτηρίων, με 3.32 log₁₀ cfu/g στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 1, 24 h), 5.68 log₁₀ cfu/g στον εμπορικό χρόνο ζωής (ημέρα 7, 168 h), 5.69 log₁₀ cfu/g στον χρόνο απόρριψης των ιχθύων και 6.44 log₁₀ cfu/g στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας.

Τα *Brochothrix thermosphacta* στην έναρξη του πειράματος δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου, την ημέρα 3 (120 h) βρίσκονταν στους 2.25 log₁₀ cfu/g, ενώ στον εμπορικό χρόνο ζωής, καθώς και στον χρόνο απόρριψης των προϊόντων, βρίσκονταν στους 4.00 και 3.16 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα, ενώ στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας καταγράφηκε η μέγιστη τιμή (4.95 log₁₀ cfu/g).

Τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμό κάτω του ορίου ανίχνευσης (1.74 και 1.77 log₁₀ cfu/g) τις ημέρες 1 (24 h) και 3 (120 h) αντίστοιχα, ενώ στον εμπορικό χρόνο ζωής έφτασαν τους 2.39 log₁₀ cfu/g, με τον πληθυσμό να μην ξεπερνάει τους 3.57 log₁₀ cfu/g, στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας.

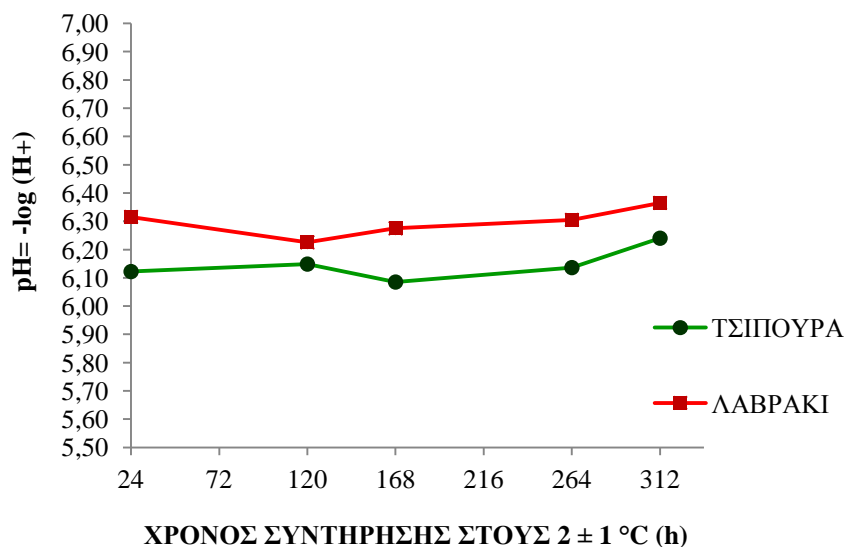
Η OMX, στην αρχή του πειράματος ήταν στους 3.04 log₁₀ cfu/g, έφτασε τους 7.31 log₁₀ cfu/g στον εμπορικό χρόνο ζωής, ενώ στο πέρας του πειράματος άγγιξε τους 9.00 log₁₀ cfu/g.

Τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, δεν ξεπέρασαν το όριο ανίχνευσης των 2.00 log₁₀ cfu/g.

Συμπερασματικά, όπως φαίνεται στα **Σχήματα 3.2.1** και **3.2.2**, οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί, που πιθανόν να είναι οι EAM, για την τσιπούρα και το λαβράκι και οφείλονται για την αλλοίωσή τους κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*).

3.3 Ανάλυση pH

Η διακύμανση των τιμών του pH της μεταθανάτιας σάρκας (post mortem) των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού που κατεγράφησαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.3.1**.



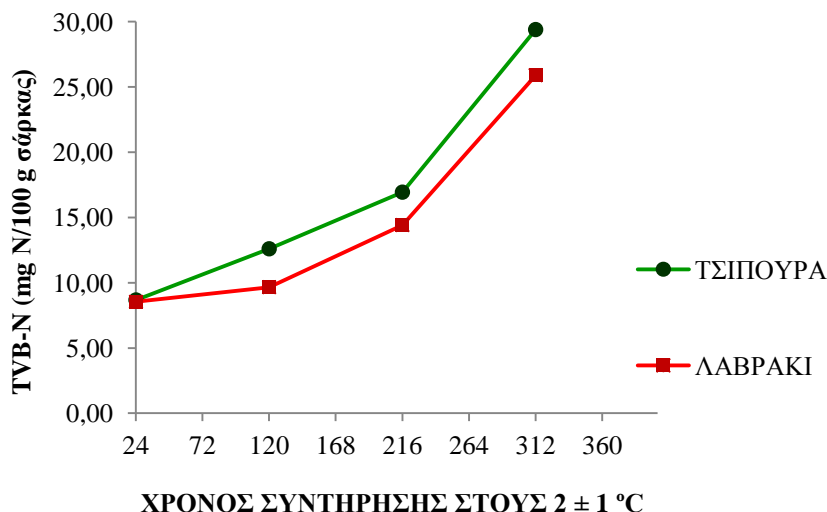
Σχήμα 3.3.1. Διακύμανση του pH της μεταθανάτιας σάρκας των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας (●) και λαβρακιού (■) κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

Σύμφωνα με το **Σχήμα 3.3.1**, οι τιμές του pH της μεταθανάτιας σάρκας των απεντερωμένων ιχθύων που καταγράφηκαν δεν παρουσίασαν ουσιαστική μεταβολή κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι τιμές, στην έναρξη του πειράματος, ήταν 6.12 και 6.32 για τη σάρκα της τσιπούρας και του λαβρακιού αντίστοιχα. Την ημέρα που προσδιορίστηκε ο εμπορικός χρόνος ζωής (ημέρα 7, 168 h) οι τιμές ήταν 6.09 και 6.28 αντίστοιχα, ενώ στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας οι τιμές που κατεγράφησαν ήταν 6.24 και 6.37 για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα. Με βάση το παραπάνω σχήμα, φαίνεται πως οι τιμές pH της μεταθανάτιας σάρκας του απεντερωμένου λαβρακιού είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες της τσιπούρας, με μέσο όρο 6.30 αντί 6.15, αντίστοιχα.

3.4 Χημική ανάλυση

3.4.1 Ανάλυση Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N)

Η ποσότητα του TVB-N (mg N/100 g) της σάρκας των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.4.1.1**.



Σχήμα 3.4.1.1. Διακύμανση του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N) των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας (●) και λαβρακιού (■) κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

Η ποσότητα του TVB-N της σάρκας των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας, ήταν 8.86 και 8.54 mg N/100 g, ενώ στον χρόνο απόρριψης (ημέρα 9, 216 h) η ποσότητα αυτή αυξήθηκε και έφτασε τα 16.94 και 14.42 mg N/100 g. Τέλος, την ημέρα 13 (312 h), η ποσότητα αυτή έφτασε τα 29.40 και 25.90 mg N/100 g, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ 2074/2005/ΕΚ, η επιτρεπόμενη ποσότητα του TVB-N δεν πρέπει να ξεπερνά τα 30 έως 35 mg N/100 g σάρκας ιχθύος. Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές του TVB-N κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, ενώ στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής οι τιμές αυξήθηκαν αρκετά, όχι όμως τόσο ώστε να ξεπεράσουν το νομοθετικό όριο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αλλοίωση ιχθύων και θαλασσινών προσδιορίζεται από τις οργανοληπτικές αλλαγές (οσμή, χρώμα, υφή, κτλ) που συμβαίνουν στη σάρκα τους (Gram and Huss, 1996), τη μικροβιακή αλλοίωση, τις αυτολυτικές διαδικασίες και τη χημική οξείδωση (Ashie *et al.*, 1996).

Μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων αυτών προσδιορίστηκε στις 7 ημέρες (168 h), ενώ ο χρόνος απόρριψης στις 9 ημέρες (216 h). Πράγματι, οι Gram *et al.*, (1987) αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής απεντερωμένων, φιλέτων αλλά και ολόκληρων ιχθύων γάδου (*Gadus morhua*) αποθηκευμένων στους 0 και στους 20 °C ήταν 9 έως 10 ημέρες για τους απεντερωμένους ιχθύες και τα φιλέτα αυτών και 1 ημέρα για τους ολόκληρους ιχθύες, ενώ οι Kyrana *et al.*, (1997) αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (melting ice, 0 °C), ήταν 17 ημέρες, όπου τα προϊόντα βαθμολογήθηκαν με B → C. Επίσης, σύμφωνα με τους Alasalvar *et al.*, (2001), το όριο αποδοχής των ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (0 °C), ήταν 17 έως 18 ημέρες, ενώ οι Kyrana and Lougonois, (2002) προσδιόρισαν τον χρόνο απόρριψης για ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (0 °C), στις 15 ημέρες. Ακόμη, μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση που πραγματοποίησαν οι Taliadourou *et al.*, (2003), κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι ολόκληροι ιχθύες λαβρακιού, αποθηκευμένοι υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (0 °C), είχαν διάρκεια ζωής 12 έως 13 ημέρες, ενώ τα φιλέτα του ίδιου ιχθύος κάτω από τις ίδιες συνθήκες συντήρησης, διάρκεια ζωής 8 έως 9 ημέρες. Επιπρόσθετα, οι Papadopoulos *et al.*, (2003), μετά από οργανοληπτική αξιολόγηση ολόκληρων αλλά και απεντερωμένων ιχθύων λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό συνθήκες πάγου (0 °C), αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής ήταν 13 και 8 ημέρες, αντίστοιχα, ενώ οι Paleologos *et al.*, (2004) προσδιόρισαν το χρόνο ζωής για ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού, απεντερωμένους αλλά και φιλέτα αυτών, αποθηκευμένα στους 0 °C, στις 8 έως 9 ημέρες για τους απεντερωμένους ιχθύες και τα φιλέτα, ενώ για τους ολόκληρους 15 έως 16 ημέρες. Επίσης, η διάρκεια ζωής άγριου καλκανιού (*Scophthalmus maximus*) που αλιεύτηκε στη Μαύρη θάλασσα και αποθηκεύτηκε υπό συνθήκες πάγου (0 °C), ήταν 12 έως 15 ημέρες (Özogul *et al.*, 2006). Ακόμη, οι Cakli *et al.*, (2006), μετά από μελέτη που

πραγματοποίησαν σε απεντερωμένους ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού, αποθηκευμένους στους 0 °C, αναφέρουν πως οι ιχθύες χαρακτηρίστηκαν ως अपαράδεκτοι την ημέρα 12, ενώ την ημέρα 9 χαρακτηρίστηκαν με σχετική φρεσκάδα, ενώ οι Caklı *et al.*, (2007) αναφέρουν πως ο χρόνος ζωής των ίδιων ιχθύων, κάτω από τις ίδιες συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας ήταν 15 ημέρες. Ακόμα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε απεντερωμένους ιχθύες κουτσομούρας (*Mullus barbatus*) και ενός είδους μπαρμπουνιού (goldband goatfish, *Upeneus moluccensis*), υπό συνθήκες πάγου (0 °C), προσδιόρισαν το χρόνο ζωής στις 8 ημέρες για το μπαρμπούνη και στις 11 ημέρες για την κουτσομούρα (Özyurt *et al.*, 2009). Οι Erkan and Özden, (2008) αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής ολόκληρων, αλλά και απεντερωμένων ιχθύων σαρδέλας, που αλιεύτηκαν στη θάλασσα του Μαρμαρά και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C, ήταν 7 ημέρες. Τέλος, οι Parlapani *et al.*, (2013) αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής ολόκληρων, μη απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας αποθηκευμένων στους 0 °C, ήταν 16 ημέρες.

Επίσης, η αλλοίωση των ιχθύων που προέρχονται από εύκρατα ύδατα και αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες προκαλείται, κυρίως, από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως από υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*) (Gram and Huss, 1996).

Στην παρούσα μελέτη, οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί που οφείλονται για την αλλοίωση των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Πιο συγκεκριμένα, οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των προαναφερθέντων ιχθύων ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. με δεύτερα επικρατέστερα τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), με πληθυσμούς, την ημέρα απόρριψης (ημέρα 9, 216 h) των ιχθύων, 7.87, 5.35 log₁₀ cfu/g για την τσιπούρα και 7.47, 5.69 log₁₀ cfu/g για το λαβράκι, αντίστοιχα, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης (ημέρα 15, 360 h) έφτασαν τους 9.33, 7.35 log₁₀ cfu/g για την τσιπούρα και 9.46, 6.44 log₁₀ cfu/g για το λαβράκι, αντίστοιχα.

Έτσι, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. έχουν χαρακτηριστεί ως οι ΕΑΜ των ιχθύων που προέρχονται από εύκρατα και τροπικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gram *et al.*, 1990; Papadopoulos *et al.*, 2003; Taliadourou *et al.*, 2003; Chytiri *et al.*, 2004; Paleologos *et al.*, 2004; Parlapani

et al., 2013; Parlapani *et al.*, 2014), ενώ τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια αποτελούν τους EAM σε ιχθύες που προέρχονται από Βόρειες θάλασσες, όπως ο γάδος και συντηρούνται στους 0 °C (Gram *et al.*, 1987; Jørgensen and Huss, 1998). Συγκεκριμένα, τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς και κατ' επέκταση τους EAM σε ιχθύες, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι (Papadopoulos *et al.*, 2003; Taliadourou *et al.*, 2003; Paleologos *et al.*, 2004; Tryfinopoulou *et al.*, 2007). Επιπλέον, οι ουσίες που δίνουν τις χαρακτηριστικές οσμές στην τσιπούρα που αποθηκεύεται υπό αερόβιες συνθήκες είναι αμμωνιακής φύσης, κυρίως προϊόντα μεταβολισμού των *Pseudomonas* spp. (Dainty 1996).

Ενώ, όμως, τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια αποτελούν τους EAM στους ιχθύες που προέρχονται από Βόρειες θάλασσες και συντηρούνται στους 0 °C (Gram *et al.*, 1987; Jørgensen and Huss, 1998), αποτελούν τους δεύτερους επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στα αλιεύματα που προέρχονται από τη Μεσόγειο (Papadopoulos *et al.*, 2003; Taliadourou *et al.*, 2003; Paleologos *et al.*, 2004; Tryfinopoulou *et al.*, 2007), ενώ αποτελούνται κυρίως από *Shewanella* spp. και στις δυο περιπτώσεις (Gram *et al.*, 1987; Jørgensen and Huss, 1998; Dalgaard *et al.*, 1993; Tryfinopoulou *et al.*, 2007; Parlapani *et al.*, 2014). Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, ο πληθυσμός των υδροθειούχων (H₂S) βακτηρίων (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*) ήταν χαμηλότερος από τον αντίστοιχο των *Pseudomonas* spp., με τον πληθυσμό να φτάνει τους 7.35 και 6.44 log₁₀ cfu/g για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα, στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 15, 360 h). Οι χαμηλές τιμές έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, για παράδειγμα οι Taliadourou *et al.*, (2003) αναφέρουν πως ο πληθυσμός των συγκεκριμένων βακτηρίων άγγιξε τους 7.00 log₁₀ cfu/g την ημέρα 13 σε φιλέτα λαβρακιού αποθηκευμένα στους 0 °C, ενώ προτείνεται πως εμπλέκονται στην αλλοίωση ιχθύων λαβρακιού, χωρίς να έχουν ταυτοποιηθεί οι κύριοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (Kyra and Lougouois, 2002). Τέλος, το βακτήριο *Shewanella putrefaciens* θεωρείται ως δυναμικός αλλοιωγόνος μικροοργανισμός σε ψυχρά και εύκρατα ύδατα και ανήκει στα είδη εκείνα τα οποία παράγουν σουλφίδια. Όταν ο αριθμός του πληθυσμού τους υπερβαίνει τους 6.00 log₁₀ cfu/g, ποσότητες θείου (S) αρχίζουν να παράγονται και εν τέλει εμφανίζονται οι πρώτες ενδείξεις αλλοίωσης (Gram *et al.*, 1987).

Επίσης, τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta*, καθώς και τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae έχουν αναφερθεί πως αποτελούν μέρος του βακτηριακού

πληθυσμού αλλοίωσης των ιχθύων που προέρχονται από εύκρατα ύδατα (συμπεριλαμβανομένης και της Μεσογείου), αλλά οι πληθυσμοί τους καταγράφονται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα (Papadopoulos *et al.*, 2003; Paleologos *et al.*, 2004). Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, τα *Brochothrix thermosphacta*, την ημέρα 1 (24 h), δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου, ενώ δεν ξεπέρασαν τους 4.90 και 4.95 \log_{10} cfu/g για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα, κατά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, ενώ τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae έφτασαν μόλις τους 3.39 και 3.57 \log_{10} cfu/g στο ίδιο χρονικό διάστημα, επομένως, τα αποτελέσματα συμφωνούν και με άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε παρόμοιες συνθήκες αποθήκευσης (Taliadourou *et al.*, 2003; Paleologos *et al.*, 2004). Σύμφωνα με τον Huis in't Veld (1996), τα *Brochothrix thermosphacta* είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί σε συνθήκες κενού (Vacuum) και τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP), ενώ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 5 έως 10 °C, τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae κυριαρχούν των *Pseudomonas* spp., με την παρουσία τους σε υψηλά επίπεδα να υποδηλώνει πιθανή μόλυνση από κόπρανα ή ανεπαρκή επεξεργασία. Τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, στην παρούσα μελέτη, δεν ξεπέρασαν το όριο ανίχνευσης των 2.00 \log_{10} cfu/g, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα. Επιπλέον, αναπτύσσονται βραδέως σε αερόβιες συνθήκες ψύξης (Huis in't Veld, 1996), ενώ κυριαρχούν υπό συνθήκες κενού σε ιχθύες που έχουν υποστεί κάπνιση κατά το τέλος της περιόδου αποθήκευσης (Leroi *et al.*, 1998). Έτσι, η επικράτηση των μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση είναι στενά συνδεδεμένη με τις μεταβολές της θερμοκρασίας (Gram *et al.*, 1987).

Ακόμη, η αρχική OMX της παρούσας μελέτης για τους απεντερωμένους ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού που αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), την ημέρα 1 (24 h) ήταν 3.71 και 3.04 \log_{10} cfu/g αντίστοιχα, υποδηλώνοντας, σύμφωνα με τους Papadopoulos *et al.*, (2003), καλή ποιότητα σάρκας για τους νωπούς ιχθύες που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες. Η OMX υπερέβη τους 7.00 \log_{10} cfu/g μετά την ημέρα 7 (168 h), που είναι και το όριο αποδοχής για ιχθύες θαλασσινού και γλυκού νερού (Kyra and Lougonois, 2002; Taliadourou *et al.*, 2003), φτάνοντας τους 7.82 και 7.49 \log_{10} cfu/g, αντίστοιχα, την ημέρα 9 (216 h), ενώ οι Kyra and Lougonois, (2002) αναφέρουν πως η OMX ξεπέρασε τους 7.00 \log_{10} cfu/g μετά από 9 ημέρες, για απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους 0 °C. Επίσης, οι Paleologos *et al.*, (2004) αναφέρουν πως η OMX

υπερέβη τους $7.00 \log_{10}$ cfu/g μετά από 9 ημέρες για απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού που είχαν αποθηκευτεί στους 0°C , ενώ το ίδιο υποστηρίζουν και οι Cakli *et al.*, (2006), όσον αφορά απεντερωμένους ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού, ωστόσο, για ιχθύες όπως η κουτσομούρα, σε αντίστοιχες συνθήκες αποθήκευσης, η OMX υπερέβη το όριο αποδοχής μετά από 11 ημέρες (Özyurt *et al.*, 2009). Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα, η αρχική και τελική OMX των νωπών απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης, βρέθηκε να είναι παρόμοια με τις αναφορές της βιβλιογραφίας για ιχθύες που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες, ακόμη και σε MAP (Dalgaard *et al.*, 1993; Gram and Huss, 1996), ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί πως οι πληροφορίες είναι περιορισμένες, μέχρι σήμερα, σχετικά με τους βακτηριακούς πληθυσμούς των μεσογειακών ιχθύων που αποθηκεύονται υπό συνθήκες ψύξης (Kyraana and Lougonois, 2002). Όμως, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλιεύοντες ιχθύες έχουν διαφορετικούς βακτηριακούς πληθυσμούς και ως εκ τούτου, ενώ στο σημείο οργανοληπτικής απόρριψης, η OMX κυμαίνεται από 7 έως $9 \log_{10}$ cfu/g (Gram and Huss, 1996; Ólafsdóttir *et al.*, 2006). Επομένως, η OMX μπορεί να αποτελέσει ένα στοιχείο μικροβιολογικών κριτηρίων για την εκτίμηση της ποιότητας ενός προϊόντος (Montivelle and Matthews, 2010).

Επίσης, οι εποχικές αλλαγές, η περίοδος δειγματοληψίας και συνεπώς η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού, επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση αλλοίωσης. Ακόμα, η θερμοκρασία του νερού επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των ιχθύων. Οι μέση τιμή των υδάτων της Μεσογείου είναι 27°C το καλοκαίρι και 14°C το χειμώνα. Έτσι, οι βακτηριακοί πληθυσμοί το χειμώνα ανέρχονται στους $9 \log_{10}$ cfu/g, σε αντίθεση με το καλοκαίρι που αγγίζουν τους $7 \log_{10}$ cfu/g. Αυτό συμβαίνει διότι οι βακτηριακοί πληθυσμοί που απαντώνται στη σάρκα των ιχθύων υφίστανται εντατική θερμική καταπόνηση (shock) κατά την αποθήκευσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επομένως, αναμένεται να αναπτυχθούν σε μεγαλύτερους πληθυσμούς το χειμώνα, επειδή η φάση προσαρμογής (lag phase) είναι μικρότερη σε σχέση με το καλοκαίρι (Grigorakis *et al.*, 2003; Grigorakis *et al.*, 2004).

Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες διαθέσιμες σχετικά με την βακτηριακή χλωρίδα των μεσογειακών ιχθύων που αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύξης (Kyraana and Lougonois, 2002). Έτσι, αντίστοιχες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε χημικές και οργανοληπτικές δοκιμές, παρά σε μικροβιολογικές, που σχετίζονται με τους μεσογειακούς ιχθύες οι οποίοι αποθηκεύονται υπό ψύξη (Kyraana *et al.*, 1997; Simeonidou *et al.*, 1998; Alasalvar *et al.*, 2001).

Το Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N) έχει προταθεί ως χημικός δείκτης αλλοίωσης στους ιχθύες (Ólafsdóttir *et al.*, 1997) και αναμένεται να σχετίζεται με διάφορες οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως η γεύση, ενώ θεωρείται αξιόπιστος δείκτης (Antoine *et al.*, 2007). Η μέτρησή του περιλαμβάνει ουσίες, όπως η TMA-N, η DMA-N, η NH₃ αλλά και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις που παράγονται από την βακτηριακή αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων, ενώ είναι ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης μέσω του προσδιορισμού της μεταβολικής τους δραστηριότητας (Gram and Huss, 1996; Ólafsdóttir *et al.*, 1997). Στην παρούσα μελέτη, το TVB-N στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, κατέγραψε τιμές 8.68 και 8.54 mg N/100 g σάρκας ιχθύος για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα, την ημέρα απόρριψης των ιχθύων (ημέρα 9, 216 h) οι τιμές αυξήθηκαν στα 16.94 και 14.42 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, ενώ στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 13, 312 h) η ποσότητα αυτή έφτασε τα 29.40 και 25.90 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ 2074/2005/EK, η επιτρεπόμενη ποσότητα του TVB-N δεν πρέπει να ξεπερνά τα 30 έως 35 mg N/100 g σάρκας ιχθύος. Σε παρόμοιες μελέτες, οι τιμές του TVB-N δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση, καταγράφοντας τιμές μέχρι και 20.16 mg N/100 g σάρκας ιχθύος (ημέρα 18), για ολόκληρους ιχθύες ιριδίζουσας πέστροφας, αποθηκευμένων στους 0 °C (Chytiri *et al.*, 2004). Επίσης, το TVB-N που καταγράφηκε στη σάρκα των απεντερωμένων ιχθύων κουτσομούρας και ειδών μπαρμπουνιού, αποθηκευμένων στους 0 °C, είχε τιμές 12.23 και 19.49 mg N/100 g σάρκας ιχθύος για την κουτσομούρα και το μπαρμπούνη αντίστοιχα, ενώ στο πέρας της αποθήκευσης οι τιμές έφτασαν τα 47.19 και 43.97 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, αντίστοιχα (Özyurt *et al.*, 2009). Σε μια άλλη μελέτη, οι Papadopoulos *et al.*, (2003) αναφέρουν πως το TVB-N δεν παρουσίασε σημαντική αύξηση για τους ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού που είχαν αποθηκευτεί στους 0 °C, μέχρι την ημέρα 16, ενώ για τους απεντερωμένους ήταν μεταβλητό. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ημέρα 16, ο χημικός αυτός δείκτης κατέγραψε τιμές 25.7 έως 27.7 mg N/100 g σάρκας ιχθύος και 27.2 έως 36 mg N/100 g σάρκας ιχθύος για τους ολόκληρους αλλά και τους απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα της σάρκας των ιχθύων σε TVB-N, σύμφωνα με τους Gökodlu *et al.*, (1998), επηρεάζεται από το είδος του ιχθύος, τον τρόπο εξαλίευσης, την περιοχή αλίευσης, την εποχή, την ηλικία και το φύλο. Επίσης, οι Cakli *et al.*, (2006) αναφέρουν πως στην αρχή της περιόδου αποθήκευσης απαντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού στους 0 °C, το TVB-

N ήταν 15 ± 0.26 και 16.2 ± 0.28 mg N/100 g σάρκας ιχθύος για την τσιπούρα και το λαβράκι αντίστοιχα, ενώ στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης άγγιξε τα 37.5 ± 0.51 και 35.04 ± 0.9 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, αντίστοιχα, όμως για ολόκληρους ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού, κάτω από τις ίδιες συνθήκες αποθήκευσης, το TVB-N ήταν 17.11 ± 0.50 και 18.61 ± 0.88 mg N/100 g σάρκας ιχθύος στην έναρξη του πειράματος για την τσιπούρα και το λαβράκι, ενώ στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης κατέγραψε τιμές 39.89 ± 1.53 και 41.08 ± 1.35 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, αντίστοιχα (Cakli *et al.*, 2007). Επιπρόσθετα, οι Kyrana *et al.*, (1997) αναφέρουν πως για ολόκληρους ιχθύες τσιπούρας αποθηκευμένους στους 0 °C, το TVB-N στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας κυμαινόταν από 25.4 έως 26.6 mg N/100 g σάρκας ιχθύος (με μέσο όρο 26.0), ενώ μεταξύ των ημερών 10 έως 24 η τιμή αυτή άγγιξε τα 50 mg N/100 g σάρκας ιχθύος. Τέλος, οι Kyrana and Lougonois, (2002), μετά την ανάλυση ολόκληρων ιχθύων λαβρακιού που είχαν αποθηκευτεί υπό συνθήκες πάγου (0 °C), αναφέρουν πως την ημέρα 1 η τιμή του TVB-N ήταν 17.21 ± 0.42 mg N/100 g σάρκας ιχθύος και κατά την ημέρα 12 αυτή η τιμή έφτασε τα 30.58 ± 0.52 mg N/100 g σάρκας ιχθύος. Έτσι, η περιεκτικότητα της σάρκας των νωπών ιχθύων σε TVB-N, αρχικά κυμαίνεται από 5 έως 20 mg N/100 g, ενώ το νομοθετικό όριο (2074/2005/EK) αποδοχής ανέρχεται στα 30 έως 35 mg N/100 g σάρκας ιχθύος (Kyрана *et al.*, 1997; Cakli *et al.*, 2006).

Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. σχετίζονται με την παραγωγή TVB-N ως πρωτεολυτικά ψυχρότροφα που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες στα θαλασσινά, παράγοντας πτητικές ενώσεις αμμωνιακής φύσεως, που προκύπτουν από την απαμίνωση των αμινοξέων και άλλων πρωτεϊνικών ενώσεων (Dainty, 1996). Οι Özyurt *et al.*, (2009) υποστηρίζουν πως το TVB-N σχετίζεται θετικά με την αλλοίωση ιχθύων, όπως η κουτσομούρα και κάποια είδη μπαρμπουνιού και αποτελεί έναν καλό δείκτη ποιότητας, ενώ από τους Papadopoulos *et al.*, (2003) και Castro *et al.*, (2006) θεωρείται αναξιόπιστος δείκτης ποιότητας, διότι δεν παρατηρείται καμιά μεταβολή στις τιμές του πριν τον χρόνο απόρριψης για ιχθύες όπως το λαβράκι το οποίο έχει αποθηκευτεί σε συνθήκες πάγου (0 °C).

Επιπρόσθετα, το pH στην παρούσα μελέτη κατέγραψε τιμές 6.12 και 6.32 στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα, ενώ στο πέρας της περιόδου αποθήκευσης δεν αυξήθηκε ουσιαστικά, καταγράφοντας τιμές 6.24 και 6.37, για την τσιπούρα και το λαβράκι, αντίστοιχα. Σε μελέτη που

πραγματοποίησαν οι Cakli *et al.*, (2006) σε απεντερωμένους ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού αποθηκευμένους στους 0 °C, αναφέρουν πως οι τιμές του pH στην έναρξη του πειράματος ήταν 6.41 ± 0.01 και 6.50 ± 0.02 , αντίστοιχα, ενώ στο τέλος τους 14 ημερών οι τιμές έφτασαν τα 6.52 ± 0.02 και 6.57 ± 0.02 , αντίστοιχα. Επίσης, οι Kyrana *et al.*, (1997) αναφέρουν πως σε ολόκληρους ιχθύες τσιπούρας αποθηκευμένους σε συνθήκες πάγου (0 °C), η τιμή στην έναρξη του πειράματος ήταν 6.20 ± 0.05 και την ημέρα 24 η τιμή αυτή έφτασε τα 6.60 ± 0.03 , ενώ οι Kyrana and Lougonois, (2002) υποστηρίζουν πως το pH για ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού υπό πάγο, ήταν 6.39 ± 0.04 (ημέρα 1) και στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης (ημέρα 12) η τιμή αυτή έφτασε τα 6.69 ± 0.04 . Επομένως, σύμφωνα με τους Kyrana *et al.*, (1997), το χαμηλό pH της σάρκας των ιχθύων αντικατοπτρίζει καλή διατροφική κατάσταση κατά την αρχή της περιόδου αποθήκευσης. Έτσι, οι χαμηλές τιμές μετά την συγκομιδή υποδηλώνουν πως οι ιχθύες είχαν καταπονηθεί (υποστεί stress) κατά την διαδικασία της εξαλίευσης. Ακόμα, το τυπικό μεταθανάτιο pH είναι μικρότερο του 7.0, επειδή όμως κατά την αρχή της αποθήκευσης είναι χαμηλό, αυτό μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της διάρκειας ζωής των ιχθύων, ωστόσο κατά το πέρας της περιόδου αποθήκευσης αυτό αυξάνεται, αντανακλώντας την παραγωγή βακτηριακών αλκαλικών μεταβολιτών που συνεπάγεται και αύξηση των τιμών του TVB-N.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αλλά και η υπάρχουσα βιβλιογραφία καταδεικνύουν πως υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης, οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν στους ιχθύες είναι τα Gram⁻ ψυχρότροφα, μη ζυμωτικά ραβδόμορφα βακτήρια. Έτσι, ο βακτηριακός πληθυσμός των ιχθύων που αλιεύονται σε εύκρατα, υποτροπικά και τροπικά ύδατα αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από βακτήρια *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως από υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (Gram and Huss, 1996), ενώ η παρουσία των Gram⁺ βακτηρίων, όπως τα *Brochothrix thermosphacta* και τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae, είναι λιγότερο εμφανής - διακριτή (Papadopoulos *et al.*, 2003).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση, λοιπόν, (α) μικροβιακές απαριθμήσεις και (β) οργανοληπτική αξιολόγηση, ο εμπορικός χρόνος ζωής των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού που αποθηκεύθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C) είναι 7 ημέρες (168 h), ενώ ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης είναι 9 ημέρες (216 h). Η μικροβιακή αλλοίωση των ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, προερχόμενα από ελληνικά εύκρατα ύδατα, προκαλείται κυρίως από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως από υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Ως εκ τούτου, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. μπορούν να θεωρηθούν ως οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) των ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού που προέρχονται από εύκρατα μεσογειακά ύδατα και έχουν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης.

Επίσης, η παραγωγή του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N) στα πρώτα στάδια της αποθήκευσης είναι χαμηλή, ενώ αυξάνεται ουσιαστικά από τα μέσα της αποθήκευσης, χωρίς να φτάσει ποτέ συγκεντρώσεις υψηλότερες των 30 έως 35 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, που είναι και το Νομοθετικό όριο. Η χρήση του TVB-N στα αλιεύματα, ενώ αποτελεί έναν καλό δείκτη για την αποδοχή ή όχι των προϊόντων αυτών, ωστόσο δεν επαρκεί για να χαρακτηρίσει την νωπότητα των προϊόντων αυτών και να βοηθήσει στην αξιολόγησή της. Αυτό οφείλεται, κυρίως, στο γεγονός ότι οι τιμές του δεν μεταβάλλονται κατά το πρώτο ήμισυ του εμπορικού χρόνου ζωής, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο ως δείκτες αλλοίωσης - απόρριψης και όχι αξιολόγησης της νωπότητας για ιχθύες όπως η τσιπούρα και το λαβράκι.

Επιπρόσθετα, η ψύξη είναι ένα μέσο για τη διατήρηση των ιχθύων πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση, διότι τόσο οι ενζυμικές όσο και οι χημικές αντιδράσεις, καθώς και η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνονται. Επομένως, η αποθήκευση ιχθύων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης είναι ένα καλό μέσο συντήρησης και παράτασης της διάρκειας ζωής.

Τέλος, λόγω της επιθυμίας των καταναλωτών για νωπά υπό ψύξη προϊόντα με εκτεταμένη διάρκεια ζωής, πολυάριθμες μελέτες (συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας) έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό διαφορετικές στρατηγικές συντήρησης για να διατηρήσουν ή να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των νωπών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των αλιευτικών και να εξασφαλισθεί η ασφάλειά τους.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M. N., Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry* 72. 33-40.

Antoine, F. R., Wei, C. I., Otwell, C. A., Sims, R. C., Littell, R. C., Hogle, A. D., Marshall, M. R. (2002). TVB-N correlation with odor evaluation and aerobic plate count in Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Food Science*. Vol. 67. N° 9.

Antonakopoulos, N. and Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: a third collaborative study by the West European Fish Technologists Association (WEFTA). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 316. 189-309.

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

Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Vegiana-Nogués, T., Nunes, M. L., Vidal-Carou, M. C. (2003). Development of a Quality Index Method to evaluate freshness in Mediterranean Hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Science*. Vol. 68. N° 3.

Banja, B. A. M. (2002). Shelf-life trial on cod (*Gadus morhua* L.) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.) stored on ice around 0 °C. Fisheries Department Department of State for Presidential Affairs. Fisheries and Natural Resources. Gambia. Icelandic Fisheries Laboratories. Reykjavik. Iceland.

Béné, A., Hayman, A., Reynard, E., Luisier, J. L., Villettaz, J. C. (2001). A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method Part II. Determination of the freshness of fish. *Sensors and Actuators B* 72. 204-207.

Bilgin, Ş., Ünlüsayin, M., Izci, L., Günlü, A. (2008). The determination of the shelf-life and some nutritional components of gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) after cold and hot smoking. *Turk. J. Vet. Anim. Sci* 32 (1). 49-56.

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

- Boziaris, I., Kordila, A., Neofitou, C. (2011).** Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures. *International Journal of Food Science and Technology* 46. 887-895.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadum, A., Tolasa, S. (2007).** Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control* 18. 391-397.
- Cakli, S., Kilinc, B., Dincer, T., Tolasa, S. (2006).** Effect of uncutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 719-726.
- Castro, P., Padrón, J. C. P., Cansino, M. J. C., Velásquez, E. S., De Larriva, R. M. (2006).** Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* 17. 245-248.
- Chomnawang, C., Nantachai, K., Yongsawatdigul, J., Thawornchinsombut, S., Tungkawachara, S. (2007).** Chemical and biochemical changes of hybrid catfish fillet stored at 4 °C and its gel properties. *Food Chemistry* 103. 420-427.
- Chouliara, I., Savvaidis, I. N., Panagiotakis, N., Kontominas, M. G. (2004).** Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Microbiology* 21. 351-359.
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2004).** Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology* 21. 157-165.
- Dainty, R. H. (1996).** Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33. 19-33.
- 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.
- Devere, J. and Boskou, G. (1996).** Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology* 31. 221-229.
- Domingo, J. L. (2007).** Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold?. *Environment International* 33. 993-998.

- Drosinos, E. H., Lambropoulou, K., Mitre, E., Nychas, G. J. E. (1997).** Attributes of fresh gilthead seabream (*Sparus aurata*) fillets treated with potassium sorbate, sodium gluconate and stored under a modified atmosphere at 0 ± 1 °C. *Journal of Applied Microbiology* 83. 569-575.
- Edirisinghe, R. K. B., Graham, A. J., Taylor, S. J. (2007).** Characterization of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction and GC–MS and their relationship to fish quality parameters. *International Journal of Food Science and Technology* 42. 1139-1147.
- Erkan, N. (2007).** Sensory, chemical, and microbiological attributes of sea bream (*Sparus aurata*): Effect of washing and ice storage. *International Journal of Food Properties* 10: 421-434.
- Erkan, N. and Özden, Ö. (2008).** Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology* 43. 1549-1559.
- FAO, 2007.** Future prospects for fish and fishery products. 4. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030. Part 1. European overview, FAO Fisheries Circular No. 972/4, Part 1, Food and Aquaculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO, 2012.** The state of world fisheries and aquaculture 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Aquaculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Gill, C. O. (1996).** Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats. *Meat Science*. Vol. 43, No. S, S99-S109.
- Gökodlu, N., Özden, Ö., Erkan, N. (1998).** Physical, Chemical and sensory analyses of freshly harvested sardines (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. Vol. 7 (2).
- Gökoğlu, N., Cengiz, E., Yerlikaya, P. (2004).** Determination of the shelf-life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Food Control* 15. 1-4.
- Gram, L. and Dalgaard, P. (2002).** Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13. 262-266.
- Gram, L. and 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.

Gram, L., Wedell-Neergaard, C., Huss, H. H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology* 10. 303-316.

Grigorakis, K., Alexis, M., Gialamas, I., Nikolopoulou, D. (2004). Sensory, microbiological, and chemical spoilage of cultured common sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice: a seasonal differentiation. *Eur. Food Res. Technol.* 219. 584-587.

Grigorakis, K., Taylor, K. D. A., Alexis, M. N. (2003). Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry* 81. 263-268.

Hanson G. D., Rauniyar G. P., Hermann R. O. (1994). Using consumer profiles to increase the U.S. market for seafood: implications for aquaculture. *Aquaculture* 127. 303-316.

Howgate, P., Johnston, A., Whittle, K. J. (Eds.). (1992). Multilingual Guide to EC Freshness Grades for Fishery Products. Marine Laboratory. Scottish Office of Agriculture. Environment and Fisheries Department. Aberdeen.

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 Fisheries. Technological Paper.* 348. FAO. Rome. Italy.

Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology.* Sixth Edition. Part III: Microorganisms in Foods. Sea Foods. 101-113. Part V: Indicators of Food Safety and Quality-Principles of Quality Control and Microbial Criteria. 387-442.

Jørgensen, B. R. and Huss, H. H. (1989). Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology* 9. 51-62.

Jørgensen, B. R., Gibson, D. M., Huss, H. H. (1988). Microbiological quality and shelf-life prediction of chilled fish. *International Journal of Food Microbiology* 6. 295-307.

Koutsoumanis, K., Giannakourou, M. C., Taoukis, P. S., Nychas, G. J. E. (2002). Application of shelf-life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *International Journal of Food Microbiology* 73. 375-382.

- Kyрана, V. R. and Lougovois, V. P. (2002).** Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology* 37. 319-328.
- Kyрана, V. R., Lougovois, V., Valsamis, D. S. (1997).** Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology* 32. 339-347.
- Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. (1991).** Shelf-life extension and microbiological safety of fresh meat: a review. *Food Microbiology* 8. 267-297.
- Leduc, F., Tournaye, P., Kondjoyan, N., Mercier, F., Malle, P., Kol, P., Berdagué, J. L., Duflos, G. (2012).** Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry* 131. 1304-1311.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998).** Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 °C. *International Journal of Food Microbiology* 39. 111-121.
- Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X., Li, X., Zhao, J. (2012).** Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chemistry* 135. 140-145.
- Lougovois, V. P., Kyranas, E. R., Kyрана, V. R. (2003).** Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*. 36. 551-560.
- Madigan, M., T., Martinko, J., M., Parker, J. (2007).** Βιολογία των μικροοργανισμών. Κεφάλαιο 6: Μικροβιακή Αύξηση. σελ. 168-169. Τόμος I. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Mol, S., Erkan, N., Üçok, D., Tosun, Ş. Y. (2007).** Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Foods* 18. 120-128.
- Montville, J. T. and Matthews, K. R. (2010).** Μικροβιολογία Τροφίμων. Κεφάλαιο 6: Μικροοργανισμοί Δείκτες και Μικροβιολογικά Κριτήρια. σελ. 85-86. Κεφάλαιο 24: Φυσικές Μέθοδοι Συντήρησης Τροφίμων. σελ. 390.
- Ólafsdóttir, G., Lauzon, H. L., Martinsdóttir, E., Kristbergsson, K. (2006).** Influence of storage temperature on microbial spoilage characteristics of haddock fillets (*Melanogrammus aeglefinus*) evaluated by multivariate quality prediction. *International Journal of Food Microbiology* 111. 112-125.
- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, J., Mackie, I. M., Henehan, G., Nielsen, J., Nielsen, H. (1997).** Methods

to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science & Technology. Vol. 8.

Özogul, F., Kuley, E., Özogul, Y. (2007). Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in aluminium foil at 2 ± 1 °C. International Journal of Food Science and Technology 42. 903-909.

Özogul, Y., Özogul, F., Kuley, E., Özkütüt, A. S., Gökbulut, C., Köse, S. (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. Food Chemistry 99. 752-758.

Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S., Özogul, F. (2009). Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Food Chemistry 114. 505-510.

Paleologos, E. K., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2004). Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole gutted and filleted Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Food Microbiology 21. 549-557.

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. 411-420.

Parlapani, F. F., Malouchos, A., Haroutounian, S. A., Boziaris, I. S. (2014). 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., Meziti, A., Kormas, K. Ar., Boziaris, I. S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. Food Microbiology 33. 85-89.

Pastoriza, L., Bernárdez, M., Samperdo, G., Gabo, M. L., Herrera, J. R. (2008). Use of sterile and ozonized water as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh fish. Food Control 19. 772-780.

Sallam, K. I. (2007). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. Food Chemistry 101. 592-600.

- Scherer, R., Augusti, P. R., Bochi, v. C., Steffens, C., Fries, L. L. M., Daniel, A. P., Kubota, E. H., Neto, J. R., Emanuelli, T. (2006).** Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. Food Chemistry 99. 136-142.
- Simeonidou, S., Govaris, A., Vareltzis, K. (1997).** Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and mediterranean hake (*Merluccius mediterraneus*). Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 204 405-410.
- Stohr, V., Jofrraud, J. J., Cardinal, M., Leroi, F. (2001).** Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. Food Research International 34. 797-806.
- Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Domvridou, E., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2003).** Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. Journal of the Science of Food and Agriculture 83. 1373-1379.
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Vancanneyt, M., Koste, B., Swings, J., Nychas, G. J. E. (2007).** Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. Journal of Applied Microbiology 103. 711-721.
- Vyncke, W., Lutten, J., Br nner, K., Moermans, R. (1987).** Determination of total volatile bases in fish: a collaborative study by the West European Fish Technologists Association (WEFTA). Z. Lebensm. Unters. Forsch. 184: 110-114.

6.2 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 8^{ης} Μαρτίου 1995 (95/149/ΕΚ) για τον καθορισμό των οριακών τιμών Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (ΟΠΒΑ) για ορισμένες κατηγορίες προϊόντων αλιείας και των μεθόδων ανάλυσης που πρέπει να χρησιμοποιούνται.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθμ. 2406/96 ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 26^{ης} Νοεμβρίου 1996 περί καθορισμού κοινών προδιαγραφών εμπορίας ορισμένων αλιευτικών προϊόντων.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2074/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 5^{ης} Δεκεμβρίου 2005 για θέσπιση μέτρων εφαρμογής για ορισμένα προϊόντα βάσει του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και για την οργάνωση επίσημων ελέγχων βάσει των κανονισμών

(ΕΚ) αριθ. 854/2004 και (ΕΚ) αριθ. 882/2004, για την παρέκκλιση από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 852/2004 και για τροποποίηση των κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και (ΕΚ) αριθ. 854/2004.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1022/2008 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 17^{ης} Οκτωβρίου 2008 για τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2074/2005 όσον αφορά τα όρια ολικού πτητικού βασικού αζώτου (TVB-N).

6.3 Ελληνική βιβλιογραφία

Κλαουδάτος, Σ. Δ. και Κλαουδάτος, Δ. Σ. (2012). Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφή υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Κεφάλαιο 3: Αναπαραγωγή - εκτροφή ιχθύων θαλασσιών υδάτων. Εκτροφή ευρύαλων ειδών ιχθύων. 228-260. Εκδόσεις Προπομπός.

Μπλούκας, Ι. Γ. (2004). Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή. 21-43. Κεφάλαιο 9: Ψύξη. 219-246. Εκδόσεις Σταμούλη.

Μποζιάρης, Ι. Σ. (2010). Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Έκδοση 2. Κεφάλαιο 2: Μεταθανάτιες μεταβολές. 36. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

Παπουτσόγλου, Σ. Ε. (2008). Διατροφή Ιχθύων. Κεφάλαιο 10: Προτεινόμενες προδιαγραφές σιτηρεσιών-τροφών εκτρεφόμενων ειδών ιχθύων. 824-845 και 846-870. Εκδόσεις Σταμούλης.

Στεργίου, Κ. Ι., Καραχλέ, Π. Κ., Τσίκληρας, Α., Μαμαλάκης, Η. (2011). Κραυγή Ιχθύος: Ψάρια των Ελληνικών Θαλασσών. Βιολογία-Αλιεία-Διαχείριση. Πρώτο Μέρος. σελ. 21-25. Εκδόσεις Πατάκη.

6.4 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

¹https://www.google.gr/search?q=sparus+aurata&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=pcThU8myI8G47AbHvoCwDw&sqi=2&ved=0CAYQ_AUoAQ&biw=1366&bih=667#facrc=_&imgdii=KTW0g2jGBxXzZM%3A%3BDnWEUYQemUyWdM%3BKTW0g2jGBxXzZM%3A&imgrc=KTW0g2jGBxXzZM%253A%3BjMGRHKBc0VNt0M%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.murre.nl%252Fimages%252Ftranslator%252F

[1%252Fsparus_aurata_bon.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.murre.nl%252Fenglish%252Ftranslator.asp%3B300%3B143](#)

(Ημερομηνία πρόσβασης: **15.03.2014**)

²https://www.google.gr/search?q=labrax&es_sm=93&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=62HSUqxCtSZ0QXK8IDoDg&ved=0CAYQ_AUoAQ&biw=1366&bih=667#fcr=_&imgdii=tLXJ2_qOoE0rM%3A%3BbVHOcxkJ4ARbLM%3BtLXJ2_qOoE0rM%3A&imgrc=tLXJ2_qOoE0rM%253A%3BUBPjfaJWzKM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.zipcodezoo.com%252Fhp350%252FDicentrarchus_labrax_12.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fzipcodezoo.com%252Fphotographers%252FFabio%252520Crocetta.asp%3B734%3B350

(Ημερομηνία πρόσβασης: **15.03.2014**)

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en

(Ημερομηνία πρόσβασης: **13.10.2014**)

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

(Ημερομηνία πρόσβασης: **13.10.2014**)

<http://www.statistics.gr>

(Ημερομηνία πρόσβασης: **20.10.2014**)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 3.2.1. Πληθυσμοί της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (MO log₁₀ cfu/g) που καταμετρήθηκαν στους απεντερωμένους ιχθύες τσιπούρας (n = 2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

(Με έντονο χρώμα φαίνεται ο εμπορικός χρόνος ζωής)

ΗΜΕΡΕΣ	ΩΡΕΣ	TSA TVC	CFC <i>Pseudomonas</i> spp.	STAA <i>Brochothrix</i> <i>thermostata</i>	IA H ₂ S βακτήρια	VRBGA Enterobacteriaceae	MRS LAB
1	24	3.71	3.45	-	3.29	1.65	2.00
3	72	5.00	4.89	2.00	4.65	1.92	2.00
5	120	5.19	6.09	3.35	5.35	2.80	2.00
7	168	7.34	7.05	3.40	5.35	2.81	2.00
9	216	7.82	7.87	4.15	7.16	2.50	2.00
11	264	7.95	8.04	4.80	7.03	3.00	2.00
13	312	8.21	8.09	4.50	6.98	3.39	2.00
15	360	9.00	9.33	4.90	7.35	3.39	2.00

Πίνακας 3.2.2. Πληθυσμοί της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (MO log₁₀ cfu/g) που καταμετρήθηκαν στους απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού (n = 2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

(Με έντονο χρώμα φαίνεται ο εμπορικός χρόνος ζωής)

ΗΜΕΡΕΣ	ΩΡΕΣ	TSA TVC	CFC <i>Pseudomonas</i> spp.	STAA <i>Brochothrix</i> <i>thermostata</i>	IA H ₂ S βακτήρια	VRBGA Enterobacteriaceae	MRS LAB
1	24	3.04	2.48	-	3.32	1.74	2.00
3	72	4.06	4.63	2.15	4.11	1.77	2.00
5	120	5.12	5.30	2.15	4.84	2.32	2.00
7	168	7.31	7.09	4.00	5.68	2.39	2.00
9	216	7.49	7.44	3.16	5.69	2.04	2.00
11	264	7.39	7.69	3.69	6.08	2.02	2.00
13	312	8.02	7.98	4.74	6.15	3.36	2.00
15	360	9.00	9.46	4.95	6.44	3.57	2.00

Πίνακας 3.3.1. Μεταβολές στις τιμές pH της μεταθανάτιας σάρκας των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού (n = 2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

ΗΜΕΡΕΣ	ΩΡΕΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΑ			ΛΑΒΡΑΚΙ		
		ΔΕΙΓΜΑ	ΔΕΙΓΜΑ	ΜΟ	ΔΕΙΓΜΑ	ΔΕΙΓΜΑ	ΜΟ
		I	II		I	II	
1	24	6.09	6.15	6.12	6.38	6.25	6.32
5	120	6.15	6.15	6.15	6.25	6.20	6.23
7	168	6.10	6.07	6.09	6.25	6.30	6.28
11	264	6.17	6.10	6.14	6.30	6.31	6.31
13	312	6.27	6.21	6.24	6.32	6.42	6.37

Πίνακας 3.4.1.1. Μεταβολές του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N, mg N/100g σάρκας ιχθύος) των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού (n = 2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

(Οι τιμές με **έντονο χρώμα** αντιστοιχούν στον χρόνο απόρριψης των προϊόντων)

ΗΜΕΡΕΣ	ΩΡΕΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΑ			ΛΑΒΡΑΚΙ		
		ΔΕΙΓΜΑ	ΔΕΙΓΜΑ	ΜΟ	ΔΕΙΓΜΑ	ΔΕΙΓΜΑ	ΜΟ
		I	II		I	II	
1	24	8.4	8.96	8.68	7.28	9.80	8.54
5	120	12.32	12.88	12.60	8.96	10.36	9.66
9	216	17.08	16.80	16.94	14.28	14.56	14.42
13	312	28.84	29.96	29.40	25.76	26.04	25.90