

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Π.Δ.Ε.

Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus* στους 5°C
Shelf-life, microbiological, chemical and sensory changes during the storage of blue crab

Callinectes sapidus at 5°C



ΚΟΡΟΜΗΛΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

Βόλος 2015

**«Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές
κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus* στους 5 °C»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

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

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

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

Στον αδερφικό μου φίλο Μιχάλη Τριανταφύλλου που έφυγε

νωρίς αλλά θα μείνει για πάντα στις καρδιές μας!



«Η φιλία βελτιώνει την ευτυχία και μετριάζει τη δυστυχία, διπλασιάζει τη χαρά μας και κόβει στα δύο τον πόνο μας.», Τζόζεφ Άντισον

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας και φτάνοντας στο τέλος της φοιτητικής μου ζωής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με βοήθησαν και με στήριζαν σε όλη την πορεία μου αυτά τα χρόνια.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την στήριξη και την βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας τόσο στο πειραματικό κομμάτι όσο και στη συγγραφή της.

Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη, για την άψογη συνεργασία, την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε όσον αφορά το πειραματικό κομμάτι και την συγγραφή της εργασίας. Η βοήθεια της υπήρξε καθοριστική τόσο στο πρακτικό όσο και στο ψυχολογικό κομμάτι.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Κωνσταντίνο Κορμά και κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, οι οποίοι ήταν μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για την συνεργασία, την καθοδήγηση και το χρόνο τους, καθώς και όλους τους καθηγητές που με στήριζαν και με καθοδήγησαν όλα αυτά τα χρόνια.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον συμφοιτητή, συνάδερφο και κολλητό μου φίλο Αναγνωστόπουλο Δημήτρη για την άψογη συνεργασία και την συνεχή στήριξη που παρείχε ο ένας στον άλλο σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και γενικά των φοιτητικών μου χρόνων.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου, καθώς και στο νέο μέλος της οικογένειας, την ανιψιά μου Κατερίνα, που ήρθε και με γέμισε με χαρά και κουράγιο να συνεχίσω.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που περνούσα τον περισσότερο χρόνο αυτά τα πέντε χρόνια, τους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν στις χαρές και τις λύπες και μαζί τους δημιούργησα αναμνήσεις που θα μου μείνουν αξέχαστες και ενώ ένα κομμάτι αυτής της παρέας έφυγε, οι αναμνήσεις θα μείνουν για πάντα χαραγμένες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία είχε ως στόχο την μελέτη των μπλε καβουριών του είδους *Callinectes sapidus* αποθηκευμένων στους 5 °C με σκοπό την αξιολόγηση της ποιότητάς τους, την παρακολούθηση των μεταβολών των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών χαρακτηριστικών τους, καθώς και την εκτίμηση του εμπορικού χρόνου ζωής τους. Τα καβούρια του συγκεκριμένου είδους, ελήφθησαν από την περιοχή της Χαλάστρας (Ν. Θεσσαλονίκης), τον Φεβρουάριο του 2015 και αποθηκεύθηκαν στους 5 °C, αναπαριστώντας τις συνθήκες ψύξης στα σημεία πώλησής τους. Οι μετρήσεις για την παρακολούθηση των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών αναλύσεων (Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο, Άζωτο της Τριμεθυλαμίνης) γίνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 2 ημέρες).

Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε πως ο εμπορικός χρόνος ζωής των καβουριών ήταν δέκα (10) ημέρες. Η αρχική τιμή του pH ήταν 7,14 και παρουσίασε ουσιαστική αύξηση από την ημέρα απόρριψης και έπειτα, με την τιμή να φτάνει τα 7,16, ενώ στο τέλος της συντήρησης άγγιξε τα 8,52. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι φαίνεται να έπαιξαν σπουδαίο ρόλο στην αλλοίωση των καβουριών και κυριάρχησαν σε σχέση με την υπόλοιπη μικροχλωρίδα ήταν αυτοί του είδους *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν τον πληθισμό της OMX (ο οποίος βρέθηκε 2 log μεγαλύτερος σε σχέση με τους κύριους αλλοιωγόνους), φαίνεται ξεκάθαρα ότι οι κυριότεροι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί αποτέλεσαν ένα μικρό κλάσμα της OMX, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της (περίπου 90%) δεν αντιστοιχούσε σε κανέναν από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμούς πολύ χαμηλότερους, ενώ

τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης ($1 \log_{cfu/g}$) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα έφτασε τους $7,57 \log_{cfu/g}$ μετά από δέκα (10) ημέρες αποθήκευσης όπου και απορρίφθηκαν. Όσον αφορά τους χημικούς δείκτες αλλοίωσης, το TVB-N παρουσίασε ραγδαία αύξηση, καταγράφοντας τιμές $952,56 \text{ mg/Kg}^{-1}$ σάρκας την τελευταία ημέρα του εμπορικού χρόνου ζωής (ημέρα 10) και $1417,36 \text{ mg/Kg}^{-1}$ σάρκας κατά την τελευταία μέτρηση του πειράματος (ημέρα 16), σε σχέση με την αρχική μέτρηση η οποία ανερχόταν στα $507,92 \text{ mg/Kg}^{-1}$. Παρόμοια αύξηση παρουσίασε και το TMA-N καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, φθάνοντας τις τιμές των $341,2 \pm 52,34 \text{ mg/Kg}^{-1}$ στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής και $854,6 \pm 51,36 \text{ mg/Kg}^{-1}$ στο τέλος του πειράματος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι το μπλε καβούρι χαρακτηρίστηκε οργανοληπτικά μη αποδεκτό τη 10^η ημέρα όπου τα *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια αποτέλεσαν τους δύο σημαντικότερους σε πληθυσμό αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, χωρίς να ξεπεράσουν το επίπεδο των 5- 6 $\log_{cfu/g}$, το pH έφτασε στην τιμή 7,16 και οι συγκεντρώσεις του TVB-N και TMA-N έφτασαν στα επίπεδα των $952,56 \text{ mg/Kg}^{-1}$ και $341,2 \pm 52,34 \text{ mg/Kg}^{-1}$.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, φαίνεται ότι α) και άλλοι μικροοργανισμοί, εκτός των κυριότερων αλλοιωγόνων, επικράτησαν κατά την αλλοίωση του μπλε καβουριού και β) το TVB-N και το TMA-N θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύ καλούς δείκτες αλλοίωσης των μπλε καβουριών.

Λέξεις-κλειδιά: Μπλε καβούρι (*Callinectes Sapidus*), Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), Εμπορικός χρόνος ζωής, Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N), Άζωτο της Τριμεθουλαμίνης (TMA-N)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Μικροβιακή Αλλοίωση των ιχθύων	1
1.2. Καρκινοειδή.....	3
1.2.1. Ορισμοί.....	3
1.2.2. Αρχική Μικροχλωρίδα.....	4
1.2.3. Επεξεργασία και η επίδρασή της στη μικροχλωρίδα.....	6
1.2.4. Αλλοίωση.....	7
1.2.4.1. Γαρίδες και καραβίδες.....	8
1.2.4.2. Καβούρια και αστακοί.....	8
1.2.5. Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (ΕΑΜ)	8
1.2.6. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης	10
1.3. Μπλε Καβούρι (Blue Crab, <i>Callinectes sapidus</i>).....	12
1.3.1. Γενικά Χαρακτηριστικά.....	12
1.3.2. Θρεπτική σύσταση του <i>Callinectes sapidus</i>	14
1.4. Σκοπός Εργασίας.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1. Σχεδιασμός του πειράματος.....	16
2.2. Τόπος συλλογής των δειγμάτων	16
2.3. Μικροβιολογική ανάλυση	16
2.3.1. Μικροβιολογικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια	16
2.3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ).....	17
2.3.1.2. Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas spp.</i>	19
2.3.1.3. Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae	21
2.3.1.4. Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)	23
2.3.1.5. Υδροθειούχα βακτήρια.....	26

2.4. Μικροβιολογική ανάλυση του ιστού των καβουριών	27
2.5. Προσδιορισμός του χρόνου απόρριψης.....	29
2.6. Μέτρηση pH	30
2.7. Χημική ανάλυση.....	30
2.7.1. Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)	30
2.7.2 Προσδιορισμός Αζώτου Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) φασματοφωτομετρικά	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
3.1. Μικροβιολογική ανάλυση	32
3.2. Εκτίμηση του χρόνου απόρριψης	34
3.3. Προσδιορισμός του pH.....	35
3.4. Προσδιορισμός του συνόλου των πτητικών βάσεων (TVB-N, TMA).....	36
3.4.1. Προσδιορισμός TVB-N	36
3.4.2. Προσδιορισμός TMA-N	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49
ABSTRACT	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μικροβιακή Αλλοίωση των ιχθύων

Ως αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να θεωρηθεί οποιαδήποτε μεταβολή η οποία καθιστά το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Sivertsvik, *et al.* 2002). Η αλλοίωση των ψαριών ξεκινά μετά το θάνατο τους λόγω αυτοοξειδωσης (οξειδωση των ακόρεστων λιπιδίων), οι αντιδράσεις δηλαδή που προκαλούνται από δραστηριότητες των ιδίων ενζύμων του ψαριού, και μεταβολικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα ψάρια. Με την πάροδο του χρόνου, η απώλεια των χαρακτηριστικών που χαρακτηρίζουν την νωπότητα (λαμπερό δέρμα, ευχάριστη θαλασσινή οσμή, κτλ.) μπορεί να μετρηθεί απλώς με συγκριτικές αναλύσεις που αφορούν τα οπτικά χαρακτηριστικά και την οσμή του προϊόντος.

Η απώλεια της νωπότητας και η αλλοίωση δεν μπορούν να διαχωριστούν ως διαδικασίες, αλλά είναι μια ευρέως διαδεδομένη άποψη ότι η απώλεια της νωπότητας σχετίζεται με αυτολυτική αποικοδόμηση και η αλλοίωση είναι περισσότερο μικροβιακής προέλευσης (Huss 1995).

Η υποβάθμιση των ολόκληρων νωπών ιχθύων που αποθηκεύονται σε πάγο γενικά ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο, και αυτό το σχέδιο είναι η βάση των συστημάτων ταξινόμησης της νωπότητας. Τα μάτια μετατρέπονται από κυρτά και διαφανή σε κοίλα σε και αδιαφανή, τα βράγχια από ροζ και λαμπερά, χωρίς άρωμα, σε καφέ και γλοιώδη με έντονη οσμή, το δέρμα γίνεται από ιριδίζον και λευκό σε θαμπό με βακτηριακή λάσπη και η σάρκα μετατρέπεται από το φωτεινή και ελαστική σε θαμπή και μαλακή. Διάφορες μέθοδοι για την αξιολόγηση νωπότητας ολόκληρων ιχθύων έχουν προταθεί από ένα εκπαιδευμένο πάνελ τα οποία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 1.1).

Πίνακας 1.1 Κλίμακες ποιότητας ιχθύων μαζί με το σύστημα βαθμολόγησης

Κλίμακες ποιότητας ιχθύων	
Όνομα κλίμακας	Σύστημα βαθμολόγησης
Κλίμακα Torry	10-0 (≤ 4 απόρριψη)
Ποιότητα Δείκτης Μέθοδος	0-24 (αυθαίρετη απόρριψη)
Ευρωπαϊκό Σύστημα βαθμολόγησης	Extra, A , B , C (= απόρριψη)

Αξίζει να σημειωθεί ότι η απόρριψη των ολόκληρων νωπών ψαριών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση μπορεί να γίνει χωρίς χημική ή μικροβιολογική αξιολόγηση, ή για εκείνο το θέμα της αξιολόγησης της γεύσης του ψαριού, όπως τα παραδοσιακά πρότυπα αλλοίωσης των εξωτερικών οργάνων είναι συνήθως πολύ ξεχωριστή.

Κατά την εργασία με φιλέτα, η αξιολόγηση της γεύσης είναι αναπόφευκτη καθώς η οπτική αξιολόγηση της υποβάθμισης των ματιών και των βραγχίων δεν είναι διαθέσιμη για ανάλυση. Το πρότυπο εξέτασης της γεύσης μαγειρεμένων ψαριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ποιότητας του χρώματος, της υφής, της μυρωδιάς και της γεύσης του μαγειρεμένο ψαριού. Γενικά, η ανάλυση μαγειρεμένων ψαριών περνά μέσα από τέσσερις φάσεις αλλοίωσης:

- i. Απαλή γλυκιά γεύση, θαλασσινή και πιθανώς ελαφρώς μεταλλική.
- ii. Ουδέτερη γεύση.
- iii. Ίχνη ξινή γεύσης, φρουτώδη και / ή πικρή γεύση, ανάπτυξη ασθενούς γλυκιάς, μυρωδιά δυσάρεστη, αμμωνίας, θειούχα όπως το λάχανο με υφή μαλακή και υδαρή ή σκληρή και ξηρή.
- iv. Ενίσχυση της αλλοίωσης χαρακτηριστικό της φάσης III, χαλασμένο και σάπιο.

Οι διεργασίες υποβάθμισης που αναλύονται με τις μεθόδους βαθμολόγησης της ποιότητας παραπάνω είναι ένα σύνθετο μείγμα των φυσικών, χημικών, μικροβιολογικών και βιοχημικών δράσεων. Οι διαδικασίες αυτές επηρεάζονται έντονα από τις φυσικές συνθήκες αποθήκευσης.

Μετά το θάνατο, η νεκρική ακαμψία είναι η πρώτη αξιοσημείωτη αλλαγή στα ψάρια. Από χαλαροί, οι μύες σκληραίνουν καθώς η υπολειμματική τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) μειώνεται και οι μυοσίνη και η ακτίνη νημάτων συνδέονται για να σχηματίσουν την ακτομυοσίνη (Pedrosa-Menabrito *et al*, 1987). Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, η ακαμψία εξασθενεί και οι μύες χαλαρώνουν και πάλι και τα ψάρια επιστρέφουν σε μια χαλαρή κατάσταση.

1.1. Καρκινοειδή

1.1.1 Ορισμοί

Τα καρκινοειδή είναι ασπόνδυλα ζώα και αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία της συνομοταξίας *Arthropoda*. Διαθέτουν ένα κατακερματισμένο σώμα, συνένωση των άκρων και χιτινώδη εξωσκελετό, και είναι συνήθως υδρόβια, π.χ. καβούρια, αστακοί, караβίδες και γαρίδες (Encarta 1997). Οι караβίδες, οι αστακοί και τα καβούρια έχουν δέκα πόδια των οποίων το μπροστινό ζευγάρι καταλήγει σε νύχια.

Οι γαρίδες και οι караβίδες είναι εύκρατα είδη που συνήθως καταναλώνονται από τον άνθρωπο και περιλαμβάνουν τα μέλη των οικογενειών *Nephrops norvegicus* (καραβίδες), *Pandalus borealis* (γαρίδα ανοικτής θαλάσσης), *Pandalus montagui* και *Crangon crangon* (παράκτια γαρίδα). Είδη προς κατανάλωση από τροπικά νερά περιλαμβάνουν τα *Penaeus spp.*, *Parapeneopsis spp.* και *Trachypenaeus spp.* (γαρίδες βαθέων υδάτων).

Τα καβούρια, οι αστακοί και οι караβίδες παραδοσιακά παραμένουν ζωντανά μετά τη σύλληψη και στη συνέχεια μαγειρεύονται για να θανατωθούν αμέσως πριν από την κατανάλωση.

Μαγειρεμένα και διατηρημένα με απλή ψύξη, ή κατεψυγμένα καβούρια, αστακοί και караβίδες είναι διαθέσιμα για τον καταναλωτή λόγω της αυξανόμενης ζήτησης για έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, π.χ. ουρές αστακού και μαγειρεμένη καβουρόψιχα παρουσιάζονται διακοσμητικά στο καβούκι τους.

Παστεριωμένο κρέας καβουριού είναι βρώσιμο παραπροϊόν το οποίο απομακρύνεται από τον εξωσκελετό με το χέρι, συσκευάζεται σε σάκους πολυαιθυλενίου και αποθηκεύεται και μεταφέρεται ως κατεψυγμένο προϊόν.

1.1.1. Αρχική Μικροχλωρίδα

Όπως και με τους ιχθύες, το επίπεδο και το είδος της αρχικής μικροχλωρίδας των καρκινοειδών αντικατοπτρίζει ένα συνδυασμό παραγόντων, που περιλαμβάνουν το περιβάλλον από το οποίο έχουν συλληφθεί ή έχουν συγκομισθεί, τη διατροφή και τις συνθήκες ζωής τους, η γεωγραφία της περιοχής που συλλαμβάνονται ή καλλιεργούνται, η εποχή, η θερμοκρασία και η ποιότητα των υδάτων στα οποία υπάρχουν. Μετά τη σύλληψη ή τη συγκομιδή, η χλωρίδα θα αλλάξει ανάλογα με τις μεθόδους χειρισμού ή / και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται. Οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με τα καρκινοειδή και οστρακόδερμα εξαρτώνται από τον τρόπο χειρισμού στον οποίο το προϊόν υποβάλλεται, ιδιαίτερα αφού έχει μαγειρευτεί. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της αποφλοιώσης των μαγειρεμένων γαρίδων, υπάρχει η δυνατότητα για διασταυρούμενη μόλυνση τόσο από τον άνθρωπο όσο και από το περιβάλλον. Τα μέτρα ελέγχου για την αποτροπή αυτών

των πιθανών κινδύνων που εμφανίζονται περιλαμβάνουν την κατάρτιση και την επίβλεψη των εργατών, καθώς και ορθών πρακτικών υγιεινής (GHP). Κακές διαδικασίες υγιεινής αυξάνουν την πιθανότητα μόλυνσης με βακτήρια που είναι επιβλαβή για τη δημόσια υγεία. Η δομή του κυκλοφορικού συστήματος των καβουριών δεν είναι κλειστή, πράγμα που σημαίνει ότι η αιμολέμφος μπορεί να είναι μια δεξαμενή βακτηρίων, ιδιαίτερα για τα μέλη του γένους *Vibrio* (Reilly 1992)

Η αλλοίωση αρχίζει μετά το θάνατο μόλις το σύστημα άνοσο-απόκρισης των καρκινοειδών οστρακόδερμων αδυνατεί να λειτουργήσει. Ως εκ τούτου, για τα καβούρια και τους αστακούς, τα βακτήρια αλλοίωσης έχουν μικρή σημασία, διότι συνήθως υποβάλλονται σε επεξεργασία ζωντανά, π.χ. βράσιμο καρκινοειδών για να σκοτωθούν και έπειτα μαγείρεμα του κρέατος τους πριν την κατανάλωση. Ωστόσο, με την αυξανόμενη ζήτηση για έτοιμα μαγειρεμένα προϊόντα καρκινοειδών, υπάρχει μια αναπτυσσόμενη αγορά με νωπές ουρές αστακών ή μαγειρεμένη καβουρόψιχα με κέλυφος καβουριού. Εάν αυτά τα προϊόντα υπόκεινται σε λανθασμένη θερμοκρασία και αποθήκευση πάνω από τη συνιστώμενη θερμοκρασία, αυτό παρουσιάζει πιο ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη τόσο αλλοιωγόνων όσο και παθογόνων βακτηρίων. (Adams *et al.* 1995, Oscar *et al.* 2008)

Σε σύγκριση, οι γαρίδες πεθαίνουν αμέσως μετά τη σύλληψη, έτσι η αλλοίωση μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της αποβίβασης και της μεταφοράς στο εργοστάσιο επεξεργασίας. Όπως και με τους ιχθύες, είναι σημαντικό οι γαρίδες να χειρίζονται και να καταψύχονται σωστά ώστε να κρατηθούν όσο το δυνατόν περισσότερο φρέσκιες και σε αμόλυντη κατάσταση. Η μικροβιακή χλωρίδα των καρκινοειδών από εύκρατα νερά διαφέρει από εκείνη των καρκινοειδών από θερμότερα, τροπικά νερά. Βακτήρια αλλοίωσης που σχετίζονται με οστρακόδερμα εύκρατου περιβάλλοντος περιλαμβάνουν

τα *Pseudomonas* spp., τα *Shewanella putrefaciens* και μέλη της ομάδας *Acinetobacter-Moraxella*. Σε αντίθεση, τα γένη που σχετίζονται με τροπικά είδη περιλαμβάνουν τα *Enterobacteriaceae*, *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes*, κορυνοβακτήρια, *Micrococcus* spp., και *Achromobacter* spp. Ως εκ τούτου, από τη στιγμή της σύλληψης και επεξεργασίας, η βακτηριακή μόλυνση και αλλοίωση είναι αναπόφευκτες. Ο ρυθμός αλλοίωσης θα είναι μια συνάρτηση του χρόνου και της θερμοκρασίας, είτε υπάρχει GHP, και θα εξαρτάται από το εάν τα καρκινοειδή συλλέχθηκαν από δροσερά ή θερμότερα νερά.. (Boziaris *et al.* 2011)

Όπως και με τους ιχθύες, υπάρχουν ενδείξεις ότι η διάρκεια ζωής των τροπικών οστρακόδερμων είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ειδών εύκρατων υδάτων εάν αποθηκευθούν σωστά σε πάγο, για παράδειγμα, έως και 16 ημέρες για τα τροπικά είδη σε σύγκριση με 8-10 ημέρες για εύκρατα είδη (Cann 1976). Τα ψυχρότροφα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση φθοράς δεν υπάρχουν στο ολόφρεσκα καρκινοειδή από τροπικά νερά σε τόσο υψηλά επίπεδα, όπως βρίσκονται σε καρκινοειδή από τα πιο δροσερά ύδατα και, ως εκ τούτου, ο ρυθμός επιδείνωσης των καρκινοειδών από αυτούς τους οργανισμούς μειώνεται, ιδιαίτερα αν αποθηκεύονται σε πάγο ή παγωμένο νερό (Ashie *et al.* 1996).

1.1.2. Επεξεργασία και η επίδρασή της στη μικροχλωρίδα

Τα καβούρια, οι αστακοί και οι караβίδες συλλέγονται από τα κλουβιά ή τα δοχεία που περιέχουν το δόλωμα. Στη συνέχεια λαμβάνονται για την αγορά ζωντανά είτε σε δεξαμενές συγκράτησης, διατηρημένα με απλή ψύξη με θαλασσινό νερό, ή μεταφέρονται απευθείας στις μονάδες μεταποίησης. Αυτά τα ζώα μπορούν να επιβιώσουν έξω από το νερό, εάν το περιβάλλον διατηρείται δροσερό και υγρό. Τα

νύχια συνήθως συνδέονται μαζί για την αποτροπή της μεταξύ τους πάλης προκαλώντας ζημιά το ένα στο άλλο. Δεδομένου ότι οι μύες των καρκινοειδών αποσυντίθενται γρήγορα μετά το θάνατό τους απορρίπτονται.

Αντίθετα, οι γαρίδες πεθαίνουν γρήγορα μετά τη σύλληψη. Ένα μεγάλο ποσοστό των γαρίδων παράγονται από τις υδατοκαλλιέργειες, ή βρίσκονται σε υφάλμυρο νερό γύρω από τις ακτές, έτσι ώστε είτε να πωλούνται στην τοπική αγορά ή να υποβάλλονται σε επεξεργασία σε τοπικές μονάδες επεξεργασίας. Οι γαρίδες μπορούν να επεξεργαστούν ολόκληρες, με το "κεφάλι" ή "χωρίς το κεφάλι" με την εδωδιμη ουρά να αφαιρείται από το κεφάλι, τα βράγχια και τον θώρακα. Η τελευταία διαδικασία μπορεί να εκθέσει τους μύες των γαρίδων σε συμβάντα διασταυρούμενης μόλυνσης, εάν η GHP δεν ακολουθείται. Ωστόσο, αφαιρώντας το κεφάλι και το θώρακα η πηγή ενζύμων εξαλείφεται αποτρέποντας την εμφάνιση των μαύρων κηλίδων. Όταν οι γαρίδες φθάνουν στη μονάδα επεξεργασίας πλένονται και στη συνέχεια ταξινομούνται σε μέγεθος. Οι γαρίδες ενδέχεται να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία με το κέλυφος, ή χωρίς το κέλυφος και η κεντρική φλέβα αφαιρείται. Η σχολαστική υγιεινή είναι σημαντική σε αυτό το στάδιο για να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση των ουρών γαρίδας (Oscar *et al.* 2008).

1.1.3. Αλλοίωση

Τα κύρια γένη βακτηρίων κατά Gram αρνητικά τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση των καρκινοειδών οστρακοειδών είναι τα ίδια με εκείνα που προκαλούν αλλοίωση στα ψάρια και περιλαμβάνουν τα *Sh. putrefaciens* και *Pseudomonas* spp. (Barker Jr *et al.* 1966).

1.1.3.1. Γαρίδες και καραβίδες

Δείκτες φρεσκότητας για τις γαρίδες και τις καραβίδες είναι για τα κελύφη να είναι τραγανά και στεγνά και να έχουν απότομη και δροσερή υφή, καθώς επίσης να έχουν μια υπόγλυκη, ελαφρά μυρωδιά ιωδίου. Σε αντίθεση, οι αλλοιωμένες γαρίδες και καραβίδες έχουν κελύφη που είναι μαλακά, υγρά και υφή όμοια με «σαπούνη» ή «μαρμελάδα». Όταν οι γαρίδες αποσυντίθενται σε ένα περιορισμένο χώρο παράγεται θερμότητα, και μια ισχυρή οσμή αμμωνιακού, ενδεικτικό της πρωτεϊνικής αποδόμησης και της ανάπτυξης του κύριου αλλοιωγόνου βακτηρίου *Sh . putrefaciens* (Jay 1986).

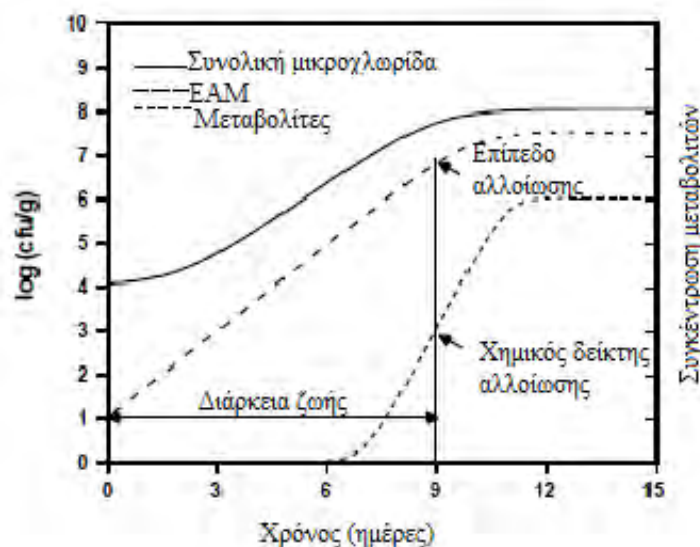
1.1.3.2. Καβούρια και αστακοί

Τα καβούρια και οι αστακοί θα πρέπει να είναι ζωντανά όταν βράζονται ή παλούνται. Αν είναι βραστά, η στενότητα των άκρων θα δείξει αν σκοτώθηκαν με εμφύσηση σε βραστό νερό ή, για τα καβούρια, αμέσως πριν τη ζέση. Τα κελύφη έχουν μια τραγανή, φωτεινή και ξηρή εμφάνιση, ενώ βρασμένα έχουν μια ευχάριστη ελαφρώς γλυκιά μυρωδιά. Στα καβούρια και τους αστακούς που έχουν υποστεί αλλοίωση, δεν υπάρχει καμία ένδειξη ζωής. Αν η ουρά πέσει, ο σύνδεσμος μεταξύ της ουράς και του καβουκιού είναι ανοικτή και τα άκρα κρέμονται χαλαρά. Το κέλυφος θα είναι μαλακό, θαμπό και κολλώδη, με εμφανή σημάδια αποσύνθεσης ή πράσινο αποχρωματισμό εκτίθεται διαμέσου της μεμβράνης από την πτώση της ουράς. Τέλος, παράγεται μία δυσάρεστη μυρωδιά (Whiteley *et al.* 1986).

1.1.4. Ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμοί (EAM)

Οι Ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμοί (EAM) συνήθως αναφέρονται σε νωπά ή ελαφρώς διατηρημένα αλιευτικά προϊόντα οι οποίοι βρίσκονται αρχικά σε πολύ

χαμηλές συγκεντρώσεις, αποτελώντας ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μικροχλωρίδας. Υπό ορισμένες συνθήκες όμως, αυτοί οι οργανισμοί αλλοίωσης είναι σε θέση να πολλαπλασιάζονται σε αυξημένο ρυθμό, αποτελώντας την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα αλλοιώνοντας τη γεύση τους, και όντας τελικά οι πλέον υπεύθυνοι οργανισμοί για την οργανοληπτική απόρριψη των ψαριών (Dalgaard 2003). Η απόρριψη γίνεται όταν οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους (metabolites: CSI-chemical spoilage ind(ex)-ices), έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες που την προκαλούν, και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης (spoilage level) των 10^7 - 10^9 cfu/g (Gram *et al.* 1996, Huis in't Veld 1996), (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1 Γενική περιγραφή της αλλοίωσης των ιχθυηρών (Dalgaard *et al.* 1993)

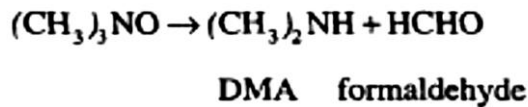
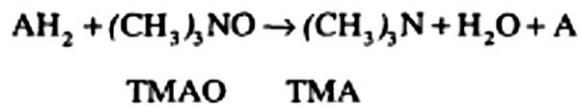
Οι EAM (SSOs, Specific Spoilage Organisms) διαφέρουν από είδη σε είδη προϊόντων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι ένα και μόνο είδος βακτηρίου υπεύθυνο για την αλλοίωση (Gram, *et al.* 2002). Επίσης, η επικράτηση των EAM εξαρτάται κάθε φορά από μία σειρά παραγόντων κατά την παραγωγική αλυσίδα

όπως επεξεργασία, μεταφορά και συντήρηση (Nychas *et al.* 2008). Ο ευρέως γνωστός οργανισμός για την αλλοίωση κατεψυγμένων θαλασσινών ψαριών είναι ο *Shewanella putrefaciens* ενώ, για τα κατεψυγμένα ψάρια των γλυκών νερών είναι οι οργανισμοί του είδους *Pseudomonas spp* (Gram *et al.* 2002). Το περιβάλλον από το οποίο τα ψάρια αλιεύονται είτε είναι από νερά εύκρατα, τροπικά ή υποτροπικά, δεν φαίνεται να επηρεάζει το είδος των ΕΑΜ, με όλα τα θαλασσινά ψάρια να επηρεάζονται από τους ίδιους ΕΑΜ όταν αποθηκεύονται σε παγωμένες αερόβιες συνθήκες (Gram 1996).

1.1.5. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

Οι μύες των ψαριών είναι πλούσιοι σε άζωτο και μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, νουκλεοτίδια, και οξείδιο τριμεθυλαμίνης και χρησιμεύουν ως μικροβιακά υποστρώματα ή αποδέκτες ηλεκτρονίων. Η παραγωγή των προϊόντων των μικροβιακών μεταβολιτών έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των προϊόντων. Έτσι, η εκτίμηση της αλλοιωγόνου δυναμικής των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού των μεταβολικών προϊόντων που προκαλούν την αλλοίωση και την οργανοληπτική απόρριψη, χρησιμοποιείται ως ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης. Περαιτέρω, είναι δυνατό η χρήση τέτοιων μεταβολιτών ως χημικοί δείκτες μικροβιολογικής αλλοίωσης. Οι κυριότεροι χημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N), η τριμεθυλαμίνη (TMA) ή το άζωτο της τριμεθυλαμίνης (TMA-N). Το TVB-N παράγεται σε σημαντικές ποσότητες μόνο κατά τα στάδια της προχωρημένης αλλοίωσης των ιχθύων και δεν θεωρείται αξιόπιστη ουσία για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των ψαριών στο αρχικό στάδιο της αποθήκευσης (Oehlenschläger 1992, 1997a,b).

Μετά το θάνατό των ζώων, τα ένζυμα από τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς μεταβολίζουν κατά κύριο λόγο το εκχυλιστικό κλάσμα των μυών του ψαριού, παράγοντας μια ευρεία ποικιλία πτητικών ενώσεων με αποτέλεσμα τις δυσάρεστες γεύσεις και οσμές. Το οξειδίο τριμεθυλαμίνης (TMAO), που έχει βρεθεί σε ένα μεγάλο αριθμό θαλάσσιων ψαριών και οστρακοειδών, είναι κατανεμημένο σε τριμεθυλαμίνη (TMA) είτε από ενδογενή ένζυμα ή από βακτηριακά ένζυμα τριμεθυλαμίνης οξειδάσης (Phillippy 1984). Το TMAO μπορεί επίσης να αποσυντεθεί προς διμεθυλαμίνη (DMA) και φορμαλδεΐδη. Οι αντιδράσεις που εμπλέκονται είναι οι εξής:



Σχήμα 1.2 Σχηματική απεικόνιση αντιδράσεων οξειδίου τριμεθυλαμίνης

όπου, το A είναι ένα οξειδωμένο υπόστρωμα και το AH₂ είναι η ανοιγμένη μορφή του υποστρώματος. Το TMA αντιδρά με τα λιπίδια στους μυς του ψαριού για να παράγει το χαρακτηριστικό οσμή " ψαρίλας " των ψαριών χαμηλής ποιότητας. Όταν η παροχή οξυγόνου είναι εξαντλημένη, πολλά από τα βακτήρια αλλοίωσης χρησιμοποιούν TMAO ως τερματικό δέκτη υδρογόνου, επιτρέποντας έτσι να αναπτυχθούν κάτω από ανοξικές συνθήκες. Αυτό θα μπορούσε να είναι ένας λόγος για τον οποίο τα θαλασσινά αλλοιώνονται πιο γρήγορα από ό, τι άλλες τροφές (Ozogul *et al.* 2000, Buransompob *et al.* 2003).

1.2. Μπλε Καβούρι (Blue Crab, *Callinectes sapidus*)

1.2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Γεωγραφική Εξάπλωση

Παρά το γεγονός ότι το φυσικό φάσμα περιοχής του *Callinectes sapidus* κυμαίνεται από το δυτικό Ατλαντικό Ωκεανό έως τη Σκωτία και την Αργεντινή, εισήχθη, τυχαία ή σκόπιμα, στην Ασία και την Ευρώπη. Επίσης, έχει εισαχθεί στη Χαβάη και την Ιαπωνία. Το *Callinectes sapidus* συναντάται κυρίως από το Cape Cod (Μασαχουσέτη) στην Ουρουγουάη, αλλά βρίσκεται επίσης και βόρεια τουλάχιστον της Μασαχουσέτης (Hill 2004, Shapiro 2011).

Η παρουσία του *C. sapidus* έχει καταγραφεί επίσης από τα τέλη της δεκαετίας του 1940 στον Θερμαϊκό (Serbetis 1959), ενώ η αφθονία του στον κόλπο παρουσιάζει διαχρονικά σημαντικές διακυμάνσεις. Τα τελευταία δύο χρόνια το καβούρι παρουσιάζει μια ιδιαίτερα δυναμική εξάπλωση στον Θερμαϊκό κόλπο, καθώς ο πληθυσμός του αυξήθηκε σε εντυπωσιακά επίπεδα. Η παρουσία του διαπιστώθηκε και νότια ως τον ποταμό Πηνειό καθώς επίσης και στο βόρειο-ανατολικό Αιγαίο, ως την εκβολική περιοχή του ποταμού Έβρου, περιοχές στις οποίες το είδος είχε καταγραφεί και παλαιότερα (Enzeross *et al.* 1997, Serbetis 1959).

Βιότοπος

Το μπλε καβούρι, *Callinectes sapidus*, κατοικεί στο βυθό και μπορεί να βρεθεί σε μια ποικιλία οικοτόπων που κυμαίνονται από τα πιο αλμυρά νερά του κόλπου σε σχεδόν γλυκά νερά των πίσω ορμών. Ιδιαίτερα συχνά εμφανίζεται σε εκβολές ποταμών, το είδος αυτό κυμαίνεται σε φρέσκα νερά, και μπορεί να βρεθεί και στην ανοιχτή θάλασσα. Το ενδιαίτημα του μπλε καβουριού κυμαίνεται από τη χαμηλή παλιρροιακή

γραμμή μέχρι σε νερά 36 μέτρων βαθιά. Τα θηλυκά παραμένουν σε υψηλότερα τμήματα αλατότητας του συστήματος εκβολής, ειδικά για ωοτοκία. Κατά τη διάρκεια περιόδων του έτους, όταν οι θερμοκρασίες είναι πιο χαμηλές, το *C. sapidus* τείνει να μεταναστεύει σε πιο βαθιά νερά (Shapiro 2011, Texas *et al.* 2009).

Φυσική περιγραφή

Το *Callinectes sapidus* είναι εύκολα αναγνωρίσιμο από το χρώμα του σώματός του που είναι γενικά ένα φωτεινό μπλε κατά μήκος της μετωπιαίας περιοχής, ιδιαίτερα κατά μήκος των chelipeds (τα προσαρτήματα που φέρουν μία λαβίδα που μοιάζει με νύχι). Το υπόλοιπο σώμα τους είναι σκιασμένο με ένα καφέ λαδί χρώμα. Για να κολυμπήσει, το πέμπτο πόδι προσαρμόζεται σε σχήμα κουπιού. Τα θηλυκά έχουν ευρείες τριγωνικές ή στρογγυλεμένες ποδιές και κόκκινα δάχτυλα στο chelae, ενώ στα αρσενικά το κοιλιακό πτερύγιο, ή η ποδιά, διαμορφώνεται σε σχήμα ανεστραμμένου "T". Το *Callinectes sapidus* μπορεί να αυξηθεί έως 25 εκατοστά σε μήκος κελύφους (CL), με πλάτος κελύφους να είναι περίπου διπλάσιο από το μήκος. Η ανάπτυξη είναι ραγδαία κατά τη διάρκεια του πρώτου καλοκαιριού, με τα καβούρια να αυξάνονται από 70 έως 100 mm CL. Με το δεύτερο έτος, η ωριμότητα επιτυγχάνεται σε μήκη καβουκιού 120-170 mm (Steele 1979, Texas *et al.* 2009).



Εικόνα 1.1 Μορφολογία *Callinectes sapidus*

1.2.1. Θρεπτική σύσταση του *Callinectes sapidus*

Τα μπλε καβούρια περιέχουν περίπου 80 % νερό. Άλλα σημαντικά συστατικά του μπλε καβουριού είναι πρωτεΐνη και το λίπος (Πίν. 1.2).

Πίνακας 1.2 Εγγύτατη σύνθεση των μπλε καβουριών από διάφορους συγγραφείς

Υγρασία (%)	Πρωτεΐνη (%)	Λίπος (%)	Αναφορές
81.20	16.10	1.0	Farragut (1965)
77.4 – 86.7	11.9 – 19.2	0.4 – 1.5	Wheaton and Lawson (1985)
78.60	11.60*	0.75*	Akpan (1997)
81.58 – 83.1	14.71 – 15	0.64 -0.79	Gökođlu and Yerlikaya (2003)

* Μετρήσεις ανά ξηρά ουσία μετατρέπονται σε μετρήσεις ανά υγρή ουσία.

Οι διαφορές είναι μικρές μεταξύ της υγρασίας, των πρωτεϊνών και του λίπους ανάμεσα στις δαγκάνες και το κρέας του σώματος. Η μεγαλύτερη διαφορά στο μπλε καβούρι ανάμεσα στις δαγκάνες και το κρέας του σώματος αφορά τη λιπαρή σύνθεση. Το ποσοστό του λίπους στις δαγκάνες και το κρέας του σώματος είναι 0,64% και 0,79% αντίστοιχα (Gökođlu *et al.* 2003).

Όσον αφορά τα κύρια λιπαρά οξέα στο μπλε καβούρι κρέας της δαγκάνας, το κρέας του σώματος και το ηπατοπάγκρεας αναφέρθηκαν σε μια μελέτη των Celic *et al.* (2004), και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 1.3).

Πίνακας 1.3 Κύρια λιπαρά οξέα στο κρέας του μπλε καβουριού (% του συνόλου των λιπαρών οξέων).

Λιπαρά Οξέα	Δαγκάνες	Κρέας Σώματος	Ηπατοπάγκρεας
14:0	1.13	2.03	21.6
16:0	13.5	15.0	3.71
16:1 n-7	4.07	5.59	1.60
18:1 n-9	12.9	13.7	6.85
18:2 n-9	6.51	5.30	2.63
20:4 n-6	7.48	5.02	8.22
20:5 n-3	10.6	8.41	7.78
22:6 n-3	5.92	6.75	5.30

Για το μεγαλύτερο μέρος, το προφίλ λιπαρών οξέων του κρέατος του σώματος και των δαγκανών είναι παρόμοιο. Η αναλογία των ω -3/ ω -6 έχει επίσης αναφερθεί, και βρέθηκε να είναι 2,32 και 3,18 στις δαγκάνες και το κρέας του σώματος, αντίστοιχα. Ορισμένα άρθρα επισημαίνουν την κατανάλωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως ευεργετικά (Dyerberg 1986).

1.3. Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας είναι ο προσδιορισμός των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών για την εκτίμηση της ποιότητας και του εναπομείναντος εμπορικού χρόνου ζωής των καβουριών αποθηκευμένων στους 5 °C. Επίσης, μελετήθηκαν και μετρήθηκαν οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί με σκοπό τον προσδιορισμό των κύριων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που ευθύνονται για την υποβάθμιση των καβουριών και κυριαρχούν, σε σχέση με την υπόλοιπη μικροχλωρίδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Σχεδιασμός του πειράματος

Το πείραμα διεξήχθη πάνω σε δύο (2) παρτίδες (batches) των είκοσι (20) ατόμων η κάθε μία, σε αρσενικά και θηλυκά άτομα και σκοπό είχε την παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών καθώς και το προφίλ των παραγόμενων χημικών δεικτών αλλοίωσης όπως TVB-N, TMA. Τέλος πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση και μέτρηση του pH των δειγμάτων.

2.2. Τόπος συλλογής των δειγμάτων

Τα καβούρια του είδους *Calinectes sapidus* που στο σύνολό τους ανέρχονταν στα σαράντα (40) άτομα [δύο (2) παρτίδες των είκοσι (20) ατόμων] ελήφθησαν από την εταιρία Blue Crab P.C., στην περιοχή της Χαλάστρας (Ν. Θεσσαλονίκης) και μεταφέρθηκαν σε διογκωμένο πολυστυρένιο εντός τριών ωρών, ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η επιβάρυνση των ατόμων, στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο όπου αποθηκεύθηκαν στους 5 °C.

2.3. Μικροβιολογική ανάλυση

2.3.1. Μικροβιολογικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK). Το Iron Agar (IA) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram *et al.* (1987) και περιείχε τα παρακάτω (Πιν. 2.1) σε (gL⁻¹):

Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις συστατικώνγια την παραγωγή ΙΑ

Συστατικά	Συγκέντρωση
Peptone	20
Meatextract	3,0
Yeastextract	3,0
Ferriccitrate	3,0
sodiumthiosulphate	0,3
NaCl	5 g
L-cysteine	0,6
Agar	14
pH	7,4

Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim,Germany).

2.3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Το Tryptic Soy Agar περιέχει προϊόντα πέψης του αλεύρου σόγιας και καζεΐνη, καθιστώντας το κατάλληλο για την ανάπτυξη μιας ευρείας ποικιλίας απαιτητικών και nonfastidious μικροοργανισμών (Foods 2001, Jorgensen *et al.* 2015, MacFaddin 1985). Ο συνδυασμός από πεπτόνες σόγιας και καζεΐνης παρέχουν οργανικό άζωτο (N) υπό τη μορφή αμινοξέων και πολυπεπτιδίων, κάνοντας το μέσο ιδιαίτερα θρεπτικό. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) προστίθεται για να διατηρηθεί η οσμωτική ισορροπία. Το Agar είναι ο παράγοντας στερεοποίησης. Αυτό το μέσο ανάπτυξης για όλες τις χρήσεις χρησιμεύει ως βάση για άλλα σκευάσματα μέσωσων και μπορεί να συμπληρωθεί με αίμα για να δημιουργηθεί ένα πιο θρεπτικό μέσο για απαιτητικούς μικροοργανισμούς, ή με

αντιμικροβιακά για να παραχθεί ένα εκλεκτικό μέσο για συγκεκριμένες οργανισμούς από ένα μικτό δείγμα χλωρίδας. Η σύσταση του θρεπτικού αναλύεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Συγκεντρώσεις συστατικών για την παραγωγή TSA (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 προστέθηκαν 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.

❖ **Μέθοδος Spreading:**

1. Παρασκευάστηκαν δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διαλύτη για να ληφθούν 30-300 CFU ανά πλάκα.
2. Ασηπτικά πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός στην επιφάνεια του θρεπτικού με 0,1 ml αναμειγνύοντας καλά το αραιωμένο δείγμα.
3. Χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη συσκευή διασκόρπισης, διανεμήθηκε το εμβολιασμένο δείγμα ομοιόμορφα πάνω από στην επιφάνεια του θρεπτικού.
4. Οι πλάκες επώαστηκαν αερόβια για 2 έως 3 ημέρες στους 25 °C.

2.3.1.2. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.*

Το *Pseudomonas Agar Base* έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε με την προσθήκη του κατάλληλου συμπληρώματος (SR0102 ή SR0103) το μέσο να γίνεται επιλεκτικό για *Pseudomonas aeruginosa* ή *Pseudomonas spp.* γενικά. Το βασικό μέσο είναι μια τροποποίηση του μέσου KingA Medium (King *et al.* 1954) στο οποίο είναι παρόντα το χλωριούχο μαγνήσιο και το θειικό κάλιο για να ενισχύσουν την παραγωγή χρωστικής.

Η πεπτόνη ζελατίνης και η καζεΐνη από ενζυματική πέψη παρέχουν το άζωτο, το θείο 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. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίν. 2.3).

Πίνακας 2.3 Συγκεντρώσεις συστατικών για την παραγωγή CFC (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

❖ Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 25,2 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκαν 500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 5ml γλυκερόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθεί το θρεπτικό. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C

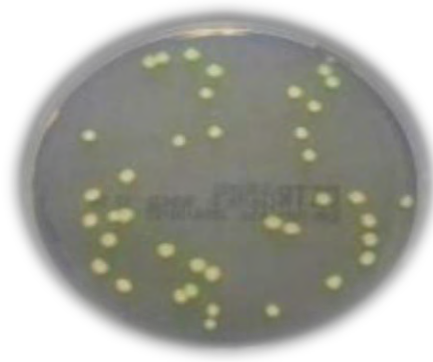
για 15 min. Το τελικό pH ήταν $7,1 \pm 0,2$ στους 25 °C. Στη συνέχεια το θρεπτικό αφέθηκε να κρυώσει σε υδατόλουτρο μέχρι τους 45 έως 50 °C και προστέθηκε ένα φιαλίδιο με εκλεκτικό υλικό CFC, αφού πρώτα διαλύθηκε σε 5 ml αποστειρωμένο νερό με 50 % αιθανόλη. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Αφέθηκε σε κατάσταση ηρεμίας ώστε να στερεοποιηθεί πλήρως στα τρυβλία και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 5-10 °C για μελλοντική χρήση.

❖ Τεχνική

Το CFC προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις ακόλουθες οδηγίες.

- Οι πλάκες απλώθηκαν ώστε να στεγνώσει η επιφάνεια.
- Ασηπτικά πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός στην επιφάνεια του θρεπτικού με 0,1 ml αναμειγνύοντας καλά το αραιωμένο δείγμα.
- Χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη συσκευή διασκόρπισης, διανεμήθηκε το εμβολιασμένο δείγμα ομοιόμορφα πάνω από στην επιφάνεια του θρεπτικού.
- Οι πλάκες επωάστηκαν αερόβια για 2 έως 3 ημέρες στους 25 °C.

Η ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp, σε θρεπτικό υλικό CFC παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικ.2.1).



Εικόνα 2.1 Ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp, σε θρεπτικό υλικό CFC

2.3.1.3. Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar. Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στην δράση των χολικών (biles) αλάτων 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 του δείκτη pH (Ουδέτερο κόκκινο, Neutralred). Ακολουθούν παρακάτω (Πίν. 2.4) τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού.

Πίνακας 2.4 Συγκεντρώσεις συστατικών για την παραγωγή VRBGA (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.

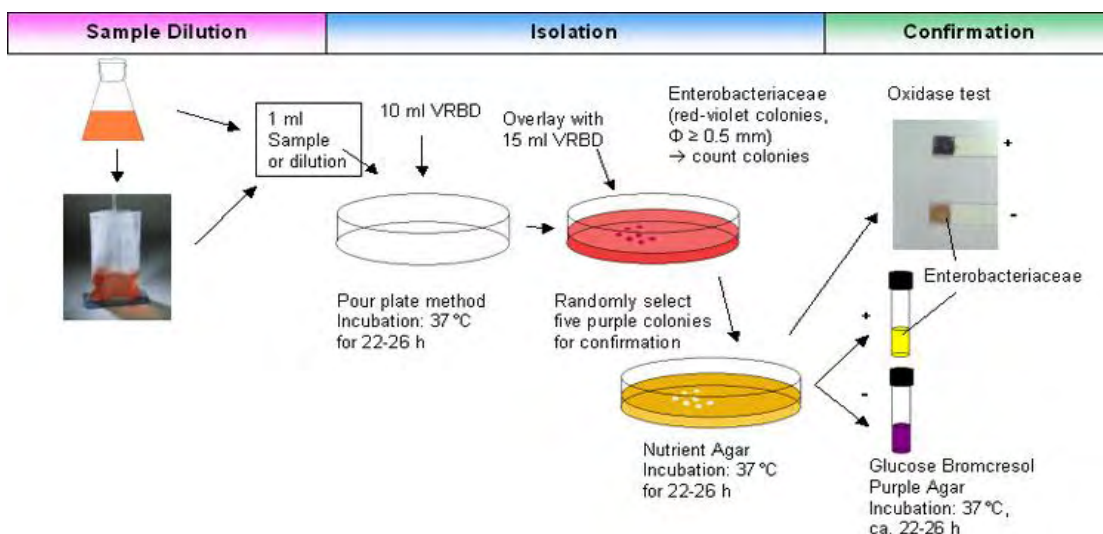
❖ Τεχνική

Παρασκευάστηκε μία σειρά αραιώσεων των δειγμάτων, έτσι ώστε τουλάχιστον ένα να συμπεριληφθεί, ώστε να αποδώσει 100-200 αποικίες από ένα κλάσμα του 1 ml. Μεταφέρθηκε 1 ml δείγματος από κάθε αραιώση προς 8 τρυβλία Petri με 2 πλάκες για κάθε αραιώση. Προστέθηκε το μέσου, δροσερό στους 47 °C. Ανακαινίστηκαν ελαφρά οι πλάκες 3 φορές δεξιόστροφα και 3 φορές κατά τη φορά του ρολογιού. Αφού το μέσο στερεοποιήθηκε επικαλύφθηκε με 10 ml του ίδιου μέσου και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία αντιστράφηκαν και επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες.

Η επικάλυψη άγαρ εξασφαλίζει αναερόβιες συνθήκες που καταστέλλουν την ανάπτυξη των μη ζυμωτικών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Επίσης, ενθαρρύνει τη ζύμωση της γλυκόζης η οποία ευνοεί το σχηματισμό των ευδιάκριτων μωβ αποικιών, που περιβάλλονται από ένα φωτοστέφανο μωβ-PNK. Παρακάτω, παρουσιάζεται η ανάπτυξη βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* σε θρεπτικό υλικό VRBGA (Εικ. 2.2.) και η διαδικασία απομόνωσης των συγκεκριμένων βακτηρίων (Εικ. 2.3).



Εικόνα 2.2 Ανάπτυξη βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* σε θρεπτικό υλικό VRBGA



Εικόνα 2.3 Σχηματική απεικόνιση του τρόπου απομόνωσης των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae

2.3.1.4. Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Το σκεύασμα MRS αναπτύχθηκε από τους de Man, Rogosa και Sharpe (de Man, *et al.* 1960) το 1960 για να αντικαταστήσει μία μεταβλητή συνιστώσα (χυμός ντομάτας) και, συγχρόνως, να προσφέρει ένα μέσο το οποίο θα υποστηρίξει καλή ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ακόμη και εκείνα τα στελέχη τα οποία παρουσίαζαν φτωχή αύξηση στα υφιστάμενα μέσα. Το MRS είναι ανώτερο από το μέσο χυμού ντομάτας Briggs και το εκχύλισμα κρέατος χυμού ντομάτας de Man. Δίνει τη δυνατότητα άφθονης ανάπτυξης όλων των στελεχών γαλακτοβακίλλων, ιδιαίτερα στελέχη δύσκολης και αργής ανάπτυξης όπως *Lactobacillus brevis* και *Lactobacillus fermenti*.

Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) 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, ενώ το τελικό pH είναι 6.5 ± 0.2 στους 25 °C. Τα συστατικά παρασκευής του θρεπτικού υλικού παρασιάζονται στον Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5 Συγκεντρώσεις συστατικών για την παραγωγή VRBGA (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 $6,4 \pm 0,2$ και στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

❖ **Τεχνική**

Παρασκευάστηκε μία σειρά αραιώσεων των δειγμάτων, έτσι ώστε τουλάχιστον ένα να συμπεριληφθεί, ώστε να αποδώσει 100-200 αποικίες από ένα κλάσμα του 1 ml. Μεταφέρθηκε 1 ml δείγματος από κάθε αραιώση προς 8 τρυβλία Petri με 2 πλάκες για κάθε αραιώση. Προστέθηκε το μέσο, δροσερό στους 35 °C. Ανακαινίστηκαν ελαφρά οι πλάκες 3 φορές δεξιόστροφα και 3 φορές κατά τη φορά του ρολογιού. Αφού το μέσο στερεοποιήθηκε επικαλύφθηκε με 10 ml του ίδιου μέσου και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία αντιστράφηκαν και επώαστηκαν στους 25 °C για 72 ώρες. Στην Εικόνα 2.4 παρουσιάζεται η ανάπτυξη των βακτηρίων σε MRS.



Εικόνα 2.4 Ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό MRS

2.3.1.5. Υδροθειούχα βακτήρια

Το Iron Agar παρασκευάστηκε σύμφωνα με τους *Gram et al.* (1987). 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 (H/C) αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$) ανάγεται προς υδρόθειο (H_2S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου Fe και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες. Στον Πίνακα 2.5 παρουσιάζονται τα συστατικά παρασκευής.

Πίνακας 2.5 Συγκεντρώσεις συστατικών για την παραγωγή MRS (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

❖ Τεχνική

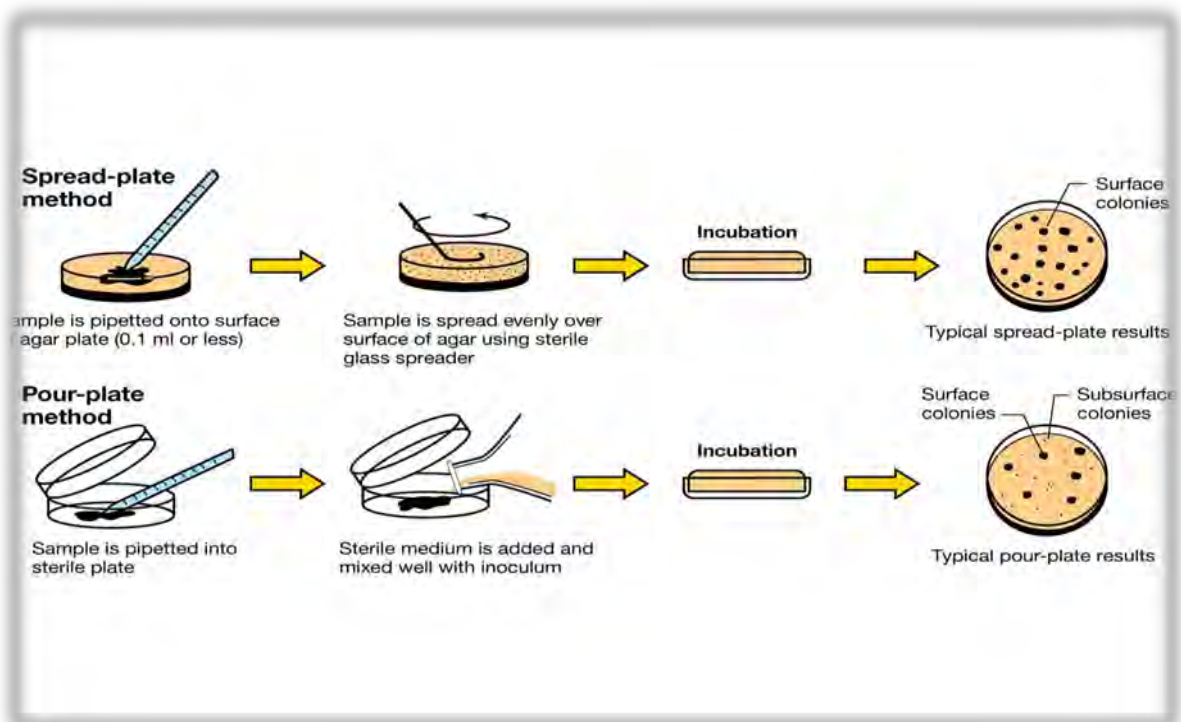
Παρασκευάστηκε μία σειρά αραιώσεων των δειγμάτων, έτσι ώστε τουλάχιστον ένα να συμπεριληφθεί, ώστε να αποδώσει 100-200 αποικίες από ένα κλάσμα του 1 ml. Μεταφέρθηκε 1 ml δείγματος από κάθε αραιώση προς 8 τρυβλία Petri με 2 πλάκες για κάθε αραιώση. Προστέθηκε το μέσου, δροσερό στους 35 °C. Ανακαινίστηκαν ελαφρά οι πλάκες 3 φορές δεξιόστροφα και 3 φορές κατά τη φορά του ρολογιού. Αφού το μέσο στερεοποιήθηκε επικαλύφθηκε με 10 ml του ίδιου μέσου και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία αντιστράφηκαν και επώαστηκαν στους 25°C για 48 ώρες.

2.4. Μικροβιολογική ανάλυση του ιστού των καβουριών

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν διπλά δείγματα σάρκας των 5g, από δύο διαφορετικά καβούρια ($n=2 \times 2=4$), μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, προστίθονταν 45 ml Maximum Recovery Diluent (MRD-NACL 0,85% και 0,1% Peptone) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (BugMixer, Interscience, London, UK). Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν α) Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός σε TSA (Tryptone Soy Agar) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48-72 ώρες, β) βακτήρια που παράγουν H₂S σε IA (Iron Agar), με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 ώρες, γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες, δ)

Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar (Mann, Rogosa, Sharpe agar), με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25 °C για 48-72 ώρες, ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC *Pseudomonas* Agar (Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine agar) με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25 °C για 48 ώρες. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, ενώ του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού, *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H_2S με την τεχνική της επίστρωσης (Εικ. 2.5).



Εικόνα 2.5 Μέθοδος επίστρωσης και ενσωμάτωσης σε τρυβλίο

2.5. Προσδιορισμός του χρόνου απόρριψης

Η οργανοληπτική εξέταση πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων με βάση τα κριτήρια αρεσκείας που περιγράφονται στον Πίνακα 2.6. Οι κριτές (panel) αποτελούνταν από τρεις (3) άτομα. Κάθε προϊόν απορρίπτονταν όταν οι τρεις (3) κριτές από τους τρεις κριτές (3) το αξιολογούσαν ως ακατάλληλο (υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό) για κατανάλωση. Η βαθμολογία για κάθε χαρακτηριστικό προέκυψε από τους μέσους όρους των τρεις (3) κριτών.

Πίνακας 2.6 Κριτήρια αρεσκείας για την αξιολόγηση της ποιότητας με τις αισθήσεις σε καβούρια

Χαρακτηριστικά	3 ΒΑΘΜΟΙ (Άριστο)	2 ΒΑΘΜΟΙ (Υποβαθμι-σμένο αλλά αποδεκτό)	1 ΒΑΘΜΟΣ (Αλλοιωμένο, μη αποδεκτό)
Εμφάνιση	Μπλε δαγκάνες έντονο άσπρο στην κοιλιακή χώρα γυαλιστερό	Θαμπό, ξεθωριασμένο,	Εξαιρετικά θαμπό, ξεθωριασμένο, σάπιο, αλλοίωση στις δαγκάνες
Συνεκτικότητα καβουκιού	Σφικτό	Αρκετά μαλακό	Πολύ μαλακή, διαλύεται
Οσμή	Έντονα θαλασσινή	Δυσάρεστη	Πολύ δυσάρεστη

2.6. Μέτρηση pH

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH της σάρκας των καβουριών ανά τακτά χρονικά διαστήματα (δύο ημέρες) κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ως μέτρηση pH ορίστηκε η μέτρηση που λαμβάνονταν κατά την πρώτη αραίωση του ομογενοποιημένου δείγματος. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού πεχάμετρου, τύπου pH 730 ino Lab WTW GmbH series (Weilheim, Germany), πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της πρώτης αραίωσης 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.

2.7. Χημική ανάλυση

2.7.1. Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)

Ποσότητα 10 g δείγματος ομογενοποιούνταν σε συσκευή τύπου Stomacher με 50 ml διαλύματος τριχλωρο-οξικού οξέος 6 % για 2 min και κατόπιν ακολουθούσε διήθηση μέσω ηθμού Whatman No.1 σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Στη συνέχεια, ποσότητα 40 ml εις διπλούν του διηθήματος ($n=2$) με 6 ml NaOH 20 % οδηγούνταν σε αποστακτήρα τύπου Kjeldahl για απόσταξη μεθ'υδρατμών, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά Vyncke *et al.* (1987). Η δέσμευση των πτητικών βασικών αζωτούχων ουσιών πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 50 ml H_2BO_3 3 % και τέλος ακολουθούσε τιτλοδότηση με $N=0,05$ HCl. Η διαδικασία πραγματοποιούνταν εις διπλούν ($n=2 \times 2=4$). Τα υπόλοιπα 10 ml, ανά δοκιμή, χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της τριμεθυλαμίνης.

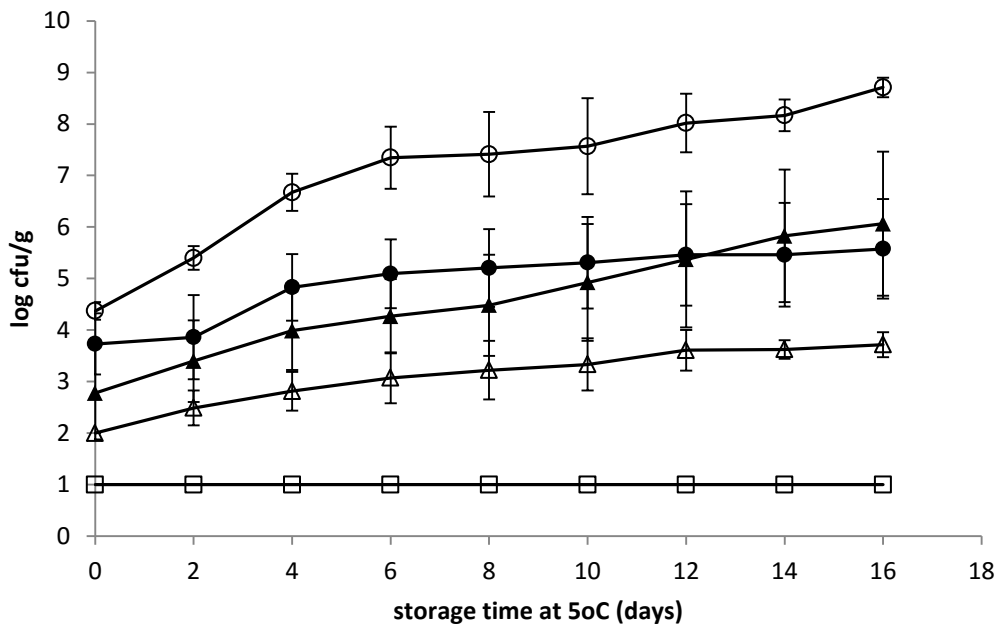
2.7.2 Προσδιορισμός Αζώτου Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) φασματοφωτομετρικά

Ποσότητα 1 ml από το υπόλοιπο διήθημα των 10 ml χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τριμεθυλαμίνης, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά Dyer (1945). Στο 1 ml του διηθήματος προστίθονταν 3 ml τουλουόλιο, 200 μl φορμόλης (φορμαλδεΰδη 40 %) και 500 μl KOH 90 % για την εξουδετέρωση των αζωτούχων ουσιών εκτός της τριμεθυλαμίνης. Ακολουθούσε ανάδευση του περιεχομένου σε vortex για 10 sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C) για 15 min. Στη συνέχεια, στο 1 ml από το εκχύλισμα με τη δεσμευμένη τριμεθυλαμίνη προστίθονταν 0,5 g NaSO₄ και 3 ml πικρικό οξύ 0,02 % σε τουλουόλιο. Ακολουθούσε ανάδευση του περιεχομένου σε vortex για 10sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιούνταν σε φασματοφωτόμετρο στα 410 nm. Για τον υπολογισμό της τριμεθυλαμίνης στα άγνωστα δείγματα, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για τα πέντε πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης σε τριμεθυλαμίνη 0, 0,05, 0,10, 0,15 και 0,20 mg TMA /ml TCA 6 %.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μικροβιολογική ανάλυση

Στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 3.1) παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που παρατηρήθηκαν κατά τη μικροβιακή ανάλυση του κρέατος των καβουριών, κατά τη συντήρησή τους στους 5 °C. Οι κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που επικράτησαν ανάμεσα στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς της μικροβιακής χλωρίδας ήταν αρχικά τα *Pseudomonas* spp., ακολούθησαν τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια, έπειτα τα Enterobacteriaceae και τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια.



Σχήμα 3.1 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX και των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε σάρκα καβουριού, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 5 °C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2Χ2=4) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών. Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), υδροθειούχα βακτήρια H₂S (▲), *Enterobacteriaceae* (Δ) και οξυγαλακτικά βακτήρια (□)

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν ταχύτερα έως την 12^η ημέρα είναι τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. και ακολουθούν τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Από την 13^η ημέρα και έπειτα παρατηρείται μία αύξηση της ανάπτυξης των υδροθειούχων, τα οποία και επικράτησαν τελικά έναντι των *Pseudomonas* spp.. Παρόλα αυτά, στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής (10^η ημέρα, 240 h), ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. είχε τις μεγαλύτερες τιμές καθιστώντας τον επικρατέστερο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό και υπεύθυνο για την υποβάθμιση των καβουριών.

Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών την αρχική ημέρα του πειράματος (ημέρα 0) ήταν 4,37, 3,73 και 2,78 log cfu/g για την OMX, τα *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια αντίστοιχα, τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμό 2 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρέμειναν κάτω του ορίου ανίχνευσης του 1,00 log cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp., οι οποίοι επικράτησαν έναντι της υπόλοιπης μικροχλωρίδας έφτασαν τις τιμές των 5,31 log cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής των καβουριών (10^η ημέρα), ενώ κατά την τελική μέτρηση του πειράματος (16^η ημέρα) έφτασε στους 5,58 log cfu/g.

Ο επόμενος κυρίαρχος πληθυσμός των υδροθειούχων (H₂S) βακτηρίων, έφτασε τους 4,93 log cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής (ημέρα 10 ή 240 h) και 6,07 log cfu/g στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

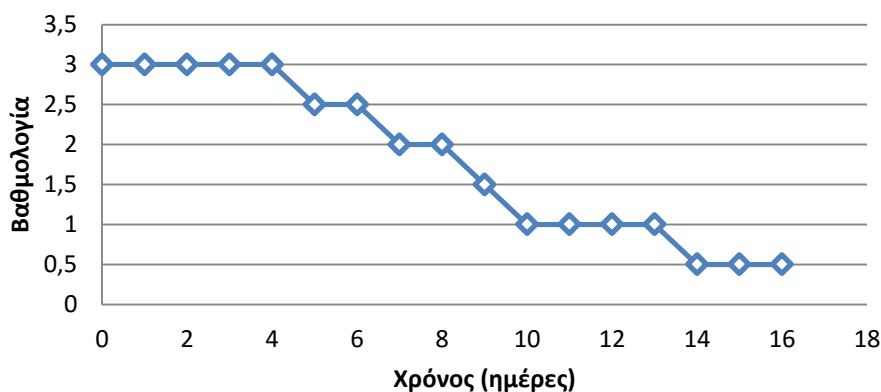
Στη συνέχεια, όσον αφορά τα Enterobacteriaceae έφτασαν σε πληθυσμό τους 3,34 log cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής ενώ, στη τελική μέτρηση της πειραματικής διαδικασίας έφτασαν τα 3,72 log cfu/g.

Όσον αφορά τώρα τα Οξυγαλακτικά βακτήρια, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης του 1.00 log cfu/g.

Τέλος, η ολική μικροβιακή χλωρίδα στην αρχή του πειράματος ήταν στους 4.37 log cfu/g. Στο τέλος όμως του εμπορικού χρόνου ζωής των καβουριών έφτασε τους 7,57 log cfu/g, ενώ στο πέρας του πειράματος άγγιξε τους 8,71 log cfu/g.

3.2. Εκτίμηση του χρόνου απόρριψης

Τα καβούρια που αλιεύθηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο κατά την αρχική ημέρα της πειραματικής διαδικασίας χαρακτηρίστηκαν στο μέγιστο βαθμό φρεσκότητα (3) ως άριστα. Τα καβούρια έπειτα αποθηκεύθηκαν στους 5 °C και παρέμειναν σε άριστη οργανοληπτική κατάσταση έως την 4^η ημέρα. Στη συνέχεια, η ποιότητα των καβουριών άρχισε να υποβαθμίζεται παίρνοντας την αξιολόγηση των 2,5 βαθμών την 5^η και την 6^η ημέρα, τους 2 βαθμούς την 7^η ημέρα και 8^η ημέρα, ενώ βαθμολογία 1-1,5 έλαβαν τα καβούρια κατά την 9^η και 10^η ημέρα όπου και απορρίφθηκαν. Στο Σχήμα 3.2 εμφανίζεται η βαθμολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των καβουριών.



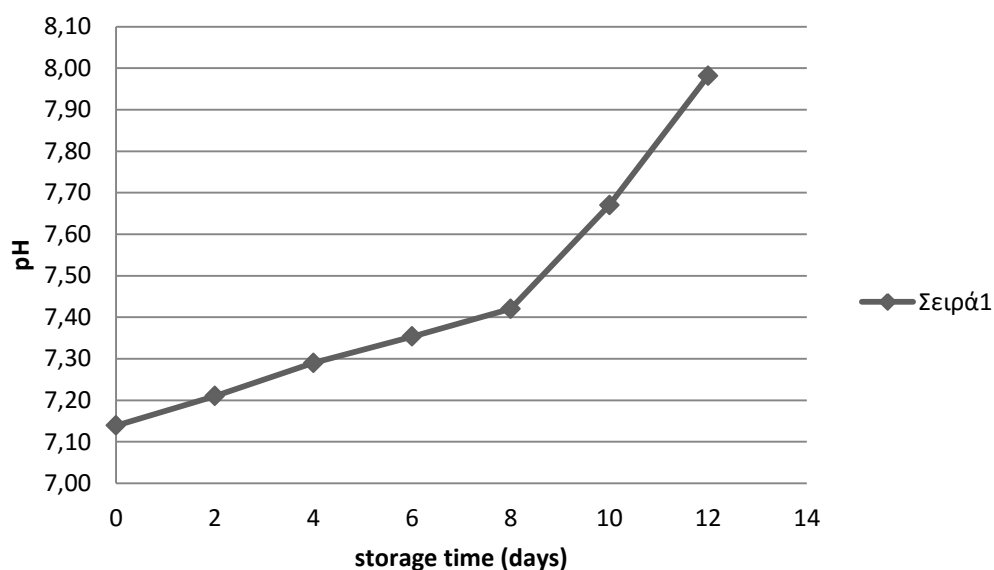
Σχήμα 3.2 Μεταβολή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των καβουριών με βάση τη βαθμολογία τριών (3) κριτών

3.3. Προσδιορισμός του pH

Τα καβούρια μελετήθηκαν με σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ενεργούς οξύτητας (pH). Πραγματοποιήθηκε μέτρηση όλων των ατόμων καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Πιν. 3.1) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.3.

Πίνακας 3.1 Τιμές pH στη σάρκα του καβουριών κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 5 °C.

Χρόνος (ημέρες)	pH
0	7,14
2	7,21
4	7,29
6	7,35
8	7,42
10	7,67
12	7,98
14	8,02
16	8,13



Σχήμα 3.3 Μεταβολή τιμών pH στη διάρκεια των πειραματικών αναλύσεων

Κατά την αρχική ημέρα της πειραματικής διαδικασίας οι τιμές pH κυμαίνονταν στο 7,14. Με το πέρας των ημερών και την αλλοίωση των ατόμων οι τιμές άρχισαν να αυξάνονται αγγίζοντας την τιμή του 7,67 στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής (10^η ημέρα) των καβουριών, ενώ κατά την τελευταία μέτρηση (16^η ημέρα) η τιμή έφτασε το 8,13. Παρατηρούμε μία έντονη αύξηση της τιμής pH προς το τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής και έπειτα.

3.4. Προσδιορισμός του συνόλου των πτητικών βάσεων (TVB-N, TMA)

3.4.1. Προσδιορισμός TVB-N

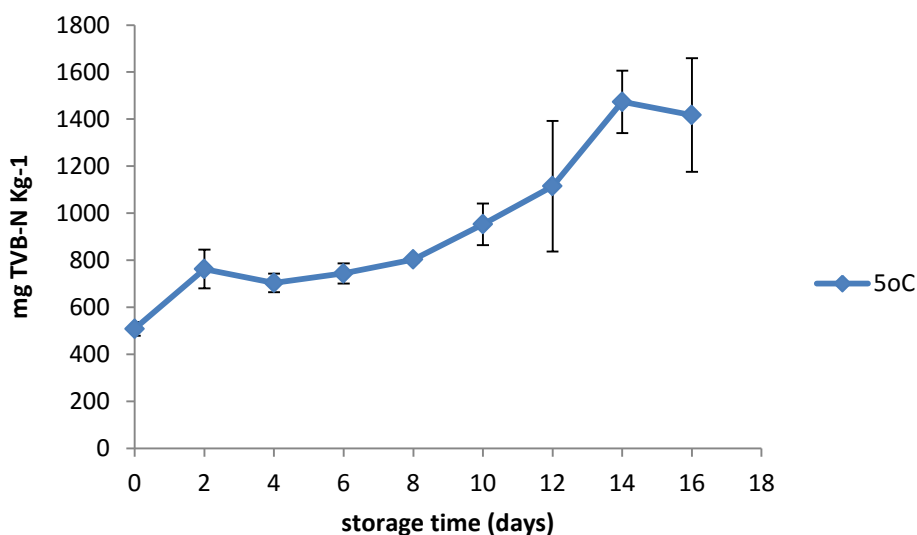
Κατά τη διάρκεια της πειραματικής εργασίας μελετήθηκε το Ολικό Πτητικό Βασικό Άζωτο TVB-N με σκοπό τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων στα καβούρια του είδους *Callinectes sapidus*. Οι συγκεντρώσεις του ολικού πτητικού βασικού αζώτου TVB-N μετρήθηκαν σε mgKg⁻¹ σάρκας καβουριού, n=2x2=4 και οι τιμές που καταγράφηκαν στα υπό μελέτη άτομα κατά τη διάρκεια της συντήρησης τους στους 5 °C, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 3.2).

Πίνακας 3.2 Μεταβολές στο TVB-N (μ.ο. ± τυπ.αποκλ), σε mgKg⁻¹

Χρόνος (ημέρες)	Συγκέντρωση (mgKg ⁻¹)
0	507,92 ± 28,82
2	762,16 ± 82,29
4	703,36 ± 39,23
6	743,96 ± 42,74
8	802,76 ± 12,58
10	952,56 ± 88,46

12	1114,96 ± 277,82
14	1473,36 ± 133,20
16	1417,36 ± 241,18

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα διάγραμμα (Σχ. 3.4) με την απεικόνιση της μεταβολής του TVB-N στα καβούρια από την αρχή του πειράματος μέχρι την τελική μέτρηση.



Σχήμα 3.4 Μεταβολή στο ολικό πτητικό βασικό άζωτο TVB-N (μ.ο. ± τυπ.αποκλ., mg Kg⁻¹ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) σε συντήρηση στους 5 °C.

Οι τιμή του TVB-N στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας των ήταν $507,92 \pm 28,82$ mgKg⁻¹ κρέατος. Έπειτα, με την υποβάθμιση του ιστού των καβουριών τα επίπεδα του TVB-N αυξήθηκαν και η τιμή του έφτασε στα $952,56 \pm 88,46$ mgKg⁻¹ στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής και στα $1417,36 \pm 241,18$ mgKg⁻¹. Παρατηρήθηκε

μία ολοένα και αυξανόμενη συγκέντρωση TVB-N όσο το καβούρια αλλοιώνονταν, καθιστώντας τον έναν καλό δείκτη ποιότητας.

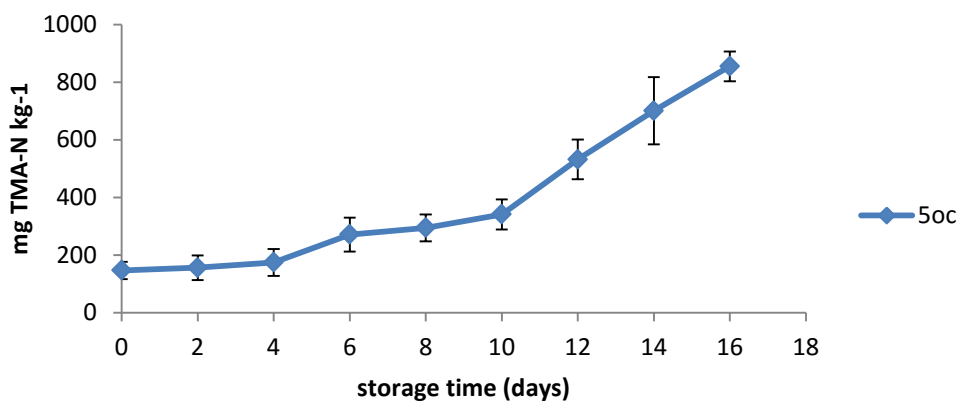
3.4.2. Προσδιορισμός TMA-N

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήθηκε για την χημική ανάλυση του κρέατος των καβουριών και των προσδιορισμό του εμπορικού του χρόνου ζωής ήταν το άζωτο τριμεθυλαμίνης TMA-N. Οι συγκεντρώσεις που καταγράφηκαν κατά την πειραματική διαδικασία παρουσιάζονται παρακάτω (Πιν. 3.3).

Πίνακας 3.3 Μεταβολές του άζωτου τριμεθυλαμίνης TMA-N (μ.ο. ± τυπ.απ., mgKg⁻¹ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) σε συντήρηση στους 5 °C.

Χρόνος (ημέρες)	Συγκέντρωση (mgKg ⁻¹)
0	146,88 ± 30,13
2	156,53 ± 42,53
4	174,70 ± 46,61
6	271,51 ± 58,64
8	294,51 ± 46,99
10	341,25 ± 52,34
12	531,90 ± 69,18
14	700,67 ± 116,63
16	854,60 ± 51,35

Στη συνέχεια, δίνεται ένα διάγραμμα (Σχήμα 3.5) με την γραφική απεικόνιση της μεταβολής των τιμών TMA-N ώστε να παρατηρηθεί καλύτερα η ανοδική τους πορεία.



Σχήμα 3.5 Μεταβολή τιμών του TMA-N (μ.ο. ± τυπ. απ., mgKg⁻¹ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 5°C.

Αρχικά οι η συγκέντρωση του αζώτου τριμεθυλαμίνης κυμαινόταν στα $146,88 \pm 30,13$ mgKg⁻¹. Όσο όμως, εξασθενούσε ο εμπορικό χρόνος ζωής των ατόμων του *Callinectes sapidus*, παρατηρήθηκε μία ραγδαία ανάπτυξη, ειδικά μετά το πέρας της απόρριψης του. Συγκεκριμένα παρατηρούμε πως στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής των καβουριών οι τιμές αγγίζουν τα $341,25 \pm 52,34$ mgKg⁻¹, ενώ στο τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε να έχουν μία απότομη και ραγδαία ανάπτυξη αγγίζοντας τα $854,60 \pm 51,35$ mgKg⁻¹.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τον προσδιορισμό των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών με σκοπό την εκτίμηση της ποιότητας και του εμπορικού χρόνου ζωής των μπλε καβουριών αποθηκευμένων στους 5 °C.

Σύμφωνα με την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των καβουριών, τα οποία ήταν αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες στους 5 °C, ο εμπορικός χρόνος ζωής αυτών προσδιορίστηκε στις δέκα (10) ημέρες. Σύμφωνα με Sarnoski (2007), τα καβούρια άρχισαν να αλλοιώνονται ραγδαία από την 9^η ημέρα και μετά υπό συνθήκες συντήρησης στους 4 °C. Επίσης, οι Slattery et al. (2014) αναφέρουν σε γαρίδες αποθηκευμένες σε θερμοκρασία 4 °C υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα, η φρέσκια μυρωδιά άρχισε να χάνεται από την 9^η ημέρα ενώ η δυσάρεστη μυρωδιά δεν ήταν έντονη μέχρι και την 16^η ημέρα. Ακόμη, οι Lorentzen *et al.* (2015), βρήκαν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής των μαγειρεμένων καβουριών του είδους *Chioneocetes opilio* αποθηκευμένων στους 4 °C διήρκεσε 10 ημέρες ενώ σε θερμοκρασία 0 °C, 14 ημέρες. Τέλος, οι Maibaum, *et al.* (2000) διεξήγαγαν ένα πείραμα σχετικά με την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής του μπλέ καβουριού χρησιμοποιώντας γαλακτικό οξύ, γαλακτικό νάτριο και παρατήρησαν ότι τα καβούρια μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως καλής ποιότητας μέχρι τη 10^η ημέρα, ενώ ως απλά αποδεκτά μέχρι και την 14^η ημέρα.

Αντίθετα οι Losada *et al.* (2006) και οι Aubourg *et al.* (2007) αναφέρουν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής της караβίδας υπό συνθήκες ψύξης (0 °C) ήταν επτά (7) ημέρες, λόγω απόρριψης με βάση την οσμή και το χρώμα (ανάπτυξη μελανωμάτων). Επίσης, σύμφωνα με τον Αναγνωστόπουλος (2015), βρέθηκε ότι σε θερμοκρασία 10 °C το μπλε καβούρι χαρακτηρίστηκε ως μη αποδεκτό την 6^η ημέρα συντήρησης.

Ακόμη, σύμφωνα με τους Boziaris *et al.* (2011), ο εμπορικός χρόνος ζωής της καραβίδας Νορβηγίας (*Nephrops norvegicus*) υπό συνθήκες ψύξης (0 °C), εκτιμήθηκε στις τέσσερις (4) ημέρες, πιθανώς λόγω της ταχύτερης ανάπτυξης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και της εντονότερης ενζυμικής δράσης κυρίως αυτών που προκαλούν την ενζυμική αμάρωση στο κέλυφος.

Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, η ανάπτυξη των οποίων οδηγεί στην μικροβιακή αλλοίωση των καβουριών, βρέθηκε ότι οι επικρατέστεροι είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχο–παραγωγά (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Ειδικότερα, οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των προαναφερθέντων καβουριών ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., με δεύτερα επικρατέστερα τα υδροθειούχο–παραγωγά (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), με πληθυσμούς, την ημέρα απόρριψης των καβουριών (ημέρα 10), 5,85 log₁₀cfu/g και 5 log¹⁰cfu/g αντίστοιχα, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης (ημέρα 12, 288h), τα υδροθειούχο–παραγωγά (H₂S) βακτήρια ξεπέρασαν σε πληθυσμό αυτά των *Pseudomonas* spp με τις τιμές να κυμαίνονται σε 6,92 και 6,53 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τους Boziaris *et al.* (2011), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp είναι ο επικρατέστερος αλλοιογόνος μικροοργανισμός στις καραβίδες Νορβηγίας υπό συνθήκες ψύξης (0 °C), με τιμή της τάξης των 5x10³ cfu g⁻¹, ενώ ακολουθούν τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp έχει αναφερθεί ότι είναι ο κύριος μικροοργανισμός αλλοίωσης των ψαριών που αλιεύονται στα ελληνικά εύκρατα νερά (Koutsoumanis & Νυχάς 1999, Koutsoumanis & Νυχάς 2000, Koutsoumanis *et al.* 2000, Παπαδόπουλος *et al.* 2003, Parlapani *et al.*

2013, 2014, 2015a, b,). Οι παραπάνω ερευνητές αναφέρουν ότι τα υδροθειούχο – παραγωγά βακτήρια και τα Enterobacteriaceae είναι συνήθως οι δεύτεροι και τρίτοι, πιο σημαντικοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης, μετά τα *Pseudomonas* spp. Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας κάτι τέτοιο φαίνεται να ισχύει και για τα καβούρια, ωστόσο λαμβάνοντας υπόψιν τον πληθυσμό της OMX (ο οποίος βρέθηκε 2 log μεγαλύτερος σε σχέση με τους κύριους αλλοιωγόνους), φαίνεται ξεκάθαρα ότι οι κυριότεροι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί αποτέλεσαν ένα μικρό κλάσμα της OMX, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της (περίπου 90%) δεν αντιστοιχούσε σε κανέναν από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Για το λόγο αυτό, έγινε απομόνωση των μικροοργανισμών της OMX με σκοπό την μελλοντική ταυτοποίησή τους και τελικά την διελεύκανση του επικρατέστερου αλλοιωγόνου μικροοργανισμού. Επιπλέον, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. έχουν χαρακτηριστεί ως οι EAM 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, 2014, 2015a, b, c), ενώ τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια αποτελούν τους EAM σε ιχθύες όπως ο γάδος, που προέρχονται από Βόρειες θάλασσες και συντηρούνται στους 0 °C (Gram et al. 1987, Jørgensen & 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, Koutsoumanis 2002, Parlapani et al. 2013, 2014, 2015a, b, c, Tryfinopoulou et al. 2007). Κάτι παρόμοιο δεν μπορεί να ειπωθεί για τα καβούρια διότι, όπως προαναφέρθηκε, τα *Pseudomonas* spp. και οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί που

μελετήθηκαν αποτέλεσαν ένα μικρό κλάσμα της OMX (<10%) στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, πράγμα το οποίο δείχνει ότι τα καβούρια αλλοιώθηκαν από άλλους μικροοργανισμούς (EAM) οι οποίοι δεν ελήφθησαν υπόψιν (βάση βιβλιογραφίας) στην συγκεκριμένη εργασία.

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 είναι πιο αξιόπιστο από τα προαναφερόμενα (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 & Huss 1996, Ólafsdóttir *et al.* 1997). Στην παρούσα μελέτη, το TVB-N στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, κατέγραψε 507,92 mg/kg σάρκας καβουριού, την ημέρα απόρριψης η τιμή αυξήθηκε στα 1527,96 mg/kg, ενώ στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας η ποσότητα αυτή έφτασε τα 2335,76 mg/kg σάρκας καβουριού. Παρόμοιο προφίλ αύξησης παρουσίασε και το TMA-N καθ'όλη τη διάρκεια της συντήρησης, φθάνοντας τα επίπεδα των $1024,9 \pm 179,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το TVB-N και το TMA-N μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης των καβουριών. Αντίθετα, σύμφωνα με τους Sidhu *et al.* (1974) οι τιμές του TVB-N για τις καραβίδες υπό συνθήκες ψύξης (0 °C) κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, φθάνοντας στα 500 mg/kg την ένατη (9^η) ημέρα. Σε άλλο πείραμα των Sidhu *et al.* (1974), η τιμή του TVB-N σε καραβίδες αποθηκευμένες σε υψηλή θερμοκρασία (20 °C) ήταν πολύ υψηλή μόλις την τρίτη (3^η) ημέρα

αποθήκευσης (3000 mg/kg). Άλλες μελέτες (Losada *et al.* 2006, Aubourg *et al.* 2007) έδειξαν ότι η τιμή του TVB-N σε καρκινοειδή που συντηρούνται κάτω από 5 °C, δεν ξεπερνά τα 500 mg/kg μετά από εννέα (9) ημέρες, ενώ σε συνθήκες συντήρησης υψηλών θερμοκρασιών, η τιμή του TVB-N είναι πολύ υψηλή από τις πρώτες μέρες συντήρησης (Boziaris *et al.* 2011, Losada *et al.* 2006).

Σε μελέτες που αφορούν τον προσδιορισμό του TVB-N στους ιχθύες, 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 μπαρμπούνι 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.

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 των ιχθύων (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 τιμή $7,14 \pm 0,02$ στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, $7,67 \pm 0,09$ την ημέρα απόρριψης ενώ αυξήθηκε με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας καταγράφοντας τιμή $8,13 \pm 0,09$. Η αύξηση του pH κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του καβουριού μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή TVB-N. Η ταχεία αύξηση και τα υψηλά επίπεδα του pH στους 5 °C προκαλείται από την ταχύτερη παραγωγή TVB-N που συμβαίνει σε αυτή τη θερμοκρασία σε σχέση με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες

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 $6,41 \pm 0,01$ και $6,50 \pm 0,02$, αντίστοιχα, ενώ στο τέλος τους 14 ημερών οι τιμές έφτασαν τα $6,52 \pm 0,02$ και $6,57 \pm 0,02$, 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 $6,20 \pm 0,05$ και την ημέρα 24 η τιμή αυτή έφτασε τα $6,60 \pm 0,03$, ενώ οι Kyrana & Lougonois (2002) υποστηρίζουν πως το pH για ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού υπό πάγο, ήταν $6,39 \pm 0,04$ (ημέρα 1) και στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης (ημέρα 12) η τιμή αυτή έφτασε τα $6,69 \pm 0,04$.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι προφανές ότι τα καβούρια και γενικότερα τα καρκινοειδή, καταγράφουν υψηλότερες τιμές TVB-N-άρα και TMA-N και pH- από τους ιχθύες καθ όλη την διάρκεια της συντήρησης γεγονός που οφείλεται

στο γεγονός ότι στα καρκινοειδή, όταν πεθαίνουν, λαμβάνει χώρα μία ραγδαία αλλοίωση σε συντομότερο χρονικό διάστημα από ότι στα ψάρια.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν πως οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν στα καβούρια υπό αερόβιες συνθήκες συντήρησης σε θερμοκρασίες ψύξης (5 °C), είναι κατά κύριο λόγο άγνωστα βακτήρια τα οποία οι πληθυσμοί τους δεν προσδιορίστηκαν (περίπου το 90 % της OMX), καθώς και τα *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια τα οποία βρέθηκαν σε υψηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν (οξυγαλακτικά, Enterobacteriaceae). Επιπρόσθετα, το TVB-N και το TMA-N αυξάνονταν καθ'όλη τη διάρκεια της συντήρησης επιδυνκύνοντας ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύ καλούς δείκτες αλλοίωσης των μπλε καβουριών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος, ο εμπορικός χρόνος ζωής των καβουριών του είδους *Callinectes Sapidus* τα οποία ήταν αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες συντήρησης στους 5 °C είναι δέκα (10) ημέρες. Οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, από αυτούς που μελετήθηκαν, στη σάρκα του υπό εξέταση καρκινοειδούς είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., ακολουθούμενα από τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν τον πληθισμό της OMX (ο οποίος βρέθηκε 2 log μεγαλύτερος σε σχέση με τους κύριους αλλοιωγόνους), φαίνεται ξεκάθαρα ότι οι κυριότεροι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί αποτέλεσαν ένα μικρό κλάσμα της OMX, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της (περίπου 90%) δεν αντιστοιχούσε σε κανέναν από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Για το λόγο αυτό, έγινε απομόνωση των μικροοργανισμών της OMX με σκοπό την μελλοντική ταυτοποίησή τους και τελικά την διελεύκανση του επικρατέστερου αλλοιωγόνου μικροοργανισμού (EAM). Τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae, ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλότερους πληθυσμούς, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρέμειναν σταθερά κάτω από το όριο ανίχνευσης του 1 logcfu/g, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, η παραγωγή του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N) και του αζώτου της Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) στα πρώτα στάδια της αποθήκευσης είναι σχετικά χαμηλή, ενώ αυξάνεται ουσιαστικά από τα μέσα της αποθήκευσης, έχοντας πολύ υψηλή τιμή στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Συνεπώς το TVB-N και το TMA-N αποτελούν αξιόλογους δείκτες για την αποδοχή ή μη των μπλε καβουριών και επαρκούν για να χαρακτηρίσουν την νωπότητα και την ποιότητα των προϊόντων αυτών. Η θερμοκρασία 5°C αποδείχθηκε ένα σχετικά καλό μέσο διατήρησης

των καβουριών, σε βάθος ημερών πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τόσο οι ενζυμικές όσο και οι χημικές αντιδράσεις, καθώς και η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνθηκαν παρατείνοντας έτσι την υποβάθμιση της ποιότητας των καβουριών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, M.R and Moss, M.O. (1995) Microbiology of primary food commodities. *In Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry, 103-135.

Akpan EJ. (1997) Proximate composition of edible blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Food Sci.Technol.* 1, 34:59-60.

Ashie, I. N. A., Smith, J. P. and 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.

Barker Jr, W.H. and Bang, F.B. . (1966) The effect of infection by gram-negative bacteria, and their endotoxins, on the blood-clotting mechanism of the crustacean *Sacculina carcini*, a parasite of the crab *Carcinus maenas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8(1):88-97.

Boziaris, I., Kordila, A. and 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.

Buransompob, A., et al. (2003) Rancidity of walnuts and almonds affected by short time heat treatments for insect control. *J. Food Process. Pres.* 2003, 27:445–464.

Cann D.C. (1976) Bacteriology of shellfish with reference to international trade, in Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. [ed.] Ministry of Overseas Development. Tropical Products Institute, 377-94.

Çelik, M., et al. (2004) Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the North Eastern Mediterranean. *Food Chem.* 2004, 88:271-273.

Dalgaard, P. (2003) Spoilage of Seafood. *Elsevier Science Ltd/ Academic Press.*

de Man, J.C., Rogosa, M. και Sharpe, M. E. (1960) *Appl. Bact.*, 23:130-135.

Dyerberg J. (1986) Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.* 44(4):125-134.

Encarta. (1997) Encarta 97 Encyclopedia World English Edition. Microsoft.

Enzeross, R., Enzeross, L. and Bingel, F. (1997) Occurrence of the blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) (Crustacea, Brachyura) on the Turkish Mediterranean and the adjacent Aegean coast and its size distribution in the bay of Iskenderun. *Turkish Journal of Zoology*, 21:113-122.

Farragut RN. (1965) Proximate composition of Chesapeake Bay blue crab (*Callinectes sapidus*). *J. Food Science*, 30:538-544.

Foods, APHA Technical Committee on Microbiological Methods for. (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4.

Gökođlu, N. and Yerlikaya, P. (2003) Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. *Food Chemistry*, 80:495-498.

Gram, L. and Huss, H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33:121-137.

Gram, L. (1996) The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 25:199-205.

—. **1996.** The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 25:199-205.

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. and Huss, H. H. (1987) Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 oC) and high (20 oC) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4:65-72.

Hill, K. (2004) [Online]. http://www.sms.si.edu/irlspec/callin_sapidu.htm..

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. [edit.] Organisation of the United Nations. *FAO Fisheries Technical Paper No. 348*.

Jay, J. M. (1986) Modern Food Microbiology. *Van Nostrand Reinhold*.

Jorgensen, J.H., et al. (2015) Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology*. 11.

King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. (1954) *J. Lab. & Clin. Med.*, 44:301-307.

Lorentzen, Grete, et al. (2015) Shelf life of snow crab clusters (*Chioneocetes opilio*) stored at 0 and 4 oC. *Food Control.*, 59:454-460.

M., Briggs. 1953. . *Dairy Res.*, 20:36-40.

MacFaddin, J.F. (1985) Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Bacteria . Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1.

Maibaum, J., Rahuel, J. and Rasetti, V. (2000) Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. *Chemistry and Biology*, 7:493-504.

Maibaum, J.R., et al. EXTENDED SELF LIFE OF FRESH BLUE CRAB MEAT WITH LACTATES. *Department Of Food Science.*

Nychas, G. J. E., et al. (2008) Meat spoilage during distribution. Elsevier, 78:77–89.

Oehlenschläger, J. (1997a) Suitability of ammonia-N, dimethylamine-N, trimethylamine-N, trimethylamine oxygen-N and total volatile basic nitrogen as freshness indicators in seafood. In: Olafsdottir G. et al. (eds.) Methods to determine the freshness of fish in research and industry. *International Institute of Refrigeration*, 92-99.

Oehlenschläger, J. (1992) Evaluation of some well established and some underrated indices for the determination of freshness and / or spoilage of ice stored wet fish. *Proceedings of the International Conference "Quality assurance in the fish industry"*. 339-345.

—. (1997b) Volatile amines as freshness/spoilage indicators. A literature review. In: Lutén J.B. et al. (eds.) *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*. Elsevier, 571-588.

Oscar, Martínez-Alvarez, Gómez-Guillén, María del Carmen and Montero, Pilar. (2008) Chemical and microbial quality indexes of Norwegian lobsters (*Nephrops norvegicus*) dusted with sulphites. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:1099–1110.

Ozogul, F., et al. (2000) A rapid HPLC-determination of ATP-related compounds and its application to herring stored under modified atmosphere. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 35:549–554.

Pancucci-Papadopoulou A., Kevrekidis, K., Corsini, M. & Simboura, N., (2005) Changes in species: invasion of exotic species. pp. 336-342. In: 'SoHelME. State of the Hellenic marine environment'. E. Papathanassiou & A. Zenetos (Eds). HCMR Publications, Athens

Parlapani F.F., Meziti A., Kormas Ar.K. & I.S. Boziaris (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.

Parlapani F.F., Malouchos A., Haroutounian S.A. & I.S. Boziaris (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., Kormas K.Ar. & I.S. Boziaris (2015). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under

various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* DOI 10.1002/jsfa.6957

Parlapani F.F., Haroutounian S.A., Nychas G-J.E & I.S. Boziaris (2015a). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2°C. *Food Microbiology* 50: 44-53.

Parlapani F.F., Verdos G.I., Haroutounian S.A. & I.S. Boziaris (2015b). The dynamics of *Pseudomonas* and volatiles during the spoilage of gutted sea bream stored at 2°C. *Food Control* 55:257-265.

Pedrosa-Menabrito, A. και Reginstein, J.M. (1987) Shelf life extension of fresh fish - a review Part I - spoilage of fish. *Journal of Food Quality*, 11:117-27.

Phillippy, B. Q. (1984) Characterization of the in situ TMAOse System of Red Hake Muscle, Ph.D. thesis, University of Massachusetts, Amherst.

Reilly, P.J.A. (1992) Salmonella and Vibrio cholerae in brackishwater cultured tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology*, 16:293-301.

Sarnoski, Paul J. (2007) Instrumental Methods for Determining Quality of Blue Crab (*Callinectes sapidus*) Meat. *Food Science and Technology*.

Serbetis, C. (1959) Un nouveau crustace comestible en Mer Egge *Callinectes sapidus* Rathbun (Decapoda Brach.)505-507. *Proceedings General Fisheries Council Mediterranean*, 5:505-507.

Shapiro, L. (2011) [Online] 2011. <http://eolspecies.lifedesks.org/pages/18927>.

Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K. and Rosnes, J.T. (2002) A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Sciences and Technology*, 7:107-27.

Slattery, S.L. and Palmer, P.J. (2014) Modified Atmosphere Packaging (MAP) for Control of Black Spot Formation in Chilled Prawns. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23(5): 475-488.

Steele, P. (1979) [Online]

http://research.myfwc.com/engine/download_redirection_process.asp?file=79steele_1436.pdf&objid=20754&dltype=publication..

Texas, P. and Wildlife. (2009) [Online].

<http://www.tpwd.state.tx.us/huntwild/wild/species/bluecrab/>.

(2005) The International Commission for Microbiological Specifications for Food. Fish and Fish Products. *Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities*. The International Commission for Microbiological Specifications for Food, 174-249.

The Official Compendia of Standards. USP-NF. *United States Pharmacopeial Convention*,.

Wheaton, FW and Lawson, TB. (1985) Processing Aquatic Food Products. *Wiley-Interscience*.

Whiteley, Nia and Taylor, Ted. (1986) Handling, Transport and Storage of Live Crabs and Lobsters.

Αναγνωστόπουλος, Δημήτρης. (2015) ΕΕμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus* στους 5οC. *Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*.

ABSTRACT

The aim of this work is to study the blue crab *Callinectes sapidus* stored at 5 ° C in order to evaluate their quality, monitoring of changes in sensory, microbiological and chemical characteristics and assess their shelf-life. The crabs were taken from the area of Halastra (south Thessaloniki) in February 2015 and stored at 5 oC, simulating the cooling conditions at their sales points. The measurements for monitoring the organoleptic, microbiological and chemical analyses (TVBN, TMA) were made at regular intervals (every two days).

The sensory evaluation showed that the crab's commercial shelf-life was ten (10) days. pH, which the initial value was 7,14, showed a substantial increase after the rejection time point, with the honor reaches at 7,16 while at the end of maintenance reached at 8,52. The microorganisms which played an important role during spoilage of crab and dominated in relation to the rest microbiota were *Pseudomonas* spp. and H₂S producing bacteria (including *Shewanella putrefaciens*). Enterobacteriaceae populations were not very high, while LAB remained below the detection limit of 1 log₁₀ cfu/g throughout the experiment. Aerobic Plate Counts reached the level of 7,57 log₁₀ cfu/g at the end of shelf life of blue crabs (day 10). TVB-N and TMA-N values increased substantially from the middle of storage, reaching a value of 952,56 and 341,2±52,34 mgN Kg⁻¹ at the end of shelf life (day 10), respectively, while at the end of storage period, values increased at 1417,36 Nmg/Kg⁻¹ and 854,6±51,36 mgN/Kg⁻¹ respectively.

The results of this study showed that the blue crab was declared unacceptable at the 10th day where *Pseudomonas* spp. and H₂S producing bacteria were the most

important population microorganisms, with the value not to overcome the level of 5 - 6 log cfu/g. At the end of shelf-life, the value of pH was 7.16, while the value of TVB-N and TMA-N reached the levels of 952,56 mgN/Kg-1 and 341,2±52,34 mgN/Kg-1 respectively.

Considering the above, it could be noticed that i) other unknown microorganisms maybe play a crucial role during blue crab spoilage and ii) TVB-N and TMA-N could be used as chemical indicators of blue crab's spoilage.

Keywords: Blue crab (*Callinectes Sapidus*), Specific Spoilage Organisms (SSOs), Shelf-life, Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N), Trimethylamine Nitrogen (TMA-N).