



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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**Π.Δ.Ε.**

**«Κινητική αύξησης και παραγωγή πτητικών μεταβολιτών στελεχών  
Pseudomonas απομονωμένων από τσιπούρα σε μοντέλο υπόστρωμα  
στους 0°C»**

**“Growth kinetics and volatile metabolites production of Pseudomonas strains  
isolated from gilt-head seabream, on model substrate stored at 0°C”**

**ΑΣΚΑ ΙΩΑΝΝΑ**

**ΒΟΛΟΣ, 2016**

**«Κινητική αύξησης και παραγωγή πτητικών μεταβολιτών στελεχών *Pseudomonas*  
απομονωμένων από τσιπούρα σε μοντέλο υπόστρωμα στους 0°C»**

### **Διμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- 1) **Ιωάννης Μποζιάρης (M.Sc., Ph.D.)**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
  
- 2) **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης (M.Sc., Ph.D.)**, Επίκουρος Καθηγητής, 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 πια δεν θα συνέλθει το δόγμα της αυτομάτου γενέσεως από το θανάσιμο χτύπημα που του κατέφερε αυτό το απλό πείραμα»**

(Στη θριαμβική του διάλεξη στη Σορβόνη το 1864, αναφερόμενος στο πείραμά του με φιάλη τύπου «λαιμού του κύκνου», που απέδειξε ότι οι μικροοργανισμοί που αλλοίωναν χυμούς και θρεπτικά διαλύματα δεν σχηματίζονταν μέσα σε αυτά αν δεν δημιουργήσουμε μια πύλη εισόδου για αυτούς)

*Αφιερώνεται*

*στον Τριανταφύλλου Μιχάλη,*

*Φύλακα Άγγελό μου...*

## ***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ***

*Φτάνοντας στο αποτέλεσμα μιας κοπιαστικής και μακροχρόνιας προσπάθειας με την συγγραφή της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, ολοκληρώθηκε ένας σημαντικός προσωπικός μου στόχος, γι' αυτό και θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.*

*Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής και εξαιρετικό Καθηγητή, 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. Τον ευχαριστώ που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με πολύ ενδιαφέροντα ερευνητικά θέματα καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Ευχαριστώ θερμά το μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου, κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του, καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.*

*Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την κα Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την αμέριστη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή της, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας, διαθέτοντας μέρος από τον πολύτιμο χρόνο της. Την ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία, την καλή παρέα και τις πολύ όμορφες στιγμές που περάσαμε αυτά τα χρόνια στο εργαστήριό μας.*

*Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές-συναδέλφους μου, Κρητικό Θάνο και Χαρούδη Αγγελική, για την άψογη συνεργασία και την αμοιβαία στήριξη που είχαμε κατά την ταυτόχρονη διεξαγωγή των πειραμάτων μας.*

*Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή του Γ.Π.Α. κ. Σέρκο Χαρουτουγιάν για την πολύτιμη βοήθειά του σε εξοπλισμό, υλικά και οτιδήποτε άλλο απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση των πειραμάτων με GC-MS.*

*Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς και τον αγαπημένο μου αδερφό, για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.*

*Τέλος, θα ήθελα να επισημάνω ότι η συγκεκριμένη εργασία αφιερώνεται σε ένα αγαπημένο μου πρόσωπο, τον Τριανταφύλλου Μιχάλη, που "έφυγε" άδικα πολύ νωρίς, αφήνοντάς μου μόνο όμορφες αναμνήσεις να θυμάμαι από εκείνον.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες, καθώς παρατηρείται μικροβιακή αύξηση και παραγωγή μεταβολιτών από τους Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα. Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν α) η παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών, β) η εκτίμηση των κυριότερων κινητικών παραμέτρων και γ) η μελέτη των παραγόμενων πτητικών μεταβολικών προϊόντων, με μοντέρνες αναλυτικές μεθόδους (SPME/GC-MS), των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του γένους *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11) μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε στείρα μοντέλα υποστρώματα ιχθυοζωμού και συντήρησή τους στους 0°C. Απώτερος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση/ταυτοποίηση των μεταβολιτών οι οποίοι παράγονται από συγκεκριμένα είδη/στελέχη του γένους *Pseudomonas* κατά τη διάρκεια της συντήρησης μοντέλου υποστρώματος που προσομοιάζει πραγματικό τρόφιμο (αλίευμα).

Στο τέλος της συντήρησης (στις μονοκαλλιέργειες), το *Pseudomonas fluorescens* DF41TB αποτέλεσε τον μικροοργανισμό που έφθασε στα υψηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα (9.48 log cfu/g) σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Τα *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fragi* JCM 5396 αποτέλεσαν το δεύτερο και τρίτο μικροοργανισμό που έφθασε σε πολύ υψηλά



πληθυσμιακά επίπεδα σε σχέση με τους υπόλοιπους (9.41 και 9.35 log cfu/g αντίστοιχα). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) του *Pseudomonas fragi* JCM 5396 ( $\mu_{max}=0.852$ ) είχε την υψηλότερη τιμή από όλα τα υπόλοιπα είδη / στελέχη του *Pseudomonas* σε αντίθεση με τα *Pseudomonas vranovensis* ( $\mu_{max}=0.251$ ) που παρουσίασαν το χαμηλότερο ρυθμό. Η φάση προσαρμογής διήρκησε περισσότερο στα *migulae* P11 ( $lag=2.77$ ), ενώ η πιο σύντομη με διαφορά σημειώθηκε στα *Pseudomonas fluorescens* LMG ( $lag=0.10$ ).

Ποικίλες πτητικές ουσίες (αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, σουλφίδια, οργανικά οξέα κτλ) βρέθηκαν να σχετίζονται με τη μεταβολική δραστηριότητα συγκεκριμένων ειδών/στελεχών του γένους *Pseudomonas* κατά τη συντήρηση των ενοφθαλμισμένων μοντέλων υποστρωμάτων. Οι κυριότερες από αυτές είναι η **Ethyl-2-methylbutyrate** η οποία ανιχνεύθηκε σε όλα τα ενοφθαλμισμένα μοντέλα, η **Ethyl isovalerate** στις μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* και *Pseudomonas migulae* P11, η **Ethyl tiglate** στις μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas migulae* P11 και στις συγκαλλιέργειες, η **Ethyl propionate** στους *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas vranovensis*. και στις συγκαλλιέργειες, η **Hexanoic acid, ethyl ester** στις μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fragi* MA07 και στις συγκαλλιέργειες, η **Ethyl octanoate** στους *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas migulae* P11 και στις συγκαλλιέργειες, η **2-nonanol** στους *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, η **2-nonanone** στους *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* και *Pseudomonas fluorescens* LMG, η **3-hydroxy-2-butanone** στους

*Pseudomonas fragi* JCM 5435, η **dimethyl disulfide** σε όλα τα ενοφθαλμισμένα, η **2-ethyl-1-hexanol** στους *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovensis* και στις συγκαλλιέργειες.

**Λέξεις-κλειδιά:** Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ), αλλοίωση, Μικροβιακή αύξηση, Πτητικοί μεταβολίτες.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>16</b>
1.1 Μικροβιακή αλλοίωση αλιευτικών προϊόντων .....	16
1.2 Ειδικοί Αλλοιωγόνιοι Μικροοργανισμοί (EAM) .....	18
1.3. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης.....	20
1.4 Σκοπός της μελέτης.....	21
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>23</b>
2.1 Στερεά μοντέλα υποστρώματα από ζωμό ιχθύος τσιπούρας.....	23
2.1.1 Προετοιμασία μοντέλων υποστρωμάτων.....	23
2.1.2 Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλμισμός, συσκευασία και αποθήκευση μονοκαλλιιεργειών σε μοντέλων ιχθύος .....	24
2.2 Μικροβιακή ανάλυση σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας.....	25
2.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων.....	29
2.4 Χημική ανάλυση .....	30
2.4.1 Προσδιορισμός Πτητικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) .....	30
2.4.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων .....	30
2.4.1.2 Συλλογή πτητικών ουσιών με SPME (Solid Phase MicroExtraction) ..	30
2.4.1.3 Συνθήκες ανάλυσης πτητικών.....	31
2.4.1.4 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πτητικών ουσιών .....	32
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>33</b>
3.1 Μικροβιακή αύξηση ειδών / στελεχών του <i>Pseudomonas</i> .....	33
3.2 Χημική ανάλυση - Παραγωγή πτητικών ουσιών .....	36
3.2.1 Πτητικές ουσίες που παράγονται σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας .....	36
3.2.2 Πτητικές ουσίες μικροβιακής δραστηριότητας.....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>56</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>60</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>62</b>
6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία .....	62
6.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία.....	69
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>70</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>72</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 2.1.** *Pseudomonas* spp. που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας και ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA (Parlapani et al. 2014, 2015).

**Πίνακας 2.2.** Σύνθεση του θρεπτικού υλικού TSA Tryptone Soy Agar, LAB M, Lancashire, UK).

**Πίνακας 2.3.** Σύνθεση του θρεπτικού υλικού CFC (Cetrimide, Fucidin, Chephaloridine, LAB108).

**Πίνακας 3.1.** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες στους 0 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

**Πίνακας 3.2.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396 και *Pseudomonas fragi* JCM 5435, σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

**Πίνακας 3.3.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovensis*, σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

**Πίνακας 3.4.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas migulae* P11, καθώς και σε συγκαλλιέργειες όλων των υπο εξέταση ειδών / στελεχών του *Pseudomonas* spp., σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

**Πίνακας 3.5.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε μάρτυρες - στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

**Σχήμα 3.1.** Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 0°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 3 επαναλήψεων που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες προσαρμογής με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas fluorescens* DF41TB με μαύρο (●), *Pseudomonas fragi* JCM 5396 με κόκκινο (▲), *Pseudomonas fragi* JCM 5435 με μπλε σκούρο (■), *Pseudomonas fragi* MA07 με πράσινο (●), *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 με μωβ (▲), *Pseudomonas vranovensis* με μπλε (■), *Pseudomonas fluorescens* LMG με πορτοκαλί (●), *Pseudomonas migulae* P11 με γαλάζιο (▲) και οι συγκαλλιέργειες με κίτρινο (◆).

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 2.1.** Φιλτράρισμα ιχθυο-ζωμού με ηθμό Whatman No.1.

**Εικόνα 2.2.** Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

**Εικόνα 2.3.** Μέθοδος επίστρωσης σε τρυβλίο.

**Εικόνα 2.4.** Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε θρεπτικό υλικό TSA.

**Εικόνα 2.5.** Ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas spp.* σε θρεπτικό υλικό CFC.

**Εικόνα 2.6.** Τεχνική SPME - Solid Phase MicroExtraction ([www.chimikoergastirio.blogspot.gr](http://www.chimikoergastirio.blogspot.gr)).

**Εικόνα 2.7.** Συσκευή GC/MS της εταιρίας FISIONS Instruments (GC 8000series, Model: 8060, MS: MD-800).

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΥΣΙΩΝ ΑΓΓΛΙΚΑ: ΕΛΛΗΝΙΚΑ

**Acetic acid** : οξικό οξύ

**Acetophenone**: ακετοφαινόνη

**Acetyl propionyl** (ή 2,3 pentedione): 2,3 πενταδιόνη

**Amyl alcohol**: αμυλική αλκοόλη

**1-butoxy-2-propanol**: 1-βούτοξυ-2-προπανόλη

**Butyl alcohol** (ή butanol): βουτανόλη

**Dimethyl disulfide**: διμεθυλοσουλφίδιο

**n-decanal**: n-δεκανάλη

**2-decenal**: 2-δεκα-εν-άλη

**1-decanol**: 1-δεκανόλη

**n-dodecane** : n-δωδεκάνιο

**Ethyl acetate** : οξικός αιθυλεστέρας

**Ethyl crotonate**: κροτονικός αιθυλεστέρας ή αιθυλεστέρας του 2-βουτενικού οξέος

**Ethyl isovalerate**: ισοβαλερικός αιθυλεστέρας

**Ethyl propionate**: προπιονικός αιθυλεστέρας

**Ethyl-2-methylbutyrate**: 2-μεθύλ-βουτυρικός αιθυλεστέρας

**Ethyl isovalerate**: ισοβαλερικός αιθυλεστέρας

**Ethyl tiglate** (ή Ethyl trans-2-methyl-2-butenate): trans-2-μεθύλ-2-βουτενικός αιθυλεστέρας

**Ethyl Isobutyrate**: ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας

**Ethyl butyrate**: βουτυρικός αιθυλεστέρας

**2-Ethyl-1-hexanol**: 2-αιθύλ-1-εξανόλη

**n-eicosane**: n-εικοσάνιο

**Hexanoic acid, ethyl ester**: αιθυλεστέρας εξανικού οξέος

**trans-2-Hexenal**: trans-2-εξενάλη

**1-Hexanol**: 1-εξανόλη

**2-heptanone** : 2-επτανόνη

**cis-4-Heptenal**: cis-4-επτενάλη

**Heptanal**: επτανάλη

**1,4-heptadiene**: 1,4-επταδιένιο

**Heptyl alcohol** (ή 1-Heptanol): 1-επτανόλη

**n-hexadecane:** n-δεκαεξάνιο  
**3-hydroxy-1-butanone:** 3-ύδροξυ-1-βουτανόνη  
**trans,trans-2,4-Heptadienal:** trans, trans,-2,4,-επταδιενάλη  
**Hexanal :** εξανάλη  
**trans-2-Hexenal:** trans-2-εξενάλη  
**trans,trans-2,4-Heptadienal :** trans,trans-2,4-επταδιενάλη  
**Isobutyl isobutyrate:** ισοβουτυρικός ισοβουτυλεστέρας  
**Isoamyl alcohol :** ισοαμυλική αλκοόλη  
**Lauryl alcohol (ή 1-dodecanol):** 1-δωδεκανόλη  
**2-Methyl-1-butanal:** 2-μεθύλ-1-βουτανάλη  
**3-Methyl-1-butanal:** 3-μεθύλ-1-βουτανάλη  
**4-methyl-2-pentanone:** 4-μεθύλ-2-πεντανόνη  
**2-methylbutyrate:** άλας του 2-μεθυλ βουτυρικού  
**6-methyl-5-hepten-2-one:** 6-μεθύλ-5-επτέν-2-όνη  
**2-methyl-1-butanol:** 2-μεθύλ-1-βουτανόλη  
**Nonanoic acid:** εννεανοϊκό οξύ  
**2-nonanone:** 2-εννεανόνη  
**cis-6-nonenal:** cis-6-εννεανάλη  
**Nonanal:** εννεανάλη  
**trans-2-nonenal:** trans-2-εννέα-εν-άλη  
**cis-6-Nonen-1-ol:** cis-6- εννέα-εν-1-όλη  
**2-octanone:** 2-οκτανόνη  
**1-octen-3-ol:** 1-οκτέν-3-όλη  
**2,3 octanedione:** 2,3 οκτανοδιόνη  
**trans-2-octenal:** trans-2-οκτενάλη  
**1-Penten-3-ol:** 1-πεντέν-3-όλη  
**2-pentanone:** 2-πεντανόνη  
**3-pentanone:** 3-πεντανόνη  
**2-Penten-1-ol (Z):** 2-πεντέν-1-όλη  
**Pentadecane:** δεκαπεντάνιο  
**n-tetradecane:** n-δεκατεσσεράνιο  
**n-tetracosane:** n-εικοστεσεράνιο

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Μικροβιακή αλλοίωση αλιευτικών προϊόντων

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι ένα από τα πιο σημαντικά εκτρεφόμενα είδη ψαριών στην περιοχή της Μεσογείου και ειδικότερα στην Ελλάδα. Η παραγωγή τσιπούρας στην Ελλάδα εκτιμάται σε 75.000 τόνους την περίοδο 2013-2014, με την Ελλάδα να είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός παγκοσμίως. Παρ' όλα αυτά όμως, είναι ένα εξαιρετικά ευαίσθητο και ευαλλοίωτο προϊόν. Ως μικροβιακή αλλοίωση θεωρείται η υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Huis in't Veld 1996). Η υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσης των μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξειδωσης (τάγγιση) (Ashie et al. 1996, Gram & Huss 1996). Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες (Gram & Dalgaard 2002).

Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσής τους (Shewan 1977). Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix thermosphacta* (Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996).

Η αναγνώριση της μικροβιακής σύνθεσης της τσιπούρας διεξάγεται κυρίως με φαινοτυπικές δοκιμές (μορφολογικές, βιοχημικές). Μετά την απομόνωση των



μικροοργανισμών, χρησιμοποιούνται διάφορα μη-επιλεκτικά και / ή επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης. Στο παρελθόν, αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει τη σύνθεση αυτή είτε με επιλεκτικό ή με γενικό μέσο ανάπτυξης με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της κάθε απομονωμένης αποικίας. Ωστόσο, οι φαινοτυπικές δοκιμές δεν έχουν την διακριτική ικανότητα των μοριακών τεχνικών. Η εφαρμογή μοριακών τεχνικών στα τρόφιμα έχει αλλάξει τον τρόπο με τον οποίο οι μικροβιακές κοινότητες εξάγονται, δίνοντας πολύ πιο ακριβείς φυλογενετικές πληροφορίες σε σχέση με άλλες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί. Έτσι λοιπόν, ο συνδυασμός των κλασικών και των μοριακών μεθοδολογιών βοηθά στην εξαγωγή καλύτερων αποτελεσμάτων αφού αποκαλύπτει μικροοργανισμούς οι οποίοι διαφεύγουν από τις κλασικές μεθόδους και επιπλέον, περιλαμβάνει πολύτιμες συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων (Parlapani et al. 2014).

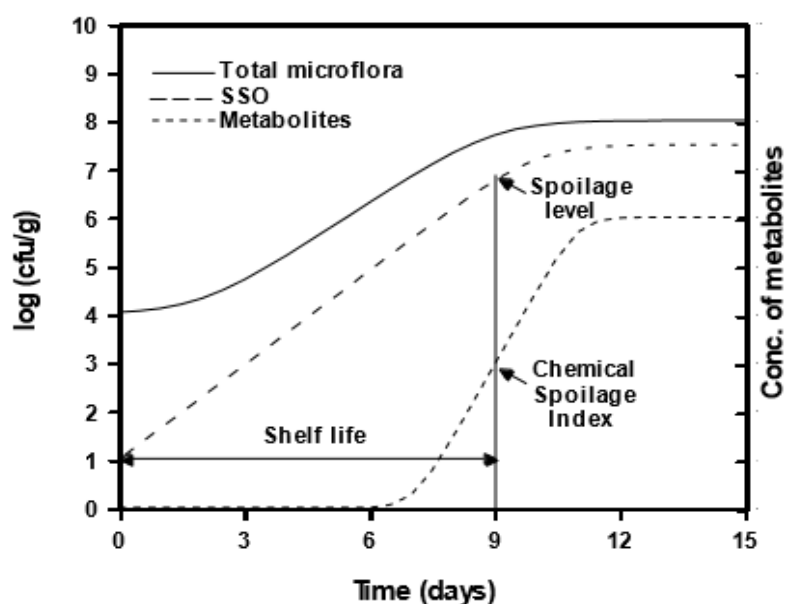
Οι διαφορετικές θερμοκρασίες και οι ατμοσφαιρικές συνθήκες επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας αλλοίωσης καθώς και τη διάρκεια ζωής της τσιπούρας. Η αρχική μικροβιακή σύνθεση στους 0°C σε σάρκα τσιπούρας έχει βρεθεί με καλλιεργητικές τεχνικές να αποτελείται από: *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas* και *Flavobacterium*, ενώ στο τέλος της διάρκειας ζωής οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί είναι οι: *Pseudomonas* και *Shewanella* (Parlapani et al. 2013). Επίσης, οι μη καλλιεργητικές τεχνικές έδειξαν ότι η αρχική μικροβιακή σύνθεση της τσιπούρας απαρτίζεται κυρίως από *Acinetobacter*, ενώ οι *Pseudomonas*, *Aeromonas salmonicida* και *Shewanella* είναι οι επικρατέστεροι φυλότυποι στο τέλος της διάρκειας ζωής (Parlapani et al. 2013).

Κατά τη συντήρηση, μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ),

παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη. Η επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν το μικρό αυτό κλάσμα εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα (Leisner & Gram 1999, Dalgaard 2003).

## 1.2 Ειδικό Αλλοιωγόνο Μικροοργανισμοί (EAM)

Οι Ειδικό Αλλοιωγόνο Μικροοργανισμοί αποτελούν την κύρια αιτία που προκαλεί την ποιοτική υποβάθμιση στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard 2002). Οι EAM (SSO, Specific Spoilage Organisms) αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης (spoilage level) των  $10^7$ - $10^9$  cfu/g οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους (metabolites: CSI-chemical spoilage ind(ex)-ices), έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard et al. 1993, Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996) (Σχ. 1).



**Σχήμα 1.** Γενική περιγραφή της αλλοίωσης των ιχθύων (Dalgaard et al. 1993)

Οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί που έχουν βρεθεί με καλλιεργητικές τεχνικές στους 0°C σε σάρκα τσιπούρας στο τέλος της διάρκειας ζωής είναι οι: *Pseudomonas* και *Shewanella* (Parlapani et al. 2013). Ενώ, με μη καλλιεργητικές τεχνικές οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί βρέθηκαν να είναι οι *Pseudomonas*, *Aeromonas salmonicida* και *Shewanella* (Parlapani et al. 2013). Τα είδη του γένους *Pseudomonas* που έχουν θεωρηθεί ως οι κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί του γένους αυτού σε δείγματα τσιπούρας είναι οι: *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11 (Parlapani et al. 2014, 2015). Τα *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fragi* JCM 5396 βρέθηκαν να κυριαρχούν σε φιλέτα τσιπούρας στους 0°C, τα *Pseudomonas fluorescens* LMG και *Pseudomonas vranovensis* σε απεντερωμένα δείγματα τσιπούρας στους 2°C και σε φιλέτα τσιπούρας στους 5°C κυριάρχησαν τα *Pseudomonas fragi* MA07. Στους 15°C, σε φιλέτα τσιπούρας βρέθηκαν να κυριαρχούν τα *Pseudomonas migulae* P11, ενώ σε ολόκληρα δείγματα τα *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 (Parlapani et al. 2014, 2015).

Η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών στα τρόφιμα έχει αλλάξει τον τρόπο με τον οποίο οι μικροβιακές κοινότητες εντοπίζονται. Η ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου έχει δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την αλλοίωση της τσιπούρας. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει ακριβή φυλογενετικά δεδομένα σε σχέση με άλλες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα.

### 1.3. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

Ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης είναι η εκτίμηση της αλλοιωγόνου δυναμικής των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού των μεταβολικών τους προϊόντων που προκαλούν την αλλοίωση και την οργανοληπτική απόρριψη. 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 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). Επιπλέον, η τιμή του TMA είναι χαμηλή έως και μηδαμινή σε ιχθύες τσιπούρας που έχουν αλιευθεί από ελληνικά ύδατα (Drosinos & Nychas 1996, Drosinos et al. 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, 2000). Οι βιογενείς αμίνες γενικότερα απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους ιχθύες της Μεσογείου (Koutsoumanis et al. 1999). Έτσι, η αδυναμία του ακριβή προσδιορισμού της αλλοίωσης (στάδιο αλλοίωσης) με την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων έχει οδηγήσει στην αναζήτηση πιο αξιόπιστων μεθόδων.

Άλλες ουσίες, κυρίως πτητικές, όπως είναι οι αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, θειώδη συστατικά, αμμωνία, εστέρες και τα οργανικά οξέα είναι οι κυριότερες ομάδες μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται από τη δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στους ιχθύες (Leisner & Gram 1999). Πιο συγκεκριμένα, τα *Pseudomonas* spp. ως αερόβιοι μικροοργανισμοί οξειδώνουν την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Drosinos & Board 1994) και αφού το αφομοιώσουν, συνεχίζουν διασπώντας τα αμινοξέα προς NH<sub>3</sub> και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις (Dainty

1996). Σε ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*) αποθηκευμένους στους 2 °C βρέθηκαν διάφορες πτητικές ουσίες που συνδέονται με τη δράση των *Pseudomonas* και είναι οι: 2-ethyl-1-hexanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methylbutanal, isoamyl butyrate, ethyl acetate καθώς και αιθυλεστέρες (ethyl esters) των propionate, butyrate και isobutyrate (Parlapani et al. 2015).

Ο προσδιορισμός των διάφορων πτητικών ουσιών, συμπεριλαμβάνοντας και τα οργανικά οξέα, που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης ενός αλιευτικού προϊόντος και ευθύνονται για τις διάφορες χαρακτηριστικές οσμές σε αυτό αποτελεί τη νέα τάση για μελέτη. Οι πτητικές ουσίες έχουν αρχίσει να μελετούνται για να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης διότι μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ της πρώτης ημέρας και της ημέρας απόρριψης κατά τη διάρκεια συντήρησης των αλιευμάτων (Joffraud et al. 2001, Jorgensen et al. 2001, Chung et al. 2002, Duflos et al. 2006, Edirisinghe et al. 2007, Soncin et al. 2008, Selli & Cayhan 2009, Iglesias et al. 2010). Για να χαρακτηριστεί κάποια ουσία από αυτές ως χημικός δείκτης θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις όπως (Fields et al. 1986).

- α) να βρίσκεται σε μικρή ή μηδενική συγκέντρωση στο τρόφιμο όταν αυτό είναι υψηλής ποιότητας,
- β) να αυξάνεται η συγκέντρωσή του όσο προχωρά η αλλοίωση,
- γ) να μην επηρεάζεται η συγκέντρωσή του από τη διαδικασία επεξεργασίας,
- δ) να είναι προϊόν μεταβολισμού του ειδικού αλλοιωγόνου οργανισμού,
- ε) η μέθοδος προσδιορισμού να είναι ταχεία, εύκολη και ακριβής.

#### **1.4 Σκοπός της μελέτης**

Το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι:

- α) η παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών,

β) η εκτίμηση των κυριότερων κινητικών παραμέτρων, δηλαδή, ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός ( $y_0$ ), η φάση προσαρμογής (lag time), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός ( $y_{End}$ ), και

γ) η μελέτη των παραγόμενων πτητικών μεταβολικών προϊόντων με μοντέρνες αναλυτικές μεθόδους (SPME/GC-MS), των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του γένους *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovenssis*, *Pseudomonas migulae* P11). Οι μικροοργανισμοί αυτοί απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε θερμοκρασίες ψύξης και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA. Απώτερος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση/ταυτοποίηση των μεταβολιτών οι οποίοι παράγονται από συγκεκριμένα είδη/στελέχη του γένους *Pseudomonas* κατά τη διάρκεια της συντήρησης μοντέλου υποστρώματος που προσομοιάζει πραγματικό τρόφιμο (αλίευμα).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Στερεά μοντέλα υποστρώματα από ζωμό ιχθύος τσιπούρας**

#### **2.1.1 Προετοιμασία μοντέλων υποστρωμάτων**

Τα μοντέλα υποστρώματα από ζωμό ιχθύος τσιπούρας (Fish Juice Agar -FJA) προετοιμάστηκαν μετά από τροποποίηση της μεθόδου κατά Dalgaard (1995). Η διαδικασία ήταν η εξής: 250 g ιχθύος τσιπούρας κόβονταν σε πολύ μικρά κομμάτια, προστίθονταν σε 250 ml απιονισμένου νερού και ομογενοποιούνταν για 2 min σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν διήθηση του ιχθυο-ζωμού μέσω διάτρητου υφάσματος (τούλι) σε κωνική φιάλη και ακολουθούσε βρασμός για 5 min. Ο ιχθυο-ζωμός αφήνονταν να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθούσε φιλτράρισμα με ηθμό Whatman No.1 (Εικ. 2.1). Έπειτα, προστίθονταν 0.10 M ρυθμιστικού διαλύματος (0.056 M  $H_2KPO_4$  και 0.044 M  $HK_2PO_4$ ) και ρύθμιση του pH στο 6.5 με NaOH/HCl. Ακολουθούσε βρασμός στους 100°C για 30 min. Τέλος, προστίθονταν αποστειρωμένο εναιώρημα άγαρ 3.0% στον ιχθυο-ζωμό σε αναλογία 1/1 έτσι ώστε η συγκέντρωση του αγαρ στο τελικό υλικό να είναι 1.5% και κατόπιν το περιεχόμενο μοιράζονταν (ανά 20ml περίπου) σε τρυβλία.



**Εικόνα 2.1.** Φιλτράρισμα ιχθυο-ζωμού με ηθμό Whatman No.1.

### **2.1.2 Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλισμός, συσκευασία και αποθήκευση μονοκαλλιιεργειών σε μοντέλων ιχθύος**

Ανανεωμένες καλλιέργειες ταυτοποιημένων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας: *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas migulae* P11) χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλισμό των μοντέλων υποστρωμάτων (Πιν. 2.1). Ο αρχικός πληθυσμός κάθε εμβολίου ήταν περίπου  $5 \cdot 10^3$  cfu/g. Οι ενοφθαλισμοί πραγματοποιήθηκαν σε μονοκαλλιέργειες, θεωρώντας ως μονοκαλλιέργεια την κάθε ομάδα αλλοιωγόνων όπως αναφέρεται παραπάνω, και σε συγκαλλιέργειες (όλοι μαζί). Τα ενοφθαλισμένα υποστρώματα αποθηκεύθηκαν στους 0°C για 20 ημέρες.



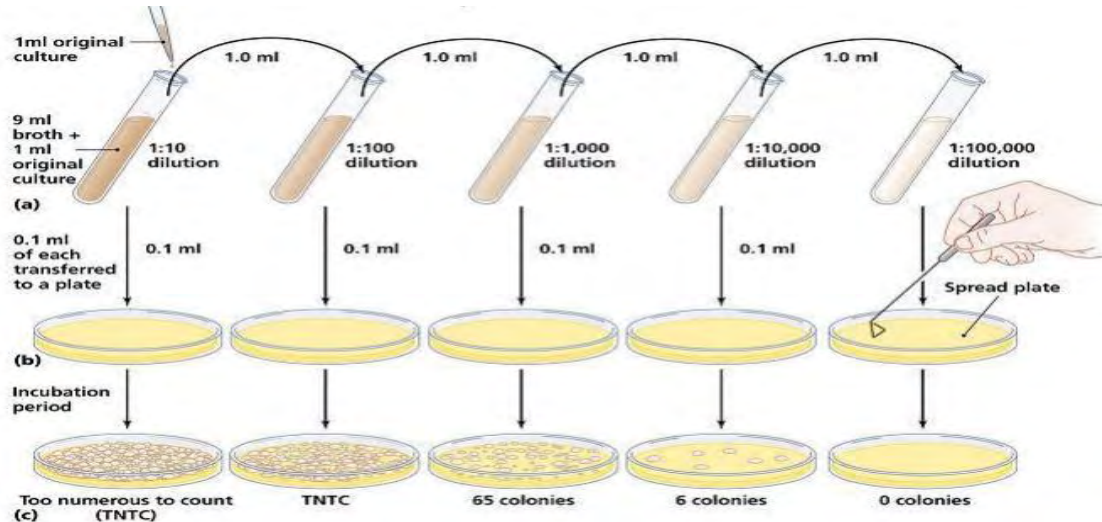
**Πίνακας 2.1.** *Pseudomonas* spp. που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας και ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA (Parlapani et al. 2014, 2015).

Φυλότυπος	Κοντινότερος συγγενής	GenBank number	Προέλευση
SBF-B5-d0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB	JN642252	φιλέτο 0°C
SBW-B8-dsp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG	GU198122	απεντερωμένα 2°C
SBF-B18-dsp	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435	AB685646	φιλέτο 0°C
SBF-B19-dsp	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396	AB685609	φιλέτο 0°C
SBF-A12-dsp	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07	AB609073	φιλέτο 5°C
SB-d16-13	<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435	AB685646	ολόκληρο 15°C
GSB-b10	<i>Pseudomonas vranovensis</i>	HQ202851	απεντερωμένα 2°C
SBF-B32-dsp	<i>Pseudomonas migulae</i> P11	AY972167	φιλέτο 15°C
SBF-B5-d0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB	JN642252	φιλέτο 0°C
SBW-B8-dsp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG	GU198122	απεντερωμένα 2°C
SBF-B18-dsp	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435	AB685646	φιλέτο 0°C

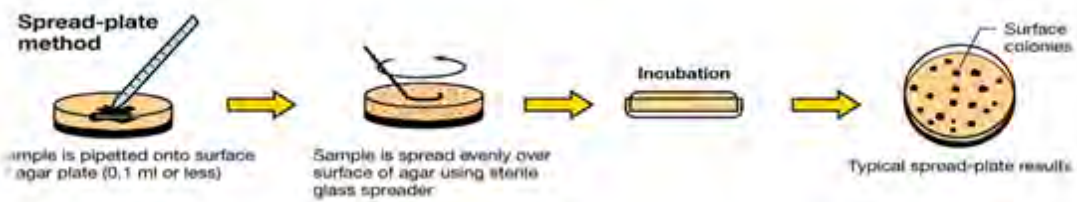
## 2.2 Μικροβιακή ανάλυση σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας

Ένα (1) g δείγματος μεταφέρονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις τριπλούν (n=3) που περιείχαν 9 ml αποστειρωμένο MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85% NaCl) και ακολουθούσε ανάδευση για 2 min σε συσκευή τύπου vortex. Οι πληθυσμοί

όλων των μικροοργανισμών απαριθμήθηκαν μετά από διαδοχικές αραιώσεις και επίστρωση (0.1 ml) σε TSA (Tryptone Soy Agar, LAB M, Lancashire, UK) και επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες (Εικ. 2.2, Εικ. 2.3).



**Εικόνα 2.2.** Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.



**Εικόνα 2.3.** Μέθοδος επίστρωσης σε τρυβλίο.

Το TSA (Εικ. 2.4) 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 στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.2.** Σύνθεση του θρεπτικού υλικού TSA Tryptone Soy Agar, LAB M, Lancashire, UK).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	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.



**Εικόνα 2.4.** Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε θρεπτικό υλικό TSA.

Ένα άλλο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. είναι το CFC (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine, LAB108). Το

συγκεκριμένο θρεπτικό (Εικ. 2.5) 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, το θείο και τις βιταμίνες που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί. Το χλωριούχο μαγνήσιο ( $MgCl_2$ ) και τοθειικό 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<sup>+</sup> και ορισμένα Gram<sup>-</sup> βακτήρια.

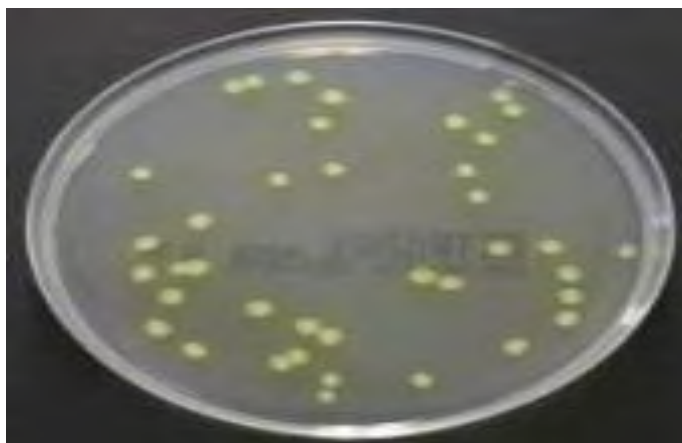
**Πίνακας 2.3.** Σύνθεση του θρεπτικού υλικού CFC (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine, LAB108).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	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 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  $7.1 \pm 0.2$  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.



**Εικόνα 2.5.** Ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas spp*, σε θρεπτικό υλικό CFC.

### 2.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων

Οι κινητικές παράμετροι των πληθυσμών υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτογενές μοντέλο του Baranyi. Οι παράμετροι αυτές ήταν: η φάση προσαρμογής (lag time), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός ( $N_{max}$ ). Η προσαρμογή των δεδομένων που απαριθμήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία στο μοντέλο του Baranyi έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts 1994).

## **2.4 Χημική ανάλυση**

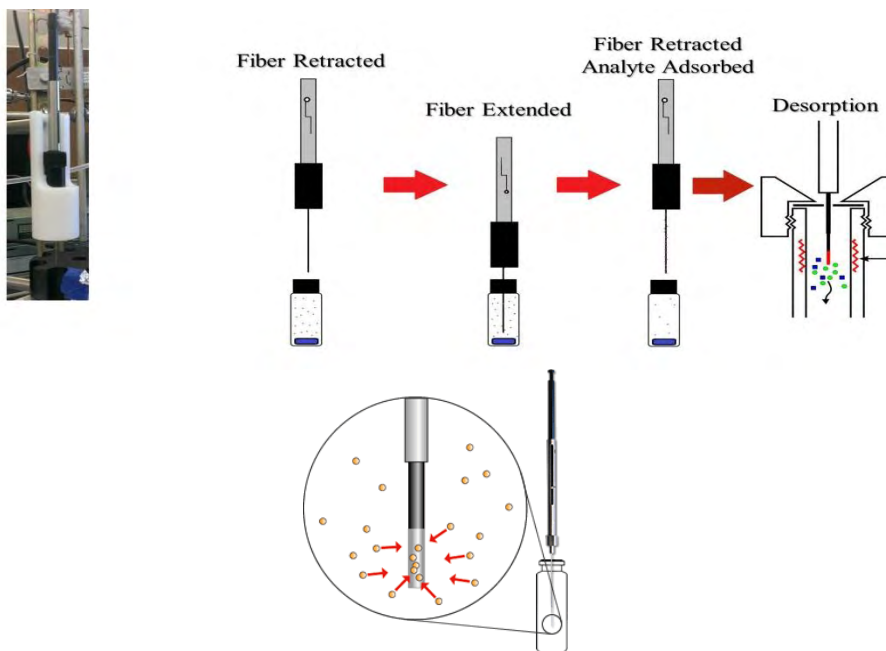
### **2.4.1 Προσδιορισμός Πτητικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)**

#### **2.4.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων**

Στα μοντέλα ιχθύος λαμβάνονταν τριπλά δείγματα των πέντε (5) g και τοποθετούνταν σε ειδικούς περιέκτες τύπου falcon μετά από ομογενοποίηση των τριών δειγμάτων σε ένα και αποθηκεύονταν στους -20°C.

#### **2.4.1.2 Συλλογή πτητικών ουσιών με SPME (Solid Phase MicroExtraction)**

Η συλλογή και απομόνωση των πτητικών ουσιών, σε δείγματα που είχαν ληφθεί κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική SPME (Solid Phase MicroExtraction) (Εικ. 2.6). Στα μοντέλα, 2,5 g από το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρονταν σε φιαλίδιο όγκου 25 mL με βιδωτό διάτρητο πώμα (septa) το οποίο παρέμενε για 15 min στους 40°C. Κατόπιν, τοποθετούνταν η ίνα (SPME Fiber Assembly, 50/30 um DVB / Carboxen TM / PDMS Stableflex TM, for Manual Holder, gray) στον υπερκείμενο του υγρού χώρο για επιπλέον 30 λεπτά, υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας. Το μήκος της ίνας στον υπερκείμενο χώρο διατηρούνταν σταθερό. Η εκρόφιση των πτητικών από την ίνα πραγματοποιήθηκε στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου σε θερμοκρασία 250°C, σε λειτουργία splitless.



**Εικόνα 2.6.** Τεχνική SPME - Solid Phase MicroExtraction

([www.chimikoergastirio.blogspot.gr](http://www.chimikoergastirio.blogspot.gr)).

#### 2.4.1.3 Συνθήκες ανάλυσης πτητικών

Η ανάλυση των πτητικών ουσιών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συσκευή GC/MS ήταν της εταιρίας FISIONS Instruments (GC 8000series, Model: 8060, MS: MD-800). Η στήλη διαχωρισμού ήταν CP-Wax 52CB (60m X 0,32mm, DF=0,25μm) της CHROMPACK (Εικ. 2.7). Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ήταν το ακόλουθο: 40°C για 5 min, άνοδος στους 150°C (4°C /min) και άνοδος στους 250°C (30°C /min). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της πηγής ιόντων ήταν 250 και 200°C, αντίστοιχα. Το φέρον αέριο ήταν Ήλιο με ροή 2 mL/min. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματογράφου μάζας ήταν electron impact, με την ενέργεια ορισμένη στα 70 eV και εύρος μαζών 29-400 m/z. Η ανάλυση των πτητικών ουσιών πραγματοποιούνταν για 40,833 min.



**Εικόνα 2.7.** Συσκευή GC/MS της εταιρίας FISIONS Instruments (GC 8000series, Model: 8060, MS: MD-800).

#### **2.4.1.4 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πτητικών ουσιών**

Η ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών διεξήχθη με τη χρήση της βάσης δεδομένων NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, data version NIST 05, software version 2.0d). Το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Amdis software (version 2.62, <http://chemdata.nist.gov/massspc/amdis/>). Η ημι-ποσοτικοποίηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από το εμβαδόν της κάθε κορυφής. Τα εμβαδά των κορυφών υπολογίστηκαν από το χρωματογράφημα ολικής σάρωσης (full scan). Τα τερπενικά παράγωγα, οι υδρογονάνθρακες και οι πολυκυκλικές ενώσεις δεν ελήφθησαν υπόψη, ως παράγωγα της στήλης ή άλλου τύπου προέλευσης.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Μικροβιακή αύξηση ειδών / στελεχών του *Pseudomonas*

Οι μεταβολές του πληθυσμού των ειδών / στελεχών του *Pseudomonas* καθώς και οι κινητικές παράμετροι κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 0°C υπό αερόβιες συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1.** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες στους 0 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 3 επαναλήψεων) εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994), ενώ οι τιμές εντός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών.

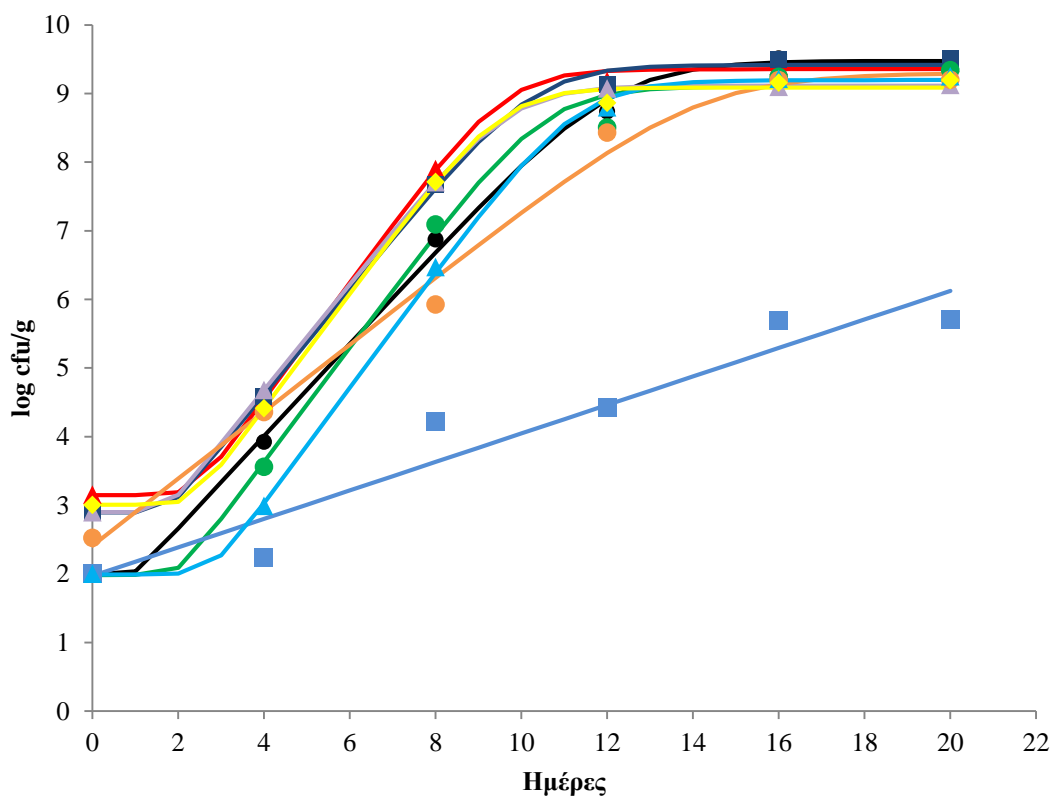
<b>Counts</b>	<b><i>y</i><sub>0</sub></b> (log CFUg <sup>-1</sup> )	<b><i>y</i><sub>max</sub></b> (log CFUg <sup>-1</sup> )	<b><i>Lag</i></b> (d)	<b><i>μ</i><sub>max</sub></b> (d <sup>-1</sup> )
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB	1.97±0.04 (2.00±0.00)	9.48±0.04 (9.49±0.09)	0.82±0.80	0.665±0.064
<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396	3.15±0.01 (3.15±0.02)	9.35±0.08 (9.45±0.13)	2.36±0.06	0.852±0.039
<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435	2.90±0.00 (2.34±0.17)	9.41±0.02 (9.51±0.07)	1.71±0.04	0.758±0.010
<i>Pseudomonas fragi</i> MA07	1.93±0.09 (2.00±0.00)	9.16±0.10 (9.34±0.09)	1.49±1.31	0.785±0.164
<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435	2.89±0.05 (2.90±0.06)	9.11±0.03 (9.13±0.07)	1.68±0.17	0.774±0.078
<i>Pseudomonas vranovensis</i>	2.00±0.05 (2.00±0.00)	5.95±0.20 (5.70±0.02)	1.06±1.85	0.251±0.084
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG	2.38±0.09 (2.53±0.24)	9.29±0.08 (9.20±0.05)	0.10±0.18	0.507±0.082
<i>Pseudomonas migulae</i> P11	1.99±0.00 (2.00±0.00)	9.19±0.08 (9.25±0.22)	2.77±0.48	0.847±0.016
Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	3.00±0.23 (3.01±0.23)	9.10±0.01 (9.20±0.05)	2.26±0.33	0.837±0.137

*μ*<sub>max</sub>: μέγιστος ρυθμός αύξησης, *lag phase*: φάση προσαρμογής, *N*<sub>max</sub>: μέγιστος τελικός πληθυσμός

Με βάση το πρωτογενές μοντέλο Barranyi (Baranyi & Roberts 1994), οι μικροβιακοί πληθυσμοί στην έναρξη του πειράματος ( $y_0$ ) υπολογίσθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης στα επίπεδα των 1.93, 1.97, 1.99 και 2.00 log cfu/g για τα *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas migulae* P11 και *Pseudomonas vranovensis*, αντίστοιχα. Στα 2.38 log cfu/g παρατηρήθηκε ο αρχικός πληθυσμός του *Pseudomonas fluorescens* LMG, ενώ 2.89 και 2.90 log cfu/g ήταν για τους *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fragi* JCM 5435, αντίστοιχα. Σε υψηλότερους αρχικούς πληθυσμούς εντοπίστηκε το *Pseudomonas fragi* JCM 5396 με 3.15 log cfu/g. Στο τέλος της συντήρησης των ενοφθαλμισμένων μοντέλων στους 0 °C όλα τα υπό εξέταση είδη/στελέχη του *Pseudomonas* έφθασαν σε υψηλούς πληθυσμούς, με το *Pseudomonas fluorescens* DF41TB να παρουσιάζει  $y_{max}=9.48$  log cfu/g. Ακολούθησαν τα *Pseudomonas fragi* JCM 5435 με  $y_{max}=9.41$  log cfu/g και *Pseudomonas fragi* JCM 5396 με  $y_{max}=9.35$  log cfu/g. Οι τελικοί πληθυσμοί ( $y_{max}$ ) των υπόλοιπων ειδών στελεχών του *Pseudomonas* εμφανίστηκαν με ελάχιστα χαμηλότερες τιμές με τη μικρότερη για το *Pseudomonas vranovensis* ( $y_{max}=5.95$  log cfu/g).

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) του *Pseudomonas fragi* JCM 5396 σε ιχθύες τσιπούρας στους 0°C υπό αερόβιες συνθήκες είχε την υψηλότερη τιμή από όλα τα υπόλοιπα είδη / στελέχη του *Pseudomonas* (Πιν. 3.1). Τα *Pseudomonas migulae* P11 είχαν επίσης υψηλό ρυθμό αύξησης σε αντίθεση με τα *Pseudomonas vranovensis* που παρουσίασαν το χαμηλότερο ειδικό ρυθμό αύξησης. Η φάση προσαρμογής διήρκησε περισσότερο στα *migulae* P11, ενώ η πιο σύντομη με διαφορά σημειώθηκε στα *Pseudomonas fluorescens* LMG (Πιν. 3.1).

Οι καμπύλες προσαρμογής της αύξησης της μικροβιακής σύνθεσης κατά τη διάρκεια της συντήρησης ιχθύος τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες στους 0°C παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.1.



**Σχήμα 3.1.** Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 0°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 3 επαναλήψεων που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες προσαρμογής με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas fluorescens* DF41TB με μαύρο (●), *Pseudomonas fragi* JCM 5396 με κόκκινο (▲), *Pseudomonas fragi* JCM 5435 με μπλε σκούρο (■), *Pseudomonas fragi* MA07 με πράσινο (●), *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 με μωβ (▲), *Pseudomonas vranovensis* με μπλε (■), *Pseudomonas fluorescens* LMG με πορτοκαλί (●), *Pseudomonas migulae* P11 με γαλάζιο (▲) και οι συγκαλλιέργειες με κίτρινο (◆).

Στα μη ενοφθαλμισμένα στερεά μοντέλα ιχθύος (μάρτυρες), δεν παρατηρήθηκε μικροβιακή αύξηση κατά τη διάρκεια της συντήρησης τεκμηριώνοντας την αποτελεσματικότητα των ασηπτικών τεχνικών. Στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα, τα *Pseudomonas fluorescens* DF41TB έφτασαν σε υψηλότερα επίπεδα πληθυσμού σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη / στελέχη του *Pseudomonas* στους 0 °C (Σχ. 3.1).

Τα *Pseudomonas fragi* JCM 5396 έφτασαν σε επίπεδα πληθυσμού πάνω από 9 logs περίπου τη 10<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στους 0 °C. Τα βακτήρια που βρέθηκαν σε παρόμοιους πληθυσμούς την 11<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης ήταν τα *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovensis*. Τα επίπεδα πληθυσμού των *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* MA07 και *Pseudomonas migulae* P11 ξεπέρασαν τα 9 logs την 12<sup>η</sup> ημέρα, ενώ των *Pseudomonas fluorescens* LMG την 15<sup>η</sup> ημέρα. Ο πληθυσμός του *Pseudomonas vranovensis* παρουσίασε τα χαμηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός του να καταφέρει να ξεπεράσει μόλις τα 6 logs περίπου την 19<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στους 0 °C.

### **3.2 Χημική ανάλυση - Παραγωγή πτητικών ουσιών**

#### **3.2.1 Πτητικές ουσίες που παράγονται σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας**

Οι πτητικές ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα ιχθύος τσιπούρας παρουσίασαν ποικίλες μεταβολές (αύξηση, μείωση, αυξομείωση, εμφάνιση και εξαφάνιση ουσιών) κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι ουσίες που παρήχθησαν στους μάρτυρες και στις μονοκαλλιέργειες των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών παρουσιάζονται στους πίνακες 3.5 και 3.2 - 3.4 αντίστοιχα.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ουσίες που παρήχθησαν στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα (Πιν. 3.2 - 3.4) σε σχέση με τα μοντέλα μάρτυρες (Πιν. 3.5) προσδιορίστηκε

ποιες από αυτές φαίνεται να είναι μικροβιακοί μεταβολίτες και από ποιους μικροοργανισμούς παράγονται. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τα μοντέλα μάρτυρες προσδιορίστηκαν πτητικές ουσίες που παρήχθησαν από μηχανισμούς διαφορετικούς της μικροβιακής δραστηριότητας.

**Πίνακας 3.2.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup> της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396 και *Pseudomonas fragi* JCM 5435, σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

Πτητικές ουσίες	Air (εμβαδόν X 10 <sup>-6</sup> )											
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB				<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396				<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435			
Αλκοόλες	0	8	16	20	0	8	16	20	0	8	16	20
Methanethiol	-	-	0,10	1,72	-	-	0,12	0,20	-	-	0,12	-
3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol)	0,01	-	0,04	0,08	-	0,04	0,08	0,01	-	0,02	-	-
2-methyl-1-butanol	0,08	-	0,09	0,04	-	0,05	-	-	-	-	0,01	-
Nonanol	-	-	0,14	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-
2-ethyl-1-hexanol	1,33	0,66	0,20	1,61	0,38	-	0,18	1,45	0,41	-	0,49	0,25
2-Nonanol	0,49	-	0,63	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptanol (Heptyl alcohol)	0,31	-	0,13	0,00	-	-	0,02	-	-	-	0,15	0,01
cis-6-Nonen-1-ol	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
3,7-Dimethyl-1- octanol	0,10	0,02	0,05	0,04	0,04	0,01	0,03	0,01	0,02	0,18	0,01	-
1-Decanol	0,06	-	0,04	0,19	-	-	0,02	-	-	-	-	-
1-Hexanol	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanol	0,01	-	0,2	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-
Ethanol (Ethyl alcohol)	6,41	13,88	0,47	-	15,19	27,54	1,26	-	13,33	6,05	2,68	0,71

1-octen-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Octanol	-	-	2,07	-	-	-	0,03	-	-	0,08	0,05	-
Isopropyl alcohol	4,04	5,41	-	-	1,55	5,61	-	-	0,24	-	-	-
1-Penten-3-ol	0,11	-	-	-	0,07	-	-	-	-	-	-	-
Amyl alcohol	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Penten-2-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-pentanol, 4-methyl-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Octanol	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hexen-1-ol (trans)	0,04	0,01	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lauyl alcohol	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Propanol, 1-butoxy-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Αλδεύδες</b>												
Nonanal	2,35	1,62	0,87	0,38	2,00	1,00	0,36	0,44	0,98	0,83	0,22	0,15
n-decanal	0,39	0,42	0,24	0,04	0,42	0,22	0,08	0,22	0,17	0,19	0,08	0,03
Isobutyraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02
Lauric aldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,15
2-Pentenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-
Hexanal	0,28	0,48	0,01	-	0,37	-	0,01	-	0,05	0,05	-	-
Heptanal	0,36	0,07	-	-	0,04	0,06	-	-	0,08	-	-	-
Octanal	0,29	-	-	-	0,07	0,11	-	-	0,07	-	-	-
n-Valeraldehyde	0,01	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
2-Methyl-2-pentenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexenal	0,46	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-

2-Methyl-1-butanal	0,04	0,03	-	-	-	-	2,76	-	-	-	-	-
trans-2-octenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Methyl-1-butanal	0,09	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decanal, E	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decenal, (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-2-Nonenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-4-Heptenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentanal (E)	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	0,03	-
3-Methylbutyraldehyde; isovaleraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentenal, (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Κετόνες</b>												
Acetone	2,72	-	5,78	1,58	1,83	5,98	8,11	4,35	0,34	3,48	5,61	1,47
2-Pentanone	-	-	0,08	0,02	-	0,10	0,15	0,10	0,00	-	0,16	0,17
2-Heptanone	-	-	0,23	0,13	-	0,10	0,17	0,19	-	-	0,15	0,20
n-Nonanone	-	-	-	0,16	-	-	-	0,10	-	-	0,15	
3-octanone	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	0,02
6-Methyl-5-hepten-2-one	0,11	0,01	0,30	0,05	0,02	0,01	0,27	0,03	0,05	-	0,07	0,02
Acetophenone	0,15	-	0,03	0,07	0,03	-	0,03	-	-	-	0,06	-
2-Nonanone	-	-	0,93	1,29	-	0,12	0,39	0,26	-	0,48	0,07	0,60

2-undecanone	-	-	-	0,41	-	-	0,13	-	-	-	0,31	0,46
3-Pentanone	-	-	2,07	-	0,3	-	-	0,22	-	0,52	1,91	-
5-Methyl-2,3-hexanedione	-	0,01	-	-	0,01	-	0,01	0,02	-	-	0,06	0,01
3-Octen-2-one	-	0,03	0,02	-	-	0,04	0,15	0,01	-	0,05	0,01	-
2-Octanone	0,08	-	0,02	-	-	-	0,01	0,19	-	-	0,02	-
4-Methyl-2-pentanone	0,65	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-
4-Methyl-3-penten-2-one	0,03	-	-	-	0,02	-	0,02	-	-	-	0,01	-
2-Butanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hexanone	0,05	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-
4-Methylacetophenone	0,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-hydroxy-2-Butanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-
<b>Εστέρες</b>												
Ethyl-2methylbutyrate	-	-	-	0,01	-	-	0,03	-	-	-	0,01	0,01
Butyl butyrate	0,02	-	0,02	0,02	0,01	-	-	-	-	0,04	0,01	-
Isobutyl Isobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	0,03	-
Hexyl formate	0,01	-	-	-	0,02	-	-	-	0,03	-	0,01	0,05
Hexyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22
Ethyl isovelerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02
Ethyl isobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl butyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-
Methyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Butyl acetate	0,22	-	0,07	-	0,25	-	0,06	-	-	-	0,12	-



Ethyl acetate	-	-	0,08	-	0,37	-	1,45	-	-	-	2,77	-
Acetic acid, methyl ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-3-Hexenyl butyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Propyl acetate	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl octanoate	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-
Ethyl myristate	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
Hexanoic acid, ethyl ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl Nonanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl tiglate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butanoic acid, ethyl ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Οργανικά Οξέα</b>												
Phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Λοιπές Ουσίες</b>												
Limonene	0,55	0,46	0,51	1,46	0,31	0,63	0,60	0,92	0,23	0,49	0,73	1,59
Ethane,1,2-diethoxy-	0,15	-	-	-	-	0,69	0,19	-	-	-	0,4	0,11
Eukalypton	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-	-	0,09	-
Dimethyl sulfide	-	-	0,03	1,02	-	-	-	1,05	-	-	-	0,54
Methylene Chloride	1,22	7,50	2,31	0,51	1,97	9,65	2,77	0,22	7,41	0,69	9,23	3,39
dimethyl disulfide	-	-	0,40	4,46	-	-	0,28	0,94	-	-	0,15	0,24
Disulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Πίνακας 3.3.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup> της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovensis*, σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

Πτητικές ουσίες	Air (εμβαδόν X 10 <sup>-6</sup> )											
	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07				<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435				<i>Pseudomonas vranovensis</i>			
Αλκοόλες	0	8	16	20	0	8	16	20	0	8	16	20
Methanethiol	-	-	0,07	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-
3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol)	-	0,04	0,01	-	0,02	0,01	0,01	-	-	-	-	-
2-methyl-1-Butanol	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanol	-	0,02	-	-	0,02	-	0,01	-	-	-	-	-
2-Ethyl-1-hexanol	0,50	-	0,11	3,16	0,52	0,27	0,30	2,33	0,46	-	0,32	1,58
2-Nonanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptanol (Heptyl alcohol)	-	-	0,02	-	0,04	-	0,08	-	-	-	0,02	-
cis-6-Nonen-1-ol	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,7-Dimethyl-1-octanol	0,04	0,13	0,07	-	0,03	0,02	0,07	0,02	0,01	0,04	0,01	0,06
1-Decanol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	0,02
1-Hexanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanol	-	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol (Ethyl alcohol)	8,36	12,42	0,08	0,12	11,63	4,24	0,05	0,06	12,29	-	10,37	0,17
1-octen-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19
1-Octanol	-	-	0,01	-	-	-	0,02	-	0,01	-	-	-
Isopropyl alcohol	3,51	20,06	-	-	2,21	0,17	-	-	2,93	1,82	1,1	-
1-Penten-3-ol	0,03	-	-	-	0,02	-	-	-	0,07	-	-	-
Amyl alcohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Penten-2-ol	-	2,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-pentanol, 4-methyl-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-
Octanol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
2-Hexen-1-ol (trans)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lauvyl alcohol	-	0,31	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Propanol, 1-butoxy-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-
<b>Αλδεύδες</b>												
Nonanal	2,35	1,04	0,21	0,30	2,87	0,66	0,39	1,93	3,10	5,22	1,12	0,98
n-decanal	0,55	0,20	0,03	0,08	0,45	0,07	0,08	0,17	0,45	-	0,28	0,23

Isobutyraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lauric aldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentenal	0,1	-	0,08	0,13	-	-	0,06	0,05	-	-	-	-	-
Hexanal	0,06	0,08	-	-	0,07	-	0,01	0,005	1,57	-	-	-	-
Heptanal	0,27	-	-	-	0,18	-	0,01	0,13	0,33	0,33	0,01	0,04	-
Octanal	0,22	-	-	-	0,1	-	-	0,13	-	-	0,04	0,15	-
n-Valeraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-
2-Methyl-2-pentenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04
Hexenal	0,08	-	0,01	-	0,24	-	-	-	-	0,97	0,31	0,05	-
2-methyl-1-butanal	0,03	-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,06	-	-	-
trans-2-octenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-methyl-1-butanal	0,06	-	-	-	0,01	-	-	-	0,13	0,21	-	-	-
2-Decanal, E	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-
2-Decenal, (E)	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-2-Nonenal	-	-	-	-	0,03	-	-	-	0,17	-	-	-	-
Acetaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-
cis-4-Heptenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentanal (E)	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Methylbutyraldehyde; Isovaleraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentanal, (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-
<b>Κετόνες</b>													
Acetone	2,42	3,93	11,72	1,30	0,40	0,19	6,50	1,65	1,11	2,96	4,59	0,08	-
2-Pentanone	-	0,07	0,08	-	-	-	0,50	0,04	-	-	-	-	-
2-Heptanone	-	-	0,16	0,05	-	-	0,65	0,02	-	-	-	-	-
n-Nonanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-
3-octanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-Methyl-5-hepten-2-one	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,03	-	-	0,08	0,12	0,02	-	-
Acetophenone	0,70	-	0,03	0,01	0,04	-	0,06	0,01	0,05	-	0,04	0,06	-
2-Nonanone	-	0,31	0,20	0,06	-	-	1,69	-	-	-	-	-	-
2-undecanone	-	-	-	-	-	-	0,71	-	-	-	-	-	-
3-Pentanone	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
5-Methyl-2,3-hexanedione	-	0,01	0	0,01	0,01	-	-	-	0,01	-	-	-	0,02
3-Octen-2-one	0,02	0,23	0,01	-	-	-	0,04	-	-	0,14	0,01	-	-
2-Octanone	-	-	-	-	0,03	-	-	-	0,04	-	0,02	-	-
4-Methyl-2-pentanone	-	-	-	-	0,04	-	0,03	-	0,02	-	0,01	-	-

4-Methyl-3-penten-2-one	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Butanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-
2-Hexanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-
4-Methylacetophenone	-	-	-	-	0,03	-	0,02	-	-	0,02	-	-	-
3-hydroxy-2-Butanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Εστέρες</b>													
Ethyl-2methylbutyrate	-	-	0,23	0,03	-	-	0,04	0,02	-	-	-	0,05	-
Butyl butyrate	-	-	0,03	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
Isobutyl Isobutyrate	-	-	0,03	0,09	0,03	-	0,03	0,09	0,01	-	-	-	-
Hexyl formate	0,05	0,09	0,01	0,03	-	0,01	0,02	-	-	0,03	-	-	-
Hexyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl isovelerate	-	-	0,03	0,02	-	-	0,01	-	-	-	-	0,01	-
Ethyl isobutyrate	-	-	0,12	0,01	-	-	0,05	0,04	-	-	-	0,18	-
Ethyl butyrate	-	-	1,33	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-
Methyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-
n-Butyl acetate	0,04	-	0,02	-	0,06	-	0,17	-	-	0,01	-	0,07	0,14
Ethyl acetate	-	2,9	-	-	0,13	1,27	-	-	-	-	3,63	-	-
Acetic acid, methyl ester	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-3-Hexenyl butyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Propyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl octanoate	-	0,24	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl myristate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexanoic acid, ethyl ester	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl Nonanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl propionate	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-
Ethyl tiglate	-	-	0,01	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-
Butanoic acid, ethyl ester	-	-	0,01	-	-	-	0,47	-	-	-	-	-	-
<b>Οργανικά Οξέα</b>													
Phenylacetic acid	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Λοιπές Ουσίες</b>													
Limonene	0,65	0,59	0,73	1,03	0,44	0,04	0,81	-	0,62	0,55	0,73	0,82	-
Ethane,1,2-diethoxy-	0,45	-	0,51	0,84	-	-	0,05	0,12	-	-	-	-	-
Eukalypton	-	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dimethyl sulfide	-	-	0,32	0,35	-	-	0,32	-	-	-	-	-	-
Methylene Chloride	9,00	1,69	10,25	1,54	8,48	0,38	0,99	0,75	1,95	3,55	0,03	0,17	-

Disulfide, dimethyl	-	0,06	0,25	0,24	-	-	0,22	0,09	-	-	0,08	0,18
Disulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	

**Πίνακας 3.4.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup> της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas migulae* P11, καθώς και σε συγκαλλιέργειες όλων των υπο εξέταση ειδών / στελεχών του *Pseudomonas spp.*, σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

Πτητικές ουσίες	Air (εμβαδόν X 10 <sup>-6</sup> )											
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG				<i>Pseudomonas migulae</i> P11				Συγκαλλιέργειες			
Αλκοόλες	0	8	16	20	0	8	16	20	0	8	16	20
Methanethiol	-	-	1,25	0,09	-	-	0,04	-	-	-	-	-
3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol)	-	-	0,07	0,13	0,02	0,01	-	-	-	0,07	0,01	-
2-methyl-1-Butanol	-	-	-	-	0,01	0,29	-	-	0,06	0,01	-	-
Nonanol	-	-	-	-	0,01	0,02	-	-	-	0,01	-	-
2-Ethyl-1-hexanol	0,36	2,10	0,22	0,84	0,56	0,76	0,02	0,71	0,32	0,75	0,25	15,12
2-Nonanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptanol (Heptyl alcohol)	-	-	0,04	-	-	-	0,05	-	-	-	0,01	-
cis-6-Nonen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-
3,7-Dimethyl-1-octanol	0,01	0,13	0,01	0,02	0,03	0,20	0,11	0,01	0,02	0,02	0,01	0,05
1-Decanol	-	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-
1-Hexanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,05
Nonanol	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
Ethanol (Ethyl alcohol)	1,67	12,01	0,14	-	8,47	23,65	0,05	-	3,01	12,38	-	0,73
1-octen-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,78

1-Octanol	-	-	0,04	-	-	-	0,05	-	-	0,01	-	-
Isopropyl alcohol	0,84	0,7	1,13	-	0,15	1,39	-	-	0,49	1,53	-	-
1-Penten-3-ol	0,01	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Amyl alcohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Penten-2-ol	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-
1-pentanol, 4-methyl-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Octanol	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-
2-Hexen-1-ol (trans)	-	-	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-
Lauvyl alcohol	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Propanol, 1-butoxy-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Αλδεύδες</b>												
Nonanal	1,45	5,76	0,57	2,86	2,28	3,34	0,30	1,85	2,09	5,45	0,30	0,83
n-decanal	0,24	0,81	0,02	0,27	0,60	0,47	0,06	0,25	0,45	0,76	0,01	0,06
Isobutyraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lauric aldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentenal	-	-	0,05	-	-	-	0,06	-	-	-	0,05	-
Hexanal	0,18	-	-	-	0,14	0,09	0,02	-	0,23	0,2	-	-
Heptanal	0,15	0,38	-	0,11	0,15	0,11	0,01	0,23	0,26	0,44	-	0,03
Octanal	-	0,22	-	0,17	-	-	-	-	0,03	-	-	-
n-Valeraldehyde	0,02	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Methyl-2-pentenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexenal	-	0,44	0,03	-	0,21	-	-	-	0,27	-	-	0,06
2-Methyl-1-butanal	0,01	-	-	2,87	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-2-octenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27

<b>3-Methyl-1-butanal</b>	0,03	0,09	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
<b>2-Decanal, E</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2-Decenal, (E)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>trans-2-Nonenal</b>	-	-	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acetaldehyde</b>	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
<b>cis-4-Heptenal</b>	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-
<b>2-Pentanal (E)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3-Methylbutyraldehyde; Isovaleraldehyde</b>	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2-Pentenal, (E)</b>	-	-	-	-	-	-	3,18	-	-	-	-	-
<b>2-Pentanal</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Κετόνες</b>												
<b>Acetone</b>	0,01	1,44	13,26	6,80	0,28	0,50	11,21	2,15	0,07	5,81	8,46	0,30
<b>2-Pentanone</b>	-	-	0,02	0,01	-	-	0,19	-	-	0,05	0,14	-
<b>2-Heptanone</b>	-	-	0,30	0,01	-	0,04	-	0,02	-	0,22	0,16	0,01
<b>n-Nonanone</b>	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3-octanone</b>	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	0,05
<b>6-Methyl-5-hepten-2-one</b>	0,04	0,17	0,03	0,07	0,04	0,21	0,01	-	0,04	0,31	0,02	0,08
<b>Acetophenone</b>	0,03	-	0,04	0,09	0,04	-	-	0,01	0,01	-	0,04	0,02
<b>2-Nonanone</b>	-	-	0,58	0,48	-	-	0,24	-	-	0,81	0,21	0,59
<b>2-undecanone</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,37	-	-
<b>3-Pentanone</b>	0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5-Methyl-2,3-hexanedione</b>	0,02	-	0,01	-	-	-	0,01	0,02	-	-	-	0,01
<b>3-Octen-2-one</b>	-	0,02	0,01	-	0,01	0,01	0,02	-	-	0,09	0,01	-

2-Octanone	-	-	0,01	-	-	-	0,01	-	-	-	-	0,02
4-Methyl-2-pentanone	-	-	0,04	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-
4-Methyl-3-penten-2-one	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	0,01
2-Butanone	-	-	0,14	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hexanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Methylacetophenone	-	-	-	-	0,01	0,02	-	-	-	-	0,02	-
3-hydroxy-2-Butanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Εστέρες</b>												
Ethyl-2methylbutyrate	-	-	0,02	-	-	-	0,01	-	-	-	0,15	-
Butyl butyrate	-	0,03	-	0,01	0,01	-	0,02	-	0,01	-	-	-
Isobutyl Isobutyrate	-	0,02	-	0,05	0,01	0,01	0,03	0,08	-	-	0,03	-
Hexyl formate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl isoverlate	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-
Ethyl isobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl butyrate	-	-	-	-	-	-	0,06	-	-	0,03	-	-
Methyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-
n-Butyl acetate	0,03	-	0,02	0,2	0,05	-	0,03	0,28	0,07	-	0,08	0,22
Ethyl acetate	-	-	0,02	0,29	0,13	-	3,26	-	0,17	-	-	-
Acetic acid, methyl ester	-	-	-	-	0,01	-	0,09	-	-	-	-	-
cis-3-Hexenyl butyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-
n-Propyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Ethyl octanoate	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	0,85	-	-
Ethyl myristate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexanoic acid, ethyl ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-
Ethyl Nonanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-
Ethyl propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-
Ethyl tiglate	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	0,01	-
Butanoic acid, ethyl ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Οργανικά Οξέα</b>												
Phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Λοιπές Ουσίες</b>												
Limonene	0,08	0,30	0,80	0,58	0,42	0,32	0,89	0,40	0,27	0,23	0,30	1,41
Ethane,1,2-diethoxy-	-	-	-	-	-	-	0,27	-	-	-	0,37	-
Eukalypton	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-
Dimethyl sulfide	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,08
Methylene Chloride	28,42	2,09	0,61	2,19	4,11	0,44	9,31	0,18	1,86	0,99	1,56	2,47
Disulfide, dimethyl	-	-	1,21	2,24	-	-	0,52	0,05	-	-	0,04	0,32
Disulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Πίνακας 3.5.** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup> της κάθε κορυφής) σε μάρτυρες - στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C.

<b>Air (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup>)</b>						
<b>Πτητικές ουσίες</b>	<b>RT</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>14</b>
1-penten-3-ol	3,03	0,35	0,55	0,62	0,72	0,76
2-pentanone	3,11	0,58	0,33	-	-	-
4-methyl-2-pentanone	4,19	0,2	-	-	-	-
Hexenal	6,1	4,22	1,34	0,88	0,54	
1-hexanol	9	0,42	-	-	-	-
n-nonane	10,22		0,31	0,2	-	-
Heptanal	10,29	3,51	1,46	1,29	0,89	0,45
2-octanone	11,93	0,8	0,27	-	-	-
Heptyl alcohol	13,33	0,22	-	-	-	-
1-octen-3-ol	13,69	0,3	-	-	-	-
6-methyl-5-hepten-2-one	14,01	0,49	0,46	0,67	0,76	-
n-decane	14,51	0,24	0,64	0,68	-	-
n-undecane	14,51	0,45	0,48	0,51	-	-
Octanal	14,65	3,02	1,51	-	-	-
2-ethyl-1-hexanol	15,74	3,94	0,8	-	-	-
Trans-2-octenal	16,9	0,7	-	-	-	-
Acetophenone	17,17	0,53	-	0,49	-	-
1-octanol	17,46	1,79	-	-	-	-
Nonanal	18,75	8,7	15,45	13,3	9,89	7,86
Nonanol	19,89	0,41	-	-	-	-
n-dodecane	22,34	0,75	0,46	0,9	0,67	0,76
n-decanal	22,55	3,43	2,8	3,76	3	3,25
2-decenal (E)	24,53	1,55	0,35	-	-	-
1-decanol	24,91	0,22	1,9	-	-	-
Cis-6-nonen-1-ol	26,11	4,17	-	-	-	-
Trans-2-nonenal	27,98	1,32	-	-	-	-
1-dodecene	28,88	0,77	1,77	2,82	-	-

<b>n-tetradecane</b>	29,14	3,27	2,6	3,02	2,88	3,05
<b>pentadecane</b>	32,24	0,63	0,52	0,59	0,64	0,51
<b>n-eicosane</b>	33,43	0,51	0,46	0,44	0,36	0,52
<b>1-undecene</b>	33,78	0,88	-	-	-	-
<b>n-hexadecane</b>	34,07	3,89	1,45	1,46	1,22	1,38
<b>n-octadecane</b>	35,65	2,16	-	-	-	-
<b>n-tetracosane</b>	36,18	1,13	0,36	0,52	-	-

Από την αρχή, κατά τη διάρκεια και μέχρι το τέλος της συντήρησης βρέθηκαν συνολικά 95 πτητικές ουσίες (Methanethiol, Isoamyl alcohol, 1-Butanol, 2-methyl-, Nonanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Nonanol, Heptyl alcohol, cis-6-Nonen-1-ol, 3,7-Dimethyl-1-octanol, 1-Decanol, 1-Hexanol, Nonanol, Ethyl alcohol, 1-octen-3-ol, 1-Octanol, Isopropyl alcohol, 1-Penten-3-ol, Amyl alcohol, 4-Penten-2-ol, 1-pentanol, 4-methyl-, Octanol, 2-Hexen-1-ol (trans), Lauvyl alcohol, 2-Propanol, 1-butoxy-, Dimethyl sulfide, Methylene Chloride, Disulfide, dimethyl, Nonanal, n-decanal, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Hexanal, Heptanal, Octanal, n-Valeraldehyde, 2-Methyl-2-pentenal, Hexenal, 2-Methyl-1-butanal, trans-2-octenal, 3-Methyl-1-butanal, 2-Decanal, E, 2-Decenal, (E), trans-2-Nonenal, Acetaldehyde, cis-4-Heptenal, 2-Pentanal (E), 3-Methylbutyraldehyde; isovaleraldehyde, 2-Pentenal, (E), 2-Pentanal, Disulfide, Acetone, 2-Pentanone, 2-Heptanone, n-Nonanone, 3-octanone, 6-Methyl-5-hepten-2-one, Acetophenone, 2-Nonanone, 2-undecanone, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, 2-Octanone, 4-Methyl-2-pentanone, 4-Methyl-3-penten-2-one, 2-Butanone, 2-Hexanone, 4-Methylacetophenone, 3-hydroxy-2-Butanone, Ethyl-2methylbutyrate, Butyl butyrate, Isobutyl Isobutyrate, Hexyl formate, Hexyl acetate, Ethyl isovelerate, Ethyl isobutyrate, Ethyl butyrate, Methyl acetate, n-Butyl acetate, Ethyl acetate, Acetic acid, methyl ester, cis-3-Hexenyl butyrate, n-Propyl acetate, Ethyl octanoate, Ethyl myristate, Hexanoic acid, ethyl ester, Ethyl Nonanoate, Ethyl propionate, Ethyl

tiglate, Butanoic acid, ethyl ester, Phenylacetic acid, Limonene, Ethane,1,2-diethoxy-, Eukalypton).

Από αυτές, **στην αρχή της συντήρησης** ανιχνεύθηκαν 58 ουσίες (Isoamyl alcohol, 1-Butanol, 2-methyl-, Nonanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Nonanol, Heptyl alcohol, cis-6-Nonen-1-ol, 3,7-Dimethyl-1-octanol, 1-Decanol, Nonanol, Ethyl alcohol, 1-Octanol, Isopropyl alcohol, 1-Penten-3-ol, 1-pentanol, 4-methyl-, Octanol, 2-Hexen-1-ol (trans), Lauvyl alcohol, 2-Propanol, 1-butoxy-, Methylene Chloride, Nonanal, n-decanal, 2-Pentenal, Hexanal, Heptanal, Octanal, n-Valeraldehyde, Hexenal, 2-Methyl-1-butanal, 3-Methyl-1-butanal, 2-Decanal, E, 2-Decenal, (E), trans-2-Nonenal, 2-Pentanal (E), 3-Methylbutyraldehyde; isovaleraldehyde, Acetone, 6-Methyl-5-hepten-2-one, Acetophenone, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, 2-Octanone, 4-Methyl-2-pentanone, 4-Methyl-3-penten-2-one, 2-Hexanone, 4-Methylacetophenone, Butyl butyrate, Isobutyl Isobutyrate, Hexyl formate, n-Butyl acetate, Ethyl acetate, Acetic acid, methyl ester, cis-3-Hexenyl butyrate, Phenylacetic acid, Limonene, Ethane,1,2-diethoxy-, Eukalypton). Μόνο η ουσία Phenylacetic acid βρέθηκε αποκλειστικά στα *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 στην αρχή της συντήρησης.

Πέρα από τις ουσίες οι οποίες υπήρχαν από την αρχή της συντήρησης, **κατά τη συντήρηση** εμφανίζονται και άλλες ουσίες (Methanethiol, 1-Hexanol, 1-octen-3-ol, Amyl alcohol, 4-Penten-2-ol, Ethyl alcohol, Dimethyl sulfide, Disulfide, dimethyl, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Methyl-2-pentenal, trans-2-octenal, Acetaldehyde, cis-4-Heptenal, 2-Pentenal, (E), 2-Pentanal, Disulfide, 2-Pentanone, 2-Heptanone, n-Nonanone, 3-octanone, 2-Nonanone, 2-undecanone, 2-Butanone, 2-Butanone, 3-hydroxy-, Ethyl-2methylbutyrate, Hexyl acetate, Ethyl isovelerate, Ethyl isobutyrate, Ethyl butyrate, Methyl acetate, n-Propyl acetate, Ethyl

octanoate, Ethyl myristate, Hexanoic acid, ethyl ester, Ethyl Nonanoate, Ethyl propionate, Ethyl tiglate, Butanoic acid, ethyl ester). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 0°C ανιχνεύθηκαν συνολικά 20 πτητικές ουσίες να αυξάνονται (Methanethiol, Isoamyl alcohol, 1-Butanol, 2-methyl-, Nonanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 2- Heptyl alcohol, 1-Decanol, 1-Hexanol, 1-octen-3-ol, Isopropyl alcohol, Dimethyl sulfide, Methylene Chloride, Disulfide, dimethyl, Nonanal, n-decanal, Acetone, 2-Pentanone, 6-Methyl-5-hepten-2-one, 2-Nonanone, 2-undecanone, 3-Octen-2-one, Limonene, Ethane,1,2-diethoxy-). Επιπλέον, ορισμένες πτητικές ουσίες βρέθηκαν είτε να μειώνονται ή να εξαφανίζονται. Ανάμεσα σε αυτές, οι 1-Penten-2-ol, Octanol, 2-Hexen-1-ol (trans), Lauvyl alcohol, Octanal, n-Valeraldehyde, Hexenal και 2-Decanal (E) εξαφανίστηκαν κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες μειώνονταν.

**Στο τέλος της συντήρησης** ανιχνεύθηκαν συνολικά 59 πτητικές ουσίες (Methanethiol, Isoamyl alcohol, 1-Butanol, 2-methyl-, Nonanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Nonanol, Heptyl alcohol, cis-6-Nonen-1-ol, 3,7-Dimethyl-1-octanol, 1-Decanol, 1-Hexanol, Nonanol, Ethyl alcohol, 1-octen-3-ol, Dimethyl sulfide, Methylene Chloride, Disulfide, dimethyl, Nonanal, n-decanal, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Hexenal, Heptanal, Octanal, n-Valeraldehyde, 2-Methyl-2-pentenal, Hexenal, 2-Methyl-1-butanal, trans-2-octenal, Acetone, 2-Pentanone, 2-Heptanone, n-Nonanone, 3-octanone, 6-Methyl-5-hepten-2-one, Acetophenone, 2-Nonanone, 2-undecanone, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, 2-Octanone, 4-Methyl-2-pentanone, 4-Methyl-3-penten-2-one, 2-Butanone, Ethyl-2methylbutyrate, Butyl butyrate, Isobutyl Isobutyrate, Hexyl formate, Hexyl acetate, Ethyl isovelerate, Ethyl isobutyrate, Ethyl butyrate, Methyl acetate, n-Butyl acetate, Ethyl acetate, Limonene, Ethane,1,2-diethoxy-).

Διάφορες ουσίες, οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, εμφανίστηκαν στο τέλος της συντήρησης, όπως για παράδειγμα η ουσία trans-2-octenal, η οποία εμφανίστηκε αποκλειστικά στις συγκαλλιέργειες κοντά στις 20 ημέρες περίπου. Επιπλέον, σε συγκεκριμένα είδη / στελέχη του *Pseudomonas* την αποκλειστικότητα είχαν οι ουσίες 1-octen-3-ol και 2-methyl-2-pentenal στα *Pseudomonas vranovensis* την 20<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C, η methyl acetate στα *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, καθώς και οι isobutyraldehyde, lauric aldehyde και hexyl acetate στα *Pseudomonas fragi* JCM 5435, την ίδια μέρα και στις ίδιες συνθήκες συντήρησης.

### 3.2.2 Πτητικές ουσίες μικροβιακής δραστηριότητας

Μικροβιακής δραστηριότητας θεωρήθηκαν οι ουσίες οι οποίες βρέθηκαν στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα και όχι στα μοντέλα μάρτυρες αλλά και οι ουσίες οι οποίες βρέθηκαν στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τους μάρτυρες.

- 1) Οι ουσίες που βρέθηκαν **στους μάρτυρες** ήταν οι εξής: 1-penten-3-ol, 2-pentanone, 4-methyl-2-pentanone, Hexenal, 1-hexanol, n-nonane, Heptanal, 2-octanone, Heptyl alcohol, 1-octen-3-ol, 6-methyl-5-hepten-2-one, Octanal, 2-ethyl-1-hexanol, Trans-2-octenal, Acetophenone, 1-octanol, Nonanal, Nonanol, n-dodecane, n-decanal, 2-decenal (E), 1-decanol, Cis-6-nonen-1-ol, Trans-2-nonenal, 1-dodecene, n-tetradecane, pentadecane, n-eicosane, 1-undecene, n-hexadecane, n-octadecane, n-tetracosane.
- 2) Οι ουσίες που βρέθηκαν **στα ενοφθαλμισμένα** και **όχι** στους **μάρτυρες** (άρα **μικροβιακής δραστηριότητας**) είναι: η Ethyl-2-methylbutyrate σε όλα τα ενοφθαλμισμένα, η ουσία Ethyl isovalerate στους *Pseudomonas fragi* JCM

5435, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11, η ουσία Ethyl tiglate στους *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas migulae* P11 και στις συγκαλλιέργειες, η Hexanoic acid, ethyl ester στους πληθυσμούς των *Pseudomonas fragi* MA07 και στις συγκαλλιέργειες, η ουσία 2-nonanol στους *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, η ουσία 2-nonanone στους *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* και *Pseudomonas fluorescens* LMG, η Ethyl octanoate στους *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas migulae* P11 και στις συγκαλλιέργειες, η 2-undecanone στους *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και στους *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435.

Επιπλέον, ορισμένες πτητικές ουσίες βρέθηκαν **αποκλειστικά** σε κάποια είδη / στελέχη του *Pseudomonas* στους 0°C όπως είναι: η octanol στα *Pseudomonas migulae* P11, η ethyl alcohol στα *Pseudomonas vranovensis*, η n-propyl acetate στα *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, η ethyl myristate στα *Pseudomonas fragi* JCM 5396 και η ethyl Nonanoate στις συγκαλλιέργειες, την 8<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Την 16<sup>η</sup> μέρα έχουμε την αποκλειστικότητα των: amyl alcohol στα *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, 2-Propanol-1-butoxy στα *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, cis-4-Heptenal, 2-Pentenal (E) και 2,3-Dimethyl-4-hydroxy στα *Pseudomonas migulae* P11, Disulfide στα *Pseudomonas vranovensis*, Hexanoic acid, ethyl ester στα *Pseudomonas fragi* MA07.

- 3) Οι ουσίες που βρέθηκαν στους **μάρτυρες αλλά και στα ενοφθαλμισμένα** ήταν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Η μοναδική ουσία, η οποία βρέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν η 2-ethyl-1-hexanol ( $15,12 * 10^6$ ) στις συγκαλλιέργειες την 20<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Είναι κοινά αποδεκτό από διάφορες βιβλιογραφικές πηγές ότι τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους ΕΑΜ στην τσιπούρα (Alvarez et al., 2008; Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou et al. 2002, Parlapani et al. 2014, 2015). Πράγματι, τα *Pseudomonas* spp. είναι οι μικροοργανισμοί που φθάνουν στους υψηλότερους πληθυσμούς από περίπου τα μέσα του χρόνου συντήρησης και επικρατούν μέχρι το χρόνο απόρριψης στους 0°C (Koutsoumanis & Nychas 2000, Parlapani et al. 2014, 2015).

Οι πτητικές ουσίες μελετούνται για να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης διότι μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας απόρριψης κατά τη διάρκεια συντήρησης των αλιευμάτων (Joffraud et al. 2001, Jorgensen et al. 2001, Chung et al. 2002, Duflos et al. 2006, Edirisinghe et al. 2007, Soncin et al. 2008, Selli & Cayhan 2009 Iglesias et al. 2010, Parlapani et al. 2014). Η παραγωγή αλκοολών, αλδεϋδών και κετονών, κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης των ιχθύων, οφείλεται κυρίως σε μικροβιακή δράση, η οποία είναι από τις σημαντικότερες αιτίες που επιδρούν στην ποιότητα των ιχθύων (Josephson et al. 1983, Gram & Huss 1996, Jorgensen et al. 2001). Οι αζωτούχες αλδεϋδες, κετόνες, εστέρες και τα σουλφίδια συνδέονται με τη δράση των *Pseudomonas* spp. (Edwards et al. 1987, Dainty et al. 1989).



Η Ethyl-2-methylbutyrate, η οποία ανιχνεύθηκε σε όλα τα ενοφθαλμισμένα μοντέλα, έχει βρεθεί να οφείλεται σε μικροβιακή δραστηριότητα σε απεντερομένα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) και σε ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*), στους 2°C (Parlapani et al. 2015a,c), καθώς και σε φιλέτα τσιπούρας στους 0, 5 και 15 °C σε συνθήκες αέρα και MAP (Parlapani et al. 2014). Η ουσία Ethyl isovalerate, η οποία βρέθηκε να παράγεται από τη δράση των *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* και *Pseudomonas migulae* P11 στην παρούσα μελέτη, έχει βρεθεί στο παρελθόν να συνδέεται επίσης με τη μικροβιακή δράση σε απεντερομένα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) και σε ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*) αποθηκευμένα στους 2°C (Parlapani et al. 2015a,c), καθώς και σε φιλέτα τσιπούρας στους 0, 5 και 15 °C σε συνθήκες αποθήκευσης αέρα και MAP (Parlapani et al. 2014). Τα *Pseudomonas* αποτέλεσαν τον επικρατέστερο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις (Parlapani et al. 2014, 2015a,c).

Η παραγωγή του 3-hydroxy-2-Butanone οφείλεται σε μικροβιακή δραστηριότητα σε φιλέτα τσιπούρας στους 0°C (Parlapani et al. 2014, Soncin et al. 2008). Άλλες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε φιλέτα του είδους *Melanogrammus aeglefinus* και *Gadus morhua* στους 0 και 0.5 °C αντίστοιχα, έχουν καταλήξει στο ίδιο συμπέρασμα (Olafsdottir 2005, Olafsdottir et al. 2005). Πράγματι, σύμφωνα με την παρούσα εργασία η συγκεκριμένη πτητική ουσία παράχθηκε στις καλλιέργειες, και πιο συγκεκριμένα αποκλειστικά στην μονοκαλλιέργεια των *Pseudomonas fragi* JCM 5435.

Μια άλλη ουσία η οποία έχει βρεθεί να είναι προϊόν μικροβιακής δραστηριότητας σε ιχθύες τσιπούρας στους 0°C είναι η dimethyl disulfide (Alasalvar et al. 2005). Σε ψάρια του είδους *Sebastes melanops* σε συνθήκες συντήρησης 0°C, η

ουσία αυτή βρέθηκε να προκαλείται από την δράση των *Pseudomonas fluorescens*. Στην παρούσα εργασία η ουσία dimethyl disulfide βρέθηκε σε όλες τις μονοκαλλιέργειες καθώς και στις συγκαλλιέργειες, εμφανίζοντας την υψηλότερη συγκέντρωση ( $4,46 * 10^6$ ) στους πληθυσμούς των *Pseudomonas fluorescens* DF41TB.

Η ουσία Ethyl propionate εμφανίστηκε αποκλειστικά στις συγκαλλιέργειες καθώς και στις μονοκαλλιέργειες των ειδών / στελεχών *Pseudomonas fragi* MA07 και *Pseudomonas vranovensis*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η ουσία αυτή βρέθηκε να οφείλεται σε μικροβιακή δραστηριότητα σε ιχθύες τσιπούρας στους 2°C, όπου τα *Pseudomonas* αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό (Parlapani et al. 2015a,c).

Η αλκοόλη 2-ethyl-1-hexanol ανιχνεύθηκε σε αρκετά υψηλές ποσότητες στις συγκαλλιέργειες ( $15,12 * 10^6$ ) καθώς εμφανίστηκε και στους *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovensis*. Η ουσία αυτή έχει βρεθεί στο παρελθόν να συνδέεται με τη μικροβιακή δράση σε απεντερομένα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) και σε ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*) αποθηκευμένα στους 2°C (Parlapani et al. 2015a,c), σε φιλέτα τσιπούρας στους 0, 5 και 15 °C σε συνθήκες αποθήκευσης αέρα και MAP (Parlapani et al. 2014), καθώς και σε κρυο-καπνιστό σολωμό (κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια) αποθηκευμένο υπο συνθήκες κενού στους 5 °C (Jørgensen et al. 2001).

Οι ουσίες που έχουν αναφερθεί ως πιθανοί χρήσιμοι χημικοί δείκτες κατά την αλλοίωση των ιχθύων τσιπούρας σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι η Ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 2-ethyl-1-hexanol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 3-hydroxy-2-butanone, ethyl acetate, ethyl propionate, ethyl isobutyrate, ethyl-2-methylbutyrate, ethyl isovalerate στους 2°C (Parlapani et al.

2015a,c), Ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-ethyl-1-hexanol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 2,3-pentanedione, ethyl-2-methylbutyrate, ethyl isovalerate, ethyl hexanoate στους 0, 5 και 15 °C σε συνθήκες αέρα και MAP (Parlapani et al. 2014), 2-Methyl-1-butanol, 2-heptanone, 3-Hydroxy-2-butanone, acetic acid στους 0°C σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας (Parlapani et al. 2014), 3-Methyl-1-butanol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 2,3-pentanedione, 3-hydroxy-2-butanone σε συνθήκες πάγου (Soncin et al. 2008) και 1-penten-3-ol and 3-methyl-1-butanol, dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide, acetic acid, trimethylamine σε πάγο (Alasalvar et al. 2005). Πράγματι, κάποιες από τις ουσίες αυτές προέκυψε από την παρούσα εργασία ότι ανιχνεύονται σε συγκεκριμένα είδη / στελέχη του *Pseudomonas* σε αλλοιωμένους ιχθύες.

Εξαιτίας της αποτελεσματικότητας των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, μελλοντική προτεραιότητα αποτελεί η συνέχεια των ερευνών σχετικά με το δυναμικό και την ικανότητα αλλοίωσης και άλλων μικροοργανισμών στους ιχθύες Μεσογειακής προέλευσης. Νέοι τύποι μικροοργανισμών που πιθανόν να συνεισφέρουν στην αλλοίωση των ιχθύων Μεσογειακής προέλευσης ‘φανερώνονται’ συνεχώς με την εφαρμογή μοντέρνων μοριακών τεχνικών. Η ικανότητα των νεοεμφανιζόμενων μικροοργανισμών να παράγουν ουσίες οι οποίες οδηγούν στην αλλοίωση των αλιευτικών προϊόντων, αποτελεί μια νέα μελλοντική προτεραιότητα για βαθύτερη κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης, με τις μοντέρνες τεχνικές χημικής ανάλυσης (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στο τέλος της συντήρησης το *Pseudomonas fluorescens* DF41TB αποτέλεσε τον μικροοργανισμό που έφθασε στα υψηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα (9.48 log cfu/g) σε σχέση με τους υπόλοιπους που μελετήθηκαν.
- Τα *Pseudomonas fragi* JCM 5435 με 9.41 log cfu/g και *Pseudomonas fragi* JCM 5396 με 9.35 log cfu/g αποτέλεσαν το δεύτερο και τρίτο, αντίστοιχα, μικροοργανισμό που έφθασε στα υψηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα, σε σχέση με τους υπόλοιπους στις μονοκαλλιέργειες.
- Οι τελικοί πληθυσμοί των υπόλοιπων ειδών στελεχών του *Pseudomonas* εμφανίστηκαν με ελάχιστα χαμηλότερες τιμές με τη μικρότερη να φτάνει τα 5.95 log cfu/g για το *Pseudomonas vranovensis*.
- Ο ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) των *Pseudomonas fragi* JCM 5396 είχε την υψηλότερη τιμή από όλα τα υπόλοιπα είδη / στελέχη του *Pseudomonas* σε αντίθεση με τα *Pseudomonas vranovensis* που παρουσίασαν το χαμηλότερο ειδικό ρυθμό αύξησης.
- Η φάση προσαρμογής διήρκησε περισσότερο στα *migulae* P11, ενώ η πιο σύντομη με διαφορά σημειώθηκε στα *Pseudomonas fluorescens* LMG.
- Οι πτητικές ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα ιχθύος τσιπούρας παρουσίασαν ποικίλες μεταβολές (αύξηση, μείωση, αυξομείωση, εμφάνιση και εξαφάνιση ουσιών) κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι ουσίες που, σύμφωνα με την παρούσα εργασία και με βάση την βιβλιογραφία, βρέθηκαν να είναι μικροβιακής δραστηριότητας ανιχνεύθηκαν στα εξής είδη /στελέχη του *Pseudomonas*:
  - 1) Ethyl-2-methylbutyrate σε όλα τα ενοφθαλμισμένα,

- 2) Ethyl isovalerate στους *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11,
- 3) Ethyl tiglate στους *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas migulae* P11 και στις συγκαλλιέργειες,
- 4) Hexanoic acid, ethyl ester στους πληθυσμούς των *Pseudomonas fragi* MA07 και στις συγκαλλιέργειες,
- 5) 2-nonanol στους *Pseudomonas fluorescens* DF41TB,
- 6) 2-nonanone στους *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* και *Pseudomonas fluorescens* LMG,
- 7) Ethyl octanoate στους *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas migulae* P11 και στις συγκαλλιέργειες,
- 8) 3-hydroxy-2-Butanone στους *Pseudomonas fragi* JCM 5435,
- 9) dimethyl disulfide σε όλα τα ενοφθαλμισμένα,
- 10) Ethyl propionate στους *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas vranovensis*. και στις συγκαλλιέργειες,
- 11) 2-ethyl-1-hexanol στους *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovensis* και στις συγκαλλιέργειες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Alasalvar, C., Taylor, K.D.A. & Shahidi, F. (2005). Comparison of Volatiles of Cultured and Wild Sea Bream (*Sparus aurata*) during Storage in Ice by Dynamic Headspace Analysis/Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2616-2622.

Álvarez A., García García B., Garrido M.D., Hernández M.D. (2008) The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*, 284: 106-114.

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

Baranyi J., Roberts T. A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 23, Issues 3–4, pp. 277–294.

Blickstad E. (1984) Influence of water activity on microbial development in minced, cured pork, in relation to gas headspace composition, *Food Microbiology*, Volume 1, Issue 3, pp. 177-185.

Blickstad E., Molin G. (1984) Growth and end-product formation in fermenter cultures of *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509T and two psychrotrophic *Lactobacillus* spp. in different gaseous atmospheres. *Journal of Applied Bacteriology*, 57: 213-220.

Bozianis I. S., 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.

- Chung H. Y., Yung I. K. S., Ma W. C. J., Kim J.-S. (2002) Analysis of volatile components in frozen and dried scallops (*Patinopecten yessoensis*) by gas chromatography/mass spectrometry. *Food Research International*, 35: 43–53.
- Colwell R. R., Liston J. (1962) Bacterial flora on seven species of fish collected at Rongelap and Eninetok Atols. *Pacific Science*, 16: 264-270.
- Dainty R.H. (1996) Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 19-33.
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard C.M. (1989) Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49: 473-486.
- Dalgaard P. (1995a) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 319-333.
- Dalgaard P. (1995b) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life of packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 305-318.
- Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993) Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283–294.
- Dalgaard P., Mejlholm O., Christiansen T.J., Huss H.H. (1997) Importance of *Photobacterium Phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere packed fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 373-378.
- Dalgaard, P. (2003). Spoilage of seafood. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (eds), *Encyclopedia of food science and nutrition*. Academic Press, London, pp. 2462-2472.
- Drosinos E. H., Nychas G.-J. E. (1996) *Brochothrix thermosphacta*, a dominant microorganism in Mediterranean fresh fish (*Sparus aurata*) stored under modified atmosphere *Italian Journal of Food Science and Technology*, 4: 323-330.
- Drosinos E. H., Board R. G. (1995) Microbial and physicochemical attributes of minced lamb: sources of contamination with pseudomonads, *Food Microbiology*, Volume 12, pp. 189-197.

Drosinos E.H., Board R.G. (1994). Metabolic activities of pseudomonads in batch cultures in extract of minced lamb. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 613-620.

Drosinos E.H., Lambropoulou K., Mitre E., Nychas G-J.E. (1997) Attributes of fresh gilt Seabream (*Sparus aurata*) fillets treated with potassium sorbate, sodium gluconate and stored under a modified atmosphere at  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ . *Journal of Applied Microbiology*, 83: 569-575.

Duflos G., Coin V.M., Cornu M., Antinelli J.F., Malle P. (2006) Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/ gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 600–611.

Edirisinghe R. K.B., Graham A. J., Taylor S.J. (2007) Characterisation 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.

Edwards R.A., Dainty R.H., Hibbard C.M. (1987) Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strains during growth on beef stored in air at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 62: 403-412.

Field C.E., Pivarnic L.F., Barnett S.M., Rand A.G. (1986) Utilization of glucose oxidase for extending the shelf life of fish. *Journal of Food Science*, 51: 66-70.

Gill T. A. (1986) *Processing Aquatic Food Products*, Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, Volume 19, Issue 4, pp. 143.

Gillespie N.C., Macrae C. (1975) The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*, 39: 91-100.

Gram L., Dalgaard P. (2002) Fish spoilage bacteria: Problems and solutions. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 262-266.

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



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

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.

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, HH. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper, No.348, FAO, Rome.

Iglesias J., Gallardo M.J., Medina I. (2010) Determination of carbonyl compounds in fish species samples with solid phase microextraction with on-fibre derivatization. *Food Chemistry*, 123: 771–778.

Jay I. G., Smith R. L., Cohen S. M., Doull J., Feron V. J., Marnett L. J., Munro I. C., Philip S., Waddell W. J., Wagner B. M., Adams T. B. (2005) Criteria for the safety evaluation of flavoring substances: The Expert Panel of the Flavor and Extract Manufacturers Association, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 43, Issue 8, pp. 1141-1177.

Joffraud J.J., Leroi F., Roy C., Berdague J.L. (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66: 175-181.

Jorgensen L.V., Huss H.H., Dalgaard P. (2001) Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analysed by GC-MS and Multivariate Regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2376-2381.

Josephson D.B., Lindsay R.C., Stuibler D.A. (1983) Identification of compounds characterizing the aroma of fresh whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 326–330.

Koutsoumanis K., Lampropoulou K., Nychas G.-J.E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream stored aerobically at 0, 8 and 15 °C. *Journal of Food Protection*, 62: 398-402.

Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E. (2000). Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf-life predictions. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 171-184.

Kyranas V.R., 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(3): 319–328.

Lannelongue M., Finne G., Hanna M.O., Nickelson R., Vanderzani C. (1982) Microbiological and Chemical changes during storage of Swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO<sub>2</sub> –Enriched atmospheres. *Journal of Food Protection*, 45: 1197-1203.

Leisner J. J., Gram L. (1999) FISH-Spoilage of Fish, *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 813-820.

Liston J. (1980) Microbiology in fishery science. In Connell J.J. (ed) *Advances in Fish Science and Technology*. Fishing News Books, Ltd, Farnham, Surrey, UK 138-157.

Liston T. V., Benkesser R. A., Stanton G. M. (1960) Substituent effects in aromatic substitution, *Tetrahedron Letters*, Volume 1, Issue 36, pp. 1-4.

Miller A., Scanlan R.A., Lee J.S., Libbey L.M. (1973a) Volatile compounds produced in ground muscle tissue of canary rockfish (*Sebastes pinniger*) stored on ice. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29: 1125–1129.

Miller A., Scanlan R.A., Lee J.S., Libbey L.M. (1973b) Identification of the volatile compounds produced in sterile muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and an *Achromobacter* species. *Applied Microbiology*, 26(1): 18-21.

Morita R.Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39: 144-167.

Nychas, G.-J.E., Arkoudelos J.S. (1991) The influence of *Brochothrix thermosphacta* on the quality of minced meat. *Agricultural Research*, 15: 103-115.

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", pp. 339-345.

Oehlenschläger J. (1997) 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, Paris, pp. 92-99.

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, Paris, pp. 92-99.

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

Olafsdottir, G., Jonsdottir, R., Lauzon H.L., Luten, J. & Kristbergsson, K. (2005). Characterization of Volatile Compounds in Chilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets by Gas Chromatography and Detection of Quality Indicators by an Electronic Nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10140 -10147.

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

Parlapani F.F., Kormas K. Ar., Boziaris I. S. (2014) 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 Food and Agriculture* 95: 2386-2394.

Parlapani F.F., Mallouchos 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.

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

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

Shewan J.M. (1977) The bacteriology of fresh fish and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. *Proceedings of the Conference on “Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish”*. pp. 51-66.

Soncin S., Chiesa M. L., Panseri S., Biondi P., Cantoni C. (2008) Determination of volatile compounds of precooked prawn (*Penaeus vannamei*) and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice as possible spoilage markers using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 436–442.

Taoukis P.S., Koutsoumanis K. and Nychas G.-J.E. (1999a). Modelling of spoilage microflora of boque (*Boops boops*) as a basis for chilled distribution monitoring with time-temperature indicators. In: Bourgeois C.M., Roberts T.A (Eds.) *Predictive Microbiology Applied to Chilled Food Preservation (Proceedings of the International Symposium, Quimper, France. June 16-18, 1997)*. Refrigeration Science and Technology Proceedings, Series, International Institute of Refrigeration (IIR), Paris, France, pp. 316-325.

Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G.-J.E. (1999b) Use of Time Temperature Integrators and Predictive Modelling for Shelf Life Control of Chilled Fish under Dynamic Storage Conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 53: 21-31.

Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas G.-J.E. (2002) Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 65-72.

Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Vancanneyt M., Hoste 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.

Wood E. J. F. (1953) Heterotrophic bacteria in marine environments in eastern Australia. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research*, 4: 160-200.

## **6.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία**

[www.chimikoergastirio.blogspot.gr](http://www.chimikoergastirio.blogspot.gr) (Ημερομηνία πρόσβασης: 26.06.2016)

## ABSTRACT

Microbial spoilage is the main quality degradation mechanism to fresh fish, as observed microbial growth and metabolite production by the Specific Spoilage Organisms (SSOs), which are responsible for the characteristic odors in food. The purpose of this Undergraduate thesis was to monitor changes in population, the assessment of the main kinetic parameters and the study of volatile metabolic products at 0°C with modern analytical methods (SPME / GC-MS), the main spoilage microorganisms of the genus *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida* / *fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11).

At the end of storage, *Pseudomonas fluorescens* DF41TB found at higher population level (9.48 log cfu / g) than the rest microorganisms tested. *Pseudomonas fragi* JCM 5435 and *Pseudomonas fragi* JCM 5396 were found at final population levels of 9.41 and 9.35 log cfu / g respectively. The specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of *Pseudomonas fragi* JCM 5396 was the highest of all the other species / strains of *Pseudomonas*, whereas *Pseudomonas vranovensis* showed the lowest.

The volatile compounds were detected in sea bream (*Sparus aurata*) models, showed various changes during storage. Volatiles are related with microbial activity found to be the following: the Ethyl-2-methylbutyrate in all inoculated samples, the Ethyl isovalerate in *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida* / *fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11, the Ethyl tiglate in *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida* / *fragi* JCM 5435, *Pseudomonas migulae* P11 and in co-cultures, the Hexanoic acid, ethyl ester in *Pseudomonas fragi* MA07 and in co-cultures, the 2-nonanol in

*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, the 2-nonanone in *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* and *Pseudomonas fluorescens* LMG, the Ethyl octanoate in *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas migulae* P11 and in co-cultures, the 3-hydroxy-2-Butanone in *Pseudomonas fragi* JCM 5435, the Disulfide, dimethyl in all inoculated, the Ethyl propionate in *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas vranovensis*. and in co-cultures, the 2-ethyl-1-hexanol in *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida* / *fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* and in co-cultures.

**Keywords:** *Sea bream (Sparus aurata)*, *Specific Spoilage Organisms (SSOs)*, *Microbial growth*, *Volatile metabolites*.

# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**



## ΠΗΓΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΥΝΟΛΙΚΑ

### Αλκοόλες

Methanethiol, Isoamyl alcohol, 1-Butanol, 2-methyl-, Nonanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Nonanol, Heptyl alcohol, cis-6-Nonen-1-ol, 3,7-Dimethyl-1-octanol, 1-Decanol, 1-Hexanol, Nonanol, Ethyl alcohol, 1-octen-3-ol, 1-Octanol, Isopropyl alcohol, 1-Penten-3-ol, Amyl alcohol, 4-Penten-2-ol, 1-pentanol, 4-methyl-, Octanol, 2-Hexen-1-ol (trans), Lauvyl alcohol, 1-butoxy-2-Propanol.

### Αλδεΐδες

Nonanal, n-decanal, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Hexanal, Heptanal, Octanal, n-Valeraldehyde, 2-Methyl-2-pentenal, Hexenal, 2-Methylbutyraldehyde, trans-2-octenal, 3-Methylbutyraldehyde, 2-Decanal, E, 2-Decenal, (E), trans-2-Nonenal, Acetaldehyde, cis-4-Heptenal, 2-Pentanal (E), 3-Methylbutyraldehyde; isovaleraldehyde, 2-Pentenal, (E), 2-Pentanal.

### Κετόνες

Acetone, 2-Pentanone, 2-Heptanone, n-Nonanone, 3-octanone, 6-Methyl-5-hepten-2-one, Acetophenone, 2-Nonanone, 2-undecanone, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, 2-Octanone, 4-Methyl-2-pentanone, 4-Methyl-3-penten-2-one, 2-Butanone, 2-Hexanone, 4-Methylacetophenone, 4-Hexene-3-one, 3,4-Hexanedione, 3-hydroxy-2-Butanone.

### Εστέρες

Ethyl-2methylbutyrate, Butyl butyrate, Isobutyl Isobutyrate, Hexyl formate, Hexyl acetate, Ethyl isovelerate, Ethyl isobutyrate, Ethyl butyrate, Methyl acetate, n-Butyl acetate, Ethyl acetate, cis-3-Hexenylpropionate, cis-3-Hexenyl isovalerate, Acetic acid, methyl ester, cis-3-Hexenyl butyrate, n-Propyl acetate, Ethyl octanoate, Ethyl

myristate, Hexanoic acid, ethyl ester, Ethyl Nonanoate, cis-3-Hexenyl acetate, Ethyl propionate, Ethyl tiglate, Butanoic acid, ethyl ester.

**Οργανικά Οξέα**

Phenylacetic acid

**Λοιπές Ουσίες**

Limonene, Ethane,1,2-diethoxy-, Eukalypton, Dimethyl sulfide, Methylene Chloride,

Disulfide, dimethyl, Disulfide.

**ΠΙΘΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ**

Isoamyl alcohol, 1-Butanol, 2-methyl-, Nonanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Nonanol, Heptyl alcohol, cis-6-Nonen-1-ol, 3,7-Dimethyl-1-octanol, 1-Decanol, Nonanol, Ethyl alcohol, 1-Octanol, Isopropyl alcohol, 1-Penten-3-ol, 1-pentanol, 4-methyl-, Octanol, 2-Hexen-1-ol (trans), Lauvyl alcohol, 2-Propanol, 1-butoxy-, Methylene Chloride, Nonanal, n-decanal, 2-Pentenal, Hexanal, Heptanal, Octanal, n-Valeraldehyde, Hexenal, 2-Methyl-1-butanal, 3-Methyl-1-butanal, 2-Decanal, E, 2-Decenal, (E), trans-2-Nonenal, 2-Pentanal (E), 3-Methylbutyraldehyde; isovaleraldehyde, Acetone, 6-Methyl-5-hepten-2-one, Acetophenone, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, 2-Octanone, 4-Methyl-2-pentanone, 4-Methyl-3-penten-2-one, 2-Hexanone, 4-Methylacetophenone, Butyl butyrate, Isobutyl Isobutyrate, Hexyl formate, n-Butyl acetate, Ethyl acetate, Acetic acid, methyl ester, cis-3-Hexenyl butyrate, Phenylacetic acid, Limonene, Ethane,1,2-diethoxy-, Eukalypton.

**ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΣΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ**

Methanethiol, 1-Hexanol, 1-octen-3-ol, Amyl alcohol, 4-Penten-2-ol, Ethyl alcohol, Dimethyl sulfide, Disulfide, dimethyl, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Methyl-2-pentenal, trans-2-octenal, Acetaldehyde, cis-4-Heptenal, 2-Pentenal, (E), 2-Pentanal, Disulfide, 2-Pentanone, 2-Heptanone, n-Nonanone, 3-octanone, 2-Nonanone, 2-undecanone, 2-Butanone, 2-Butanone, 3-hydroxy-, Ethyl-2methylbutyrate, Hexyl acetate, Ethyl isovelerate, Ethyl isobutyrate, Ethyl butyrate, Methyl acetate, n-Propyl acetate, Ethyl octanoate, Ethyl myristate, Hexanoic acid, ethyl ester, Ethyl Nonanoate, Ethyl propionate, Ethyl tiglate, Butanoic acid, ethyl ester.

**ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΞΑΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ**

1-Penten-2-ol, Octanol, 2-Hexen-1-ol (trans), Lauvyl alcohol, Octanal, n-Valeraldehyde, Hexenal και 2-Decanal (E).

**ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΣΕ  
ΚΑΠΟΙΑ ΕΙΔΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ**

**8<sup>η</sup> ημέρα**

Octanol	<i>Pseudomonas migulae</i> P11
Ethyl alcohol	<i>Pseudomonas vranovensis</i>
n-propyl acetate	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB
Ethyl myristate	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396
Ethyl Nonanoate	Συγκαλλιέργειες

**16<sup>η</sup> ημέρα**

Amyl alcohol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB
--------------	---------------------------------------

2-Propanol-1-butoxy	<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435
Cis-4-Heptenal	<i>Pseudomonas migulae</i> P11
2-Pentenal (E)	
Disulfide	<i>Pseudomonas vranovensis</i>
2-Butanone, 3-hydroxy	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435
Hexanoic acid, ethyl ester	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07, Συγκαλλιέργειες (8 <sup>η</sup> ημέρα)
Ethyl propionate	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07, <i>Pseudomonas vranovensis</i> , Συγκαλλιέργειες (16 <sup>η</sup> ημέρα)

#### ΠΗΚΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Methanethiol, Isoamyl alcohol, 1-Butanol, 2-methyl-, Nonanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Nonanol, Heptyl alcohol, cis-6-Nonen-1-ol, 3,7-Dimethyl-1-octanol, 1-Decanol, 1-Hexanol, Nonanol, Ethyl alcohol, 1-octen-3-ol, Dimethyl sulfide, Methylene Chloride, Disulfide, dimethyl, Nonanal, n-decanal, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Hexanal, Heptanal, Octanal, n-Valeraldehyde, 2-Methyl-2-pentenal, Hexenal, 2-Methyl-1-butanal, trans-2-octenal, Acetone, 2-Pentanone, 2-Heptanone, n-Nonanone, 3-octanone, 6-Methyl-5-hepten-2-one, Acetophenone, 2-Nonanone, 2-undecanone, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, 2-Octanone, 4-Methyl-2-pentanone, 4-Methyl-3-penten-2-one, 2-Butanone, Ethyl-2methylbutyrate, Butyl butyrate, Isobutyl Isobutyrate, Hexyl formate, Hexyl acetate, Ethyl isovelerate, Ethyl isobutyrate, Ethyl butyrate, Methyl acetate, n-Butyl acetate, Ethyl acetate, Limonene, 1,2-diethoxy-Ethane.

ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΣΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ, ΑΛΛΑ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΜΟΝΟ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΕΙΔΗ / ΣΤΕΛΕΧΗ (20 <sup>Η</sup> ΗΜΕΡΑ).	
Trans-2-octenal	Συγκαλλιέργειες
1-octen-3-ol	<i>Pseudomonas vranovensis</i> , Συγκαλλιέργειες
2-methyl-2-penten	<i>Pseudomonas vranovensis</i>
Methyl, acetate	<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435, Συγκαλλιέργειες (8 <sup>η</sup> ημέρα)
Isobutyraldehyde	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435
Lauric aldehyde	
Hexyl acetate	

ΥΨΗΛΟΤΕΡΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ	
Disulfide, dimethyl	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB (4,46 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
Acetone	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396 (8,16 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα (4,35 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG (13,26 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα (6,80 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas migulae</i> P11 (11,21 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα

	(2,15 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB (5,78 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07 (11,72 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435 (6,50 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα
	Συγκαλλιέργειες (8,46 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα
2-Ethyl-1-hexanol	Συγκαλλιέργειες (15,12 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07 (3,16 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435 (2,33 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas vranovensis</i> (1,58 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα
Methylene Chloride	Συγκαλλιέργειες (2,47 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα → (2 <sup>η</sup> υψηλότερη συγκέντρωση στις συγκαλλιέργειες) (1,56 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα
	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435 (9,23 * 10 <sup>6</sup> ) την 16 <sup>η</sup> ημέρα (3,39 * 10 <sup>6</sup> ) την 20 <sup>η</sup> ημέρα

**ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΜΟΝΟ ΣΤΟΥΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ**

1-penten-3-ol, 2-pentanone, 4-methyl-2-pentanone, Hexenal, 1-hexanol, n-nonane, Heptanal, 2-octanone, Heptyl alcohol, 1-octen-3-ol, 6-methyl-5-hepten-2-one, Octanal, 2-ethyl-1-hexanol, Trans-2-octenal, Acetophenone, 1-octanol, Nonanal, Nonanol, n-dodecane, n-decanal, 2-decenal (E), 1-decanol, Cis-6-nonen-1-ol, Trans-2-nonenal, 1-dodecene, n-tetradecane, pentadecane, n-eicosane, 1-undecene, n-hexadecane, n-octadecane, n-tetracosane.

**ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΜΟΝΟ ΣΤΑ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΕΝΑ**

Ethyl-2-methylbutyrate	Σε όλα
Ethyl isovalerate	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435 <i>Pseudomonas fragi</i> MA07 <i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435 <i>Pseudomonas vranovensis</i> <i>Pseudomonas migulae</i> P11
Ethyl tiglate	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07 <i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435 <i>Pseudomonas migulae</i> P11 συγκαλλιέργειες
Hexanoic acid, ethyl ester	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07 Συγκαλλιέργειες
2-nonanol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB
2-nonanone	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB

	<p><i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396</p> <p><i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435</p> <p><i>Pseudomonas vranovensis</i></p> <p><i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG</p>
Ethyl octanoate	<p><i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396</p> <p><i>Pseudomonas fragi</i> MA07</p> <p><i>Pseudomonas migulae</i> P11</p> <p>Συγκαλλιέργειες</p>
2-undecanone	<p><i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB</p> <p><i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396</p> <p><i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435</p> <p><i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435</p>