

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιολογική ποιότητα του είδους *Mugil cephalus*
κατά τη συντήρησή του σε πάγο»**

Αικατερίνη Β. Κελεπούρη

ΒΟΛΟΣ 2018

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) Ελένη Γκολομάζου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

3) Λάμπρος Κοκοκύρης, Επίκουρος Καθηγητής, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Αειφορική διαχείριση υδατικού περιβάλλοντος» του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη καθοδήγηση, εμπιστοσύνη αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το ενδιαφέρον αντικείμενο.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Φωτεινή Παρλαπάνη για την αμέριστη βοήθεια της η οποία έπαιξε καταλυτικό ρόλο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας και την ευχαριστώ από καρδιάς.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κα Ελένη Γκολομάζου και κο Λάμπρο Κοκοκύρη ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για την υποστήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της εργασίας μου.

Τέλος νιώθω την ανάγκη να μην παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με ενθάρρυνε και με στήριξε σ' αυτή την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλλοίωση στα νωπά αλιευτικά προϊόντα οφείλεται στη μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Η αλλοίωση των νωπών ιχθύων προσδιορίζεται κυρίως με οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεθόδους. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της ποιότητας και η εκτίμηση του εμπορικού χρόνου ζωής του κεφάλου *Mugil cephalus* κατά την συντήρησή τους σε πάγο. Για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού, πραγματοποιήθηκαν οργανοληπτικές, χημικές (προσδιορισμός του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου) και μικροβιολογικές αναλύσεις σε ιχθύες που αλιεύθηκαν τους μήνες Οκτώβριο (πρώτη παρτίδα) και Δεκέμβριο (δεύτερη παρτίδα) του 2015.

Ο χρόνος ζωής των κεφάλων της πρώτης και δεύτερης παρτίδας βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης, λαμβάνοντας κυρίως υπόψη τη γενική εμφάνιση και οσμή, προσδιορίστηκε στις 7 και 8 ημέρες, αντίστοιχα. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) έφτασε τους 7,89 και 7,31 $\log_{10}\text{cfu/g}$ στο χρόνο απόρριψης των ιχθύων της πρώτης (ημέρα 7) και δεύτερης (ημέρα 8) παρτίδας, αντίστοιχα. Επιπλέον, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς και στις δύο παρτίδες. Αναλυτικότερα, τα *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια βρέθηκαν σε παρόμοια επίπεδα και στις δύο παρτίδες. Ωστόσο, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* βρέθηκε να απαντώνται σε ελάχιστα υψηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα υδροθειούχα για τους ιχθύες που αλιεύθηκαν τον Οκτώβριο, ενώ για τους ιχθύες που αλιεύθηκαν τον Δεκέμβριο βρέθηκαν σε πληθυσμό 1 λογάριθμο υψηλότερο. Οι πληθυσμοί των υπόλοιπων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών

που μελετήθηκαν είτε βρέθηκαν και παρέμειναν σε χαμηλά πληθυσμιακά επίπεδα (οξυγαλακτικά βακτήρια) ή κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 (*Brochothrix thermosphacta*) ή 1 log₁₀cfu/g (βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*).

Το TVB-N των κεφάλων στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής (ημέρα 1) ήταν 10,3 και 12,6 mg N /100g, για την πρώτη και δεύτερη παρτίδα, αντίστοιχα. Στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, η ποσότητα του TVB-N έφτασε στα επίπεδα των 13,2 και 15,0 mg N /100g, για την πρώτη και δεύτερη παρτίδα αντίστοιχα. Η τιμή του TVB-N σε καμία περίπτωση (17,7 και 16,6 mg N /100g στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας) δεν έφτασε ή ξεπέρασε τα επίπεδα των 30-35 mg N /100g που είναι και το Νομοθετικό όριο, καθιστώντας το μη αξιόπιστο χημικό δείκτη αλλοίωσης.

Λέξεις-κλειδιά: *Mugil cephalus*, Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), Εμπορικός χρόνος ζωής, Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N)

ABSTRACT

Spoilage of fresh fish is the result of the metabolic activity of spoilage microorganisms and can be evaluated using sensory, microbiological and chemical analyses. The aim of this study was the determination of the quality and shelf-life of *Mugil cephalus* stored in ice. To succeed the objective of the present work, sensory, microbiological and chemical (TVB-N: total volatile basic nitrogen) analyses were performed in fish caught in October (first batch) and December (second batch) of 2015.

Based on changes of organoleptic characteristics such as general appearance and off-odors, shelf-life of *Mugil cephalus* determined at 7 and 8 days for fish of the first and second batch respectively. TVC (Total Viable Count) reached the level of 7.89 and 7.31 $\log_{10}\text{cfu/g}$ for fish of the first and second batch respectively. *Pseudomonas* spp. was the dominant spoilage microorganisms for fish of both batches. In particular, *Pseudomonas* spp. and H_2S producing bacteria found to co-dominate in fish of both batches, with *Pseudomonas* to be at slightly higher population levels in contrast to H_2S producing bacteria (1 log higher in second batch). Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae and *B. thermosphacta* remained below the detection limit of 1 (Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae) or 2 (*B. thermosphacta*) logs cfu/g at both temperatures throughout the experiment. Initially (d1), TVB-N value was 10.3 and 12.6 mg N /100g for fish of the first and second batch respectively. The concentration reached the level of 13.2 and 15.0 mg N /100g at the end of shelf-life, respectively, while did not exceed the level of 17.7 and 16.6 mg N /100g at the end of the experiment, making it unsuitable for chemical spoilage index.

Key-words: *Mugil cephalus*, Specific spoilage organism (SSO), Shelf-life, TVB-N

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Γενικά.....	1
1.2. Αλλοίωση των ιχθύων.....	2
1.3. Μικροβιολογική αλλοίωση.....	4
1.4. Προσδιορισμός της ποιότητας με οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεθόδους.....	8
1.5. Συντήρηση νοπών ιχθύων.....	9
1.6. Στοιχεία βιολογίας και περιοχές παραγωγής κεφάλου.....	12
1.7. Σκοπός της εργασίας.....	13
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
2.1. Προέλευση δειγμάτων.....	14
2.2. Οργανοληπτική ανάλυση.....	14
2.3. Μικροβιολογική ανάλυση.....	16
2.4. Χημική ανάλυση.....	17
2.4.1. Μέτρηση Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N).....	17
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	19
3.1. Οργανοληπτική ανάλυση.....	19
3.1.1. Αξιολόγηση ιχθύων πρώτης παρτίδα (batch 1).....	19
3.1.2. Αξιολόγηση ιχθύων δεύτερης παρτίδας (batch 2).....	19
3.2. Μικροβιολογική αξιολόγηση.....	21
3.2.1. Αξιολόγηση ιχθύων πρώτης παρτίδας (batch 1).....	21
3.2.2. Αξιολόγηση ιχθύων δεύτερης παρτίδας (batch 2).....	22
3.3. Χημική ανάλυση.....	25

3.3.1. Ανάλυση Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N).....	25
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	31
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	32
6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	32
6.2. Ελληνική βιβλιογραφία.....	41
6.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία.....	41

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Οι ιχθύες θεωρούνται μια τροφή υψηλής βιολογικής αξίας εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες ίδιας θρεπτικής αξίας με τις πρωτεΐνες του κρέατος (Borgstrom, 1962). Επίσης έχουν προσδιοριστεί υδατοδιαλυτές βιταμίνες του συμπλέγματος Β, νιασίνη, παντοθενικό οξύ, καθώς και η βιταμίνη C σε μικρότερες ποσότητες (Holland et al., 1993). Στις πρωτεΐνες της σάρκας των ψαριών έχουν ταυτοποιηθεί 25 αμινοξέα, μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Τέλος, απαντώνται ορισμένα ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως λινολεϊκό, λινολενικό, αραχιδονικό τα οποία παίζουν σπουδαίο ρόλο στην καλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος του ανθρώπου (Γεωργάκης 2005).

Ωστόσο, τα ιχθυηρά κατατάσσονται στην κορυφή των πιο ευαλλοίωτων προϊόντων σε σχέση με άλλα προϊόντα ζωικής προέλευσης. Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες (Gram & Huss 1996). Ένα μικρό κλάσμα του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού ευνοείται κάθε φορά από τις επικρατούσες συνθήκες συντήρησης, π.χ. ψύξη, και φθάνει σε υψηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Το μικρό αυτό κλάσμα μικροοργανισμών, το οποίο είναι γνωστό ως Ειδικοί αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί-EAM, είναι υπεύθυνο για την υποβάθμιση της οσμής-γεύσης λόγω των μεταβολιτών που παράγει, με συνέπεια την οργανοληπτική απόρριψη των προϊόντων.

1.2 Αλλοίωση των ιχθύων

Τα αλιεύματα θεωρούνται γενικά ως ευαλλοιώτα προϊόντα τα οποία κατά τη συντήρησή τους κάτω από ορισμένες συνθήκες αποθήκευσης (π.χ. θερμοκρασίας, ατμόσφαιρας) υφίστανται ποιοτική υποβάθμιση και τελικά αλλοίωση. Στα ποιοτικά υποβαθμισμένα αλιευτικά προϊόντα επέρχονται μεταβολές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (π.χ. εμφάνιση, οσμή, υφή, γεύση) που μειώνουν την αποδοχή του από τον καταναλωτή (Ashie et al., 1996), επομένως και τον εμπορικό χρόνο ζωής αλλά και την εμπορική του αξία. Ο χρόνος ζωής ενός νωπού ιχθύος όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 4 φάσεις (Πίν. 1).

Πίνακας 1: Φάσεις υποβάθμισης της ποιότητας νωπών ιχθύων (Προσαρμογή από από Gram and Huss, 1996).

Φάση 1: Ο ιχθύς είναι πολύ φρέσκος, μυρίζει “θάλασσα” και έχει σχετικά γλυκιά, μεταλλική και εκλεπτυσμένη γεύση.
Φάση 2: Υπάρχει απώλεια εκλεπτυσμένης γεύσης, δεν υπάρχουν όμως άσχημες οσμές, ενώ η υφή είναι ακόμα καλή.
Φάση 3: Αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές διάφορες οσμές, λόγω παραγωγής τριμεθυλαμίνης (TMA). Κατόπιν, αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές οσμές αμμωνιακής φύσεως.
Φάση 4: Οι ιχθύες χαρακτηρίζονται αλλοιωμένοι και απορρίπτονται.

Γενικότερα, η αλλοίωση των ιχθύων προέρχεται από τη δράση μικροοργανισμών, χημικές αντιδράσεις και από τη δράση ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση). Στα νωπά αλιεύματα, η μικροβιακή δράση είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας υποβάθμισης της ποιότητάς τους και στις περισσότερες περιπτώσεις και ο περιοριστικός παράγοντας της διάρκειας ζωής τους (Gram and Huss 1996). Η ποικιλόθερμη φύση των ψαριών, το υψηλό μεταθανάτιο PH (>6.0), η παρουσία μη πρωτεϊνικού αζώτου (NPN), η παρουσία του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) και η χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (<0,5%) καθιστούν τα ψάρια ως υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηρίων (Gram and Huss 1996). Τα κύρια χαρακτηριστικά μικροβιακής αλλοίωσης ενός ιχθύος είναι η ανίχνευση ανεπιθύμητων οσμών, ο σχηματισμός ‘γλίτσας’, η παραγωγή αερίων, αλλαγές στο χρώμα και την εμφάνιση, αλλαγές στην υφή (μαλάκωμα) (Πίν. 2).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της μικροβιακής αλλοίωσης των τροφίμων (Προσαρμοσμένο από Gram and Huss, 1996).

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

1.3 Μικροβιολογική Αλλοίωση

Η μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων ορίζεται ως την κάθε μεταβολή ή ομάδα μεταβολών που εκδηλώνονται με αλλαγές στην οσμή, στο άρωμα ή στην εμφάνιση του τροφίμου λόγω μικροβιολογικής δραστηριότητας (Gill 1986). Ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής ποικιλότητας και πληθυσμού επικρατεί κατά τη διάρκεια της συντήρησης και παράγει μεταβολικά προϊόντα υπεύθυνα για την ποιοτική υποβάθμιση και τελικώς την αλλοίωση των νωπών ιχθύων (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 γενικότερα από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *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, Parlapani et al. 2013, 2014).

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών περιλαμβάνει τέσσερις φάσεις: τη λανθάνουσα (lag phase), την εκθετική (exponential phase), τη φάση στασιμότητας (stationary phase) και τη φάση κάμψης ή θανάτου (death phase). Οι μικροοργανισμοί που θα καταφέρουν τελικά να επικρατήσουν, γνωστοί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (specific spoilage microorganisms –SSO's), είναι αυτοί οι οποίοι διαθέτουν τέτοιες στρατηγικές που τους επιτρέπουν να προσαρμοστούν καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου. Σε κάθε τρόφιμο υπάρχουν παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Πίν.3).

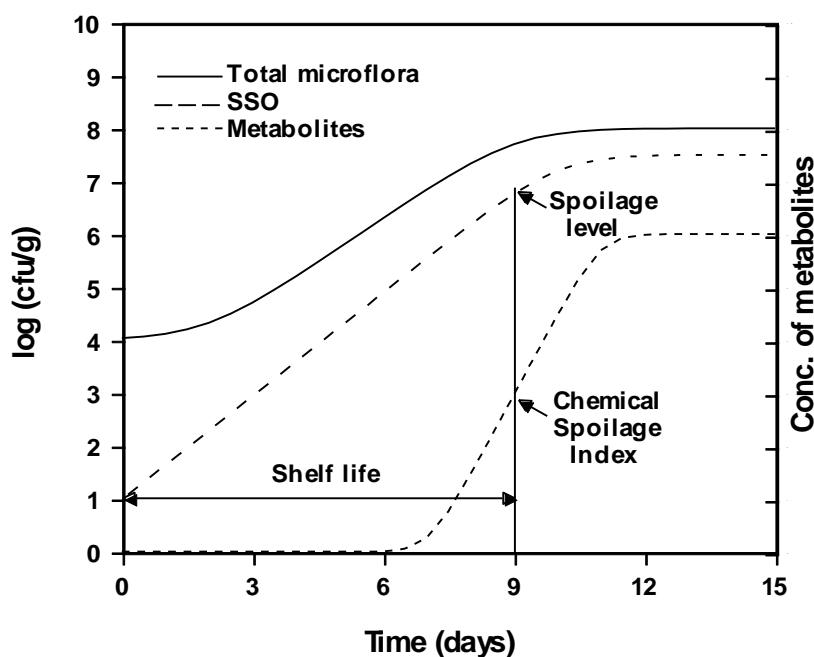
Πίνακας 3: Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη (Προσαρμογή από Nychas and Skandamis, 2005).

I. <u>ενδογενείς παράγοντες</u> (Intrinsic factors) ή παράγοντες υποστρώματος. Περιλαμβάνονται η δομή και η σύσταση του τροφίμου καθώς και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως το Ph/οξύτητα και η ρυθμιστική του ικανότητα. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του(Eh), η ενεργότητα νερού (a_w), και οι αντιμικροβιακές ουσίες που μπορεί να περιέχει.
II. <u>εξωγενείς παράγοντες</u> (Extrinsic factors)ή περιβαλλοντικοί παράγοντες. Περιλαμβάνονται οι εξωτερικές συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης, όπως η σχετική εργασία του χώρου αποθήκευσης, η θερμοκρασία και η περιβάλλουσα ατμόσφαιρα.
III. <u>απροσδιόριστους και μικροβιακούς παράγοντες</u> (implicit and microbial factors)περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν σε ένα σύνθετο οικοσύστημα μικροοργανισμών, όπως φαινόμενα ανταγωνισμού (antagonism), συνεργισμού (synergism) ή συμβίωσης (commensalism), μεταξύ των μικροοργανισμών
IV. <u>παράγοντες που αφορούν την κατεργασία των προϊόντων</u> (processing factors)διαδικασίες όπως τεμαχισμός , συσκευασία ,παστερίωση ,επίδραση ακτινοβολίας κτλ. Οι οποίοι ανάλογα με το είδος τους επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον του τροφίμου.

Η τροποποίηση ή/και ο έλεγχος ενός ή περισσότερων από τους παραπάνω παράγοντες είναι δυνατόν να οδηγήσει σε διαφορετική επιλογή ή/και εξέλιξη των μικροοργανισμών, πράγμα που μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία προϊόντων με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Nychas and Skandamis, 2005).

Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ)

Οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί - ΕΑΜ (SSO, Specific Spoilage Organisms) αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard 2002). Οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς της συνολικής μικροβιακής σύνθεσης (Total microflora) κατά τη διάρκεια της συντήρησης των νωπών ιχθύων. Έχει παρατηρηθεί ότι όταν ο πληθυσμός τους φθάσει στο επίπεδο των 10^7 - 10^9 cfu/g (spoilage level) παράγονται μεταβολίτες (metabolites: CSI-chemical spoilage indices), οι οποίοι ευθύνονται για την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard *et al.* 1993) (Σχ. 1).



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

Τα *Pseudomonas* και *S. putrefaciens* αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού των αλλοιωμένων ιχθύων που προέρχονται από τα

ύδατα των εύκρατων κλιμάτων και αποθηκεύονται σε πάγο (Liston 1960, Gram *et al.* 1987, Gram *et al.* 1990). Στα αλιεύματα της Μεσογείου, ως ΕΑΜ έχουν χαρακτηριστεί τα *Pseudomonas* spp. διότι φθάνουν σε υψηλότερους πληθυσμούς από το *S. putrefaciens*, παράγοντας αζωτούχα παραπροϊόντα ως κύριους μεταβολίτες (Dainty, 1996). Τα *Pseudomonas* spp. και δεύτερον τα *S. putrefaciens* έχουν αναφερθεί στο παρελθόν ως οι επικρατέστεροι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί σε αλιεύματα που προέρχονται από ελληνικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000; Tryfinopoulou *et al.* 2002, Tryfinopoulou *et al.* 2007, Boziaris *et al.* 2011). Τα τελευταία χρόνια, με την εισαγωγή μοντέρνων μεθοδολογιών (καλλιεργητικές και μη καλλιεργητικές μοριακές τεχνικές) για τη μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων, έχουν αναδυθεί διαφορετικοί ή και άλλοι μικροοργανισμοί που επικρατούν ή/και ευθύνονται για την ποιοτική υποβάθμιση/αλλοίωση των ελληνικών αλιευτικών προϊόντων (Parlapani *et al.* 2013, 2014, 2015, Boziaris & Parlapani 2016, Parlapani & Boziaris 2016). Ωστόσο, τα *Pseudomonas* spp. παραμένουν οι σημαντικότεροι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί στα νωπά αλιευτικά προϊόντα της Μεσογείου σε πολλές περιπτώσεις (Boziaris & Parlapani 2016). Αντίθετα, τα *S. putrefaciens* δεν έχουν βρεθεί σε υψηλά επίπεδα αφθονίας στα ελληνικά αλιευτικά προϊόντα όπως η τσιπούρα, σύμφωνα με μελέτη των Boziaris & Parlapani (2016). Οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν σε αυτό το συμπέρασμα αφού χρησιμοποίησαν αλληλούχιση επόμενης γενιάς γνωστή ως 16S Next Generation Sequencing ανάλυση και μελέτησαν τη μικροβιακή ποικιλότητα και αφθονία λαμβάνοντας DNA απευθείας από τη σάρκα των ιχθύων την οποία σύγκριναν με αυτή που προκύπτει από τα τρυβλία (όπου η αφθονία ήταν υψηλή, λόγω κυρίως της ανικανότητας ανάπτυξης ορισμένων επικρατέστερων

μικροοργανισμών στα θρεπτικά υλικά). Έτσι, κατά τη μικροβιολογική ανάλυση ιχθύων που προέρχονται από ελληνικά ύδατα χρησιμοποιείται πλέον η απαρίθμηση των υδροθειούχων βακτηρίων γενικότερα στα αλιευτικά προϊόντα χωρίς να υποδγκνύεται η αντιπροσώπευση αυτών από το είδος *S. putrefaciens* όπως αναφερόταν παλαιότερα (H_2S producing bacteria, presumably *S. putrefaciens*).

1.4 Προσδιορισμός της ποιότητας με οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεθόδους

Ο προσδιορισμός της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων πραγματοποιείται κυρίως με οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις.

Η εκτίμηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών γίνεται με οργανοληπτική εξέταση των τροφίμων, δηλαδή εξέταση με τις αισθήσεις από ειδικευμένους δοκιμαστές. Η οργανοληπτική αξιολόγηση για τους ολόκληρους ιχθύες πραγματοποιείται βάσει των κριτηρίων που περιγράφονται στο Multilingual Guide to EU Freshness Grades for Fishery Products (Howgate *et al.* 1992) και περιλαμβάνει τέσσερα περιγραφικά επίπεδα και βαθμούς νωπότητας από το Ε-Άριστο, Α-Πολύ καλό, Β-Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό, C-Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό.

Ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της ποιότητας/αλλοίωσης είναι η μικροβιολογική ανάλυση που γίνεται με απαρίθμηση των μικροοργανισμών κατά τη συντήρηση. Η Ολική Μεσόφιλη Μικροχλωρίδα (OMX) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής των νωπών ιχθύων. Η OMX κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 5 λογαρίθμους για τους ολόκληρους ιχθύες ή φιλέτα κατά την αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής τους, ενώ στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης συνήθως βρίσκεται σε επίπεδα της τάξης των 7-8 λογαρίθμους (Olafsdottir *et al.* 1997,

Mol *et al.* 2007, Parlapani *et al.* 2014, 2015, Parlapani & Boziaris 2016). Επιπλέον, η απαρίθμηση των ΕΑΜ όπως *Pseudomonas spp.* (κυρίως για τα ελληνικά αλιευτικά προϊόντα), *Photobacterium phosphoreum*, *S. putrefaciens*, (κυρίως για τα αλιευτικά προϊόντα της Β. Ευρώπης), θεωρείται μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους για να αξιολογηθεί με ακρίβεια η νωπότητα ή το επίπεδο αλλοίωσης των αλιευμάτων (Olafsdottir *et al.* 2006).

Η χημική ανάλυση επίσης αποτελεί έναν άλλον τρόπο προσδιορισμού της ποιότητας -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). Για να χαρακτηριστεί κάποια ουσία από αυτές ως χημικός δείκτης θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις όπως 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 (Fields *et al.* 1986).

1.5 Συντήρηση νωπών ιχθύων

Η συντήρηση των τροφίμων αποτελεί έναν τρόπο για α) επιμήκυνση του χρόνου διατήρησής τους, γεγονός που επιτρέπει τη διάθεση και την εμπορία τους σε πλέον απομακρυσμένες περιοχές, β) βελτίωση του γεωργικού εισοδήματος, γ) εφοδιασμό με τρόφιμα των αστικών περιοχών και των μεγάλων πόλεων, δ) διάθεση τροφίμων σε όλη τη διάρκεια του έτους, παρά την εποχική παραγωγή ορισμένων από αυτά και ε) δυνατότητα διατήρησης αποθεμάτων σε τρόφιμα για την αντιμετώπιση έκτατων

καταστάσεων. Η επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης στην τύχη/συμπεριφορά των μικροοργανισμών είναι πρωτεύοντος σημασίας για την παραγωγή και διάθεση ποιοτικών και υγιεινών αλιευμάτων. Η αποθήκευση των ιχθύων στον πάγο αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς τρόπους συντήρησης των ιχθύων (Kyraa *et al.* 1997). Για παράδειγμα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4, η διάρκεια ζωής των ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στον πάγο, κυμαίνεται συνήθως από 15 έως 18 ημέρες, ενώ του λαβρακιού από 11 έως 15 ημέρες (Kyraa *et al.* 1997, Kyraa & Lougonois 2002, Huidobro *et al.* 2000, Cakli *et al.* 2007, Parlapani *et al.* 2014, 2015, Taliadorou *et al.* 2003). Ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής έχει παρατηρηθεί στο σολομό (*Salmo salar*) από τη Β. Ευρώπη όπου ο χρόνος ζωής εκτιμάται σε 20 ημέρες (Sveinsdottir *et al.* 2002).

Πίνακας 4. Διάρκεια ζωής των ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες σε διάφορες θερμοκρασίες συντήρησης (Προσαρμογή από Παρλαπάνη, 2013)

Προϊόν	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια ζωής (ημέρες)	Βιβλιογραφική Αναφορά
Τσιπούρα	0 (Πάγος)	17	Kyraa <i>et al.</i> 1997
	0 (Πάγος)	15	Huidobro <i>et al.</i> 2000 Cakli <i>et al.</i> 2007
	0 (Πάγος)	18	Ozogul <i>et al.</i> 2007
	0 (Πάγος)	16	Lougonois <i>et al.</i> 2003
	0 (Πάγος)	16	
	0	8-9	Koutsoumanis & Nychas 2000
	5	4	
	10	2	
	15	1	

	0 (Πάγος)	12-13	Taliadorou <i>et al.</i> 2003
	0 (Πάγος)	15-16	Kyranas & Lougouvois 2002
Λαβράκι	0 (Πάγος)	15	Cakli <i>et al.</i> 2007
	0	9	
	5	4	Koutsoumanis <i>et al.</i> 2002
	10	2	
	15	1	
Λαβράκι, απεντερωμένο	0 (Πάγος)	8	Papadopoulos <i>et al.</i> 2003
Λαβράκι, φιλέτο	0 (Πάγος)	8-9	Taliadorou <i>et al.</i> 2003
Μπακαλιάρος, φιλέτο	0	7	Pastoriza <i>et al.</i> 1998
Σολομός	0 (Πάγος)	20	Sveinsdottir <i>et al.</i> 2002
Καλκάνι εκτροφής	0 (Πάγος)	19	Rodriguez <i>et al.</i> 2003
Καλκάνι	0 (Πάγος)	12-15	Ozogul <i>et al.</i> 2006
Σκουμπρί	0 (Πάγος)	10	Tzikas <i>et al.</i> 2007
Μπλε σκουμπρί	0 (Πάγος)	7	
	0	7	
Γόπα	3	4	Koutsoumanis & Nychas 1999
	7	2,5	
	10	1,8	
Σκουμπρί	4±1	1	
Μπακαλιάρος	4±1	2	
Γαύρος	4±1	2	Mol <i>et al.</i> 2007
Ιριδίζουσα πέστροφα	4±1	3	

Ευρωπαϊκό χέλι	0 (Πάγος)	12-14	Ozogul <i>et al.</i> 2005
	3±1	5-7	

1.6 Στοιχεία βιολογίας και περιοχές παραγωγής κεφάλου

Ο κέφαλος βρίσκεται παραλιακά σε εκβολές ποταμών και σε περιβάλλοντα γλυκού νερού. Ο ενήλικος κέφαλος έχει βρεθεί σε νερά των οποίων η αλατότητα κυμαίνεται από 0-75‰, ενώ οι ανήλικοι μπορούν να αντέξουν τέτοιες περιοχές αλατότητας αφού φτάσουν το μήκος των 4-7cm. Οι ενήλικοι κέφαλοι ζουν κοντά στην επιφάνεια, πάνω από αμμώδη ή λασπώδη πυθμένα και πυκνή βλάστηση, ενώ μεταναστεύουν κοντά στη στεριά, για να αναπαραχθούν σε μεγάλα σύνολα. Οι προνύμφες κινούνται παράκτια σε εξαιρετικά νερά, κάτι το οποίο τους παρέχει κάλυψη από τα αρπακτικά, καθώς και πλούσιο έδαφος σίτισης. Αφού φτάσουν τα 5 cm σε μήκος τα νεαρά ψάρια αρχίζουν να προχωρούν σε λίγο πιο βαθιά νερά. Ο κέφαλος τρέφεται ημερησίως, καταναλώνοντας κυρίως ζωοπλαγκτόν και νεκρή ύλη φυτών, αφαιρεί εκκρίματα λίθων και μικροφύκη που καθιζάνουν ή βρίσκονται στο βυθό.

Η Κορέα και η Βενεζουέλα είναι από τους κορυφαίους παραγωγούς κεφάλου από αλιεία παγκοσμίως (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mugil_cephalus). Η Ελλάδα βρίσκεται εντός των χωρών παραγωγής άγριου κεφάλου. Η μέση και παράκτια αλιεία χρησιμοποιεί διάφορους τρόπους εξαλίευσης κεφάλου όπως μηχανοκίνητα δίχτυα, κυκλικά δίχτυα, δίχτυα τράτας κ.α. Η παραγωγή κεφάλου στη χώρα τα τελευταία χρόνια ανέρχεται περίπου στους 1000 τόνους ανά έτος (Πίν. 5).

Πίνακας 5: Παραγωγή κεφάλου (σε τόνους) μέσης και παράκτιας αλιείας στην Ελλάδα κατά το χρονικό διάστημα 2011-2015. (<http://www.statistics.gr/el/statistics/agr>)

	ΜΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΤΙΑ ΑΛΙΕΙΑ ΚΕΦΑΛΟΥ				
	ΣΥΝΟΛΟ	ΜΗΧΑΝΟΚΙΝΗΤΑ ΔΙΧΤΥΑ	ΚΥΚΛΙΚΑ ΔΙΧΤΥΑ	ΔΙΧΤΥΑ ΤΡΑΤΑΣ	ΆΛΛΑ
ΕΤΟΣ 2011	1.025,6	74,0	49,9	6,8	894,9
ΕΤΟΣ 2012	1.035,3	113,4	42,0	5,9	874,0
ΕΤΟΣ 2013	918,6	53,2	36,6	2,5	826,3
ΕΤΟΣ 2014	1.159,7	30,8	29,3	12,8	1.086,8
ΕΤΟΣ 2015	1.080,8	23,6	43,6	12,6	1.001,0

1.7 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών – Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο, για τον προσδιορισμό της ποιότητας και την πρόβλεψη του εμπορικού χρόνου ζωής του κεφάλου υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ (σε πάγο).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προέλευση δειγμάτων

Δύο παρτίδες ολόκληρων ιχθύων του είδους *Mugil cephalus* βάρους περίπου 400-500 g, αλιεύθηκαν στο Θερμαϊκό Κόλπο (Βόρεια Ελλάδα) τον Οκτώβριο (πρώτη παρτίδα) και Δεκέμβριο (δεύτερη παρτίδα) 2015, τοποθετήθηκαν μέσα σε πολυεστερικά κιβώτια με πάγο και μεταφέρθηκαν εντός λίγων ωρών στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο. Τα κιβώτια με τους ιχθύες και τον πάγο, τοποθετήθηκαν σε επωαστικό στους 2°C για 18 ημέρες. Ο πάγος ανανεώνονταν κάθε δύο ημέρες.

2.2 Οργανοληπτική ανάλυση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των ιχθύων έγινε βάσει των κριτηρίων που περιγράφονται στο Multilingual Guide to EU Freshness Grades for Fishery Products (Howgate *et al.* 1992) (Πίν. 1) και περιλάμβανε τέσσερα περιγραφικά επίπεδα και βαθμούς νωπότητας από το Ε-Άριστο (βαθμός 5), Α-Πολύ καλό (βαθμός 4), Β-Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό (βαθμός 3), C-Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό (βαθμός 2).

Πίνακας 1: Κριτήρια αξιολόγησης της ποιότητας με τις αισθήσεις σε ολόκληρους ιχθύες κεφάλου

	Αριστο E	Πολύ καλό A	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό B	Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό C
Δέρμα	Λαμπερό, στυλνό, δέρμα με ιριδισμούς, χωρίς αποχρωματισμούς	Λαμπερό δέρμα με ελαφρά απώλεια λαμπρότητας, ελαφρά ιριδίζον	Αισθητή απώλεια λαμπρότητας μερικώς αποχρωματισμένο	Δέρμα αρκετά θαμπό, αποχρωματισμένο
Εξωτερική βλέννα	Διαφανής ή υδαρής λευκή	Γαλακτώδης	Γκριζοκιτρινωπή ελαφρά κολλώδης	Καφέ – κιτρινωπή, έντονα κολλώδης και παχύρευστη
Μάτια	Κυρτά, μαύρη κόρη, διαφανής κερατοειδής	Επίπεδα, κόρη ελαφρά θαμπή, κερατοειδής ελαφρά οπαλίζον	Ελαφρά κοίλα, γκριζα κόρη, θαμπός κερατοειδής	Κοίλα, γκριζα κόρη, θαμπός ελαφρά αποχρωματισμένος κερατοειδής
Εμφάνιση βραγχίων	Κόκκινα λαμπερά, διαφανής βλέννα	Ρόδινα ελαφρά, ελαφρά θολή βλέννα	Γκριζα – καφέ, αποχρωματισμένα, βλέννα θολή	Καφέ, βλέννα θολή και παχύρευστη
Οσμή βραγχίων και Εσωτερικές Οσμές	Έντονα θαλασσινή	Ελαφρά θαλασσινή	Ούτε θαλασσινή, ούτε δυσάρεστη	Δυσάρεστη

2.3 Μικροβιολογική ανάλυση

Μικροβιολογικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν κυρίως από τη LAB M (Lancashire, UK). Το μικροβιολογικό υλικό STAA (streptomycin sulphate, thallus acetate, cycloheximide actidione agar) προήλθε από την Biofire Italiana srl (Milano, Italy). Το Iron Agar (IA) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram *et al.* (1987) και περιέχει: peptone 20 g l⁻¹, meat extract 3.0 g, yeast extract 3.0 g l⁻¹, ferric citrate 3.0 g l⁻¹, sodium thiosulphate 0.3 g l⁻¹, NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 g l⁻¹, agar 14 g l⁻¹. Το pH έχει ρυθμιστεί στο 7,4. Τέλος, τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν διπλά δείγματα σάρκας κεφάλου των 10 g, μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, προστίθονταν 90 ml Maximum Recovery Diluent (MRD- NaCl 0,85% και πεπτόνη 0,1%) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Ακολούθησε η διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.

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

Enterobacteriaceae σε VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar (Mann, Rogosa, Sharpe agar), με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 72 ώρες, ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC *Pseudomonas* Agar (Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine agar) με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48 ώρες και ζ) *B. thermosphacta* σε STAA Agar (Streptomycin Sulfate Thallous Acetate Agar) με καταμέτρηση των αποικιών κίτρινου χρώματος μετά από επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, ενώ του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* με την τεχνική της επίστρωσης. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν εις διπλούν ανά παρτίδα ιχθύων κεφάλου.

2.4 Χημική ανάλυση

2.4.1 Μέτρηση Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N)

Ποσότητα 10 g σάρκας κεφάλου ομογενοποιούνταν σε συσκευή τύπου Stomacher με 90 ml διαλύματος τριχλωρο-οξικού οξέος 6% για 2 min και κατόπιν ακολουθούσε διήθηση μέσω ηθμού Whatman No.1 σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Στη συνέχεια, ποσότητα 50 ml εις διπλούν του διηθήματος (n=2) με 6 ml NaOH 20% οδηγούνταν σε αποστακτήρα τύπου Kjeldahl για απόσταξη μεθ' υδρατμών, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά Vyncke *et al.* (1987). Η δέσμευση των πτητικών βασικών αζωτούχων ουσιών πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 50 ml H₂BO₃ 3% και τέλος ακολουθούσε τιτλοδότηση με 0,01 N HCl. Η διαδικασία πραγματοποιούνταν εις διπλούν.

Για την εκτίμηση της ποσότητας του TVB-N (ΟΒΠΑ) χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$\text{TVB-N (mgN/100g)} = 14 \cdot C_{\text{HCl}} \cdot (V - V_0) \cdot 100 / V_{\text{απόσταξης}} \cdot \text{αραίωση}$$

Όπου

V = όγκος 0,01N διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ml που απαιτήθηκε για την εξουδετέρωση των αζωτούχων βάσεων στο δείγμα,

V_0 = όγκος 0,01 N διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ml απαιτήθηκε για την εξουδετέρωση των αζωτούχων βάσεων στο "τυφλό"

$V_{\text{απόσταξης}}$ = ο όγκος του υπό απόσταξη δείγματος σε ml

Αραίωση = η αναλογία σάρκας κεφάλου σε γραμμάρια προς την ποσότητα του αραιωτικού μέσου

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

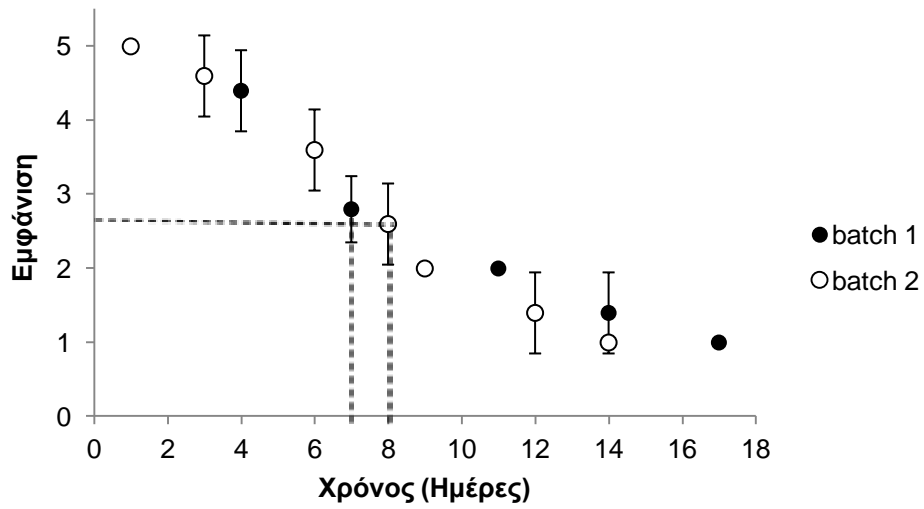
3.1 Οργανοληπτική ανάλυση

3.1.1 Αξιολόγηση ιχθύων πρώτης παρτίδας (batch 1)

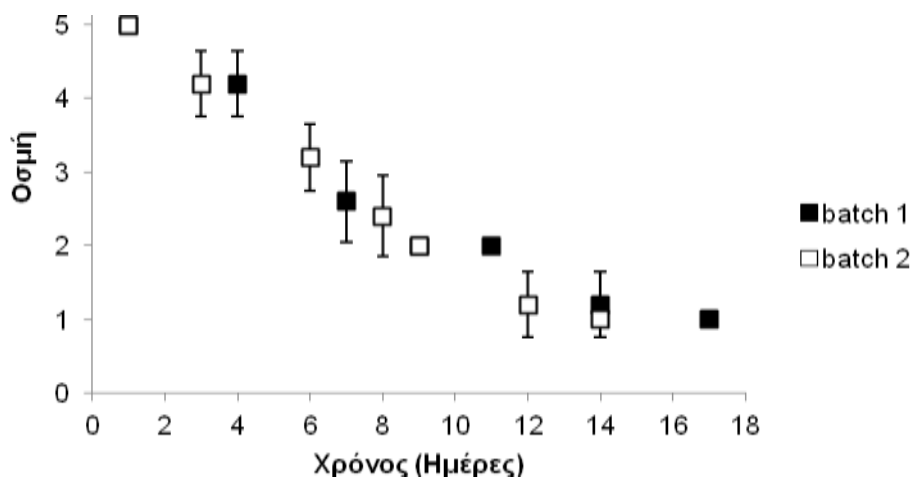
Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση, οι κέφαλοι της πρώτης παρτίδας, οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες στον πάγο, την ημέρα 1 (24 h) αξιολογήθηκαν ως “Άριστα” (E). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, όπου άρχισε να λαμβάνει χώρα η υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, η κατάσταση των κεφάλων χαρακτηρίστηκε ως “Πολύ καλή” (A) την ημέρα 4 (96 h), ενώ την ημέρα 7 (168 h) χαρακτηρίστηκε ως “Υποβαθμισμένη αλλά αποδεκτή”(B). Την 9^η ημέρα (216 h) και 11^η (264 h), η ποιοτική κατάσταση των ιχθύων χαρακτηρίστηκε ως “Υποβαθμισμένη αλλά μη αποδεκτή”(C) (Σχήμα 3.1). Τις ημέρες 14 (336 h) και 17 (408 h), οι κέφαλοι ήταν πλήρως αλλοιωμένοι. Έτσι, ο χρόνος ζωής των κεφάλων της πρώτης παρτίδας βάσει της γενικής εμφάνισης και οσμής προσδιορίστηκε στις 7 ημέρες (Σχήμα 3.1).

3.1.2 Αξιολόγηση ιχθύων δεύτερης παρτίδας (batch 2)

Ομοίως με την πρώτη παρτίδα, εκτιμήθηκε η ποιοτική κατάσταση των κεφάλων της δεύτερης παρτίδας. Συγκεκριμένα, την ημέρα 1 (24 h) αξιολογήθηκε ως “Άριστα” (E), την ημέρα 3 (72 h) ως “Πολύ καλή” (A), ενώ την ημέρα 8 (192 h) ως “Υποβαθμισμένη αλλά αποδεκτή”(B). Κατά την 9^η ημέρα (216 h), η κατάσταση των κεφάλων χαρακτηρίστηκε ως “Υποβαθμισμένη αλλά μη αποδεκτή”(C) (Σχήμα 3.1). Τις ημέρες 12 (288 h) και 14 (336 h) οι κέφαλοι ήταν πλήρως αλλοιωμένοι. Έτσι, ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων της δεύτερης παρτίδας βάσει της γενικής εμφάνισης και οσμής προσδιορίστηκε στις 8 ημέρες (Σχήμα 3.1).



(α)



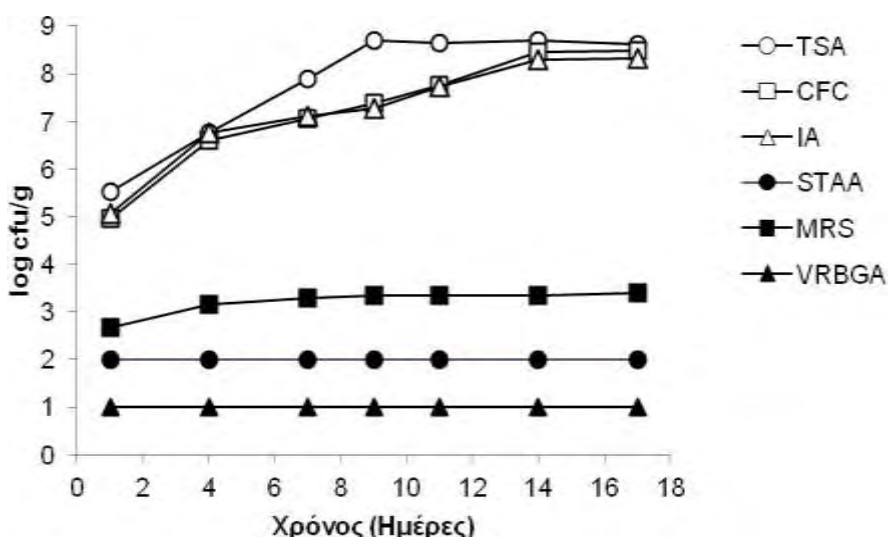
(β)

Σχήμα 3.1: Μεταβολές της εμφάνισης (α) και οσμής (β) των ιχθύων *Mugil cephalus* κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες στον πάγο.

3.2 Μικροβιολογική αξιολόγηση

3.2.1. Αξιολόγηση ιχθύων πρώτης παρτίδας (batch 1)

Οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών [*Pseudomonas spp.*, υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια, *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και *Enterobacteriaceae*] της πρώτης παρτίδας κεφάλου που αλιεύθηκε τον Οκτώβρη του 2015, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες σε πάγο παρουσιάζονται στο σχήμα 3.2.1.

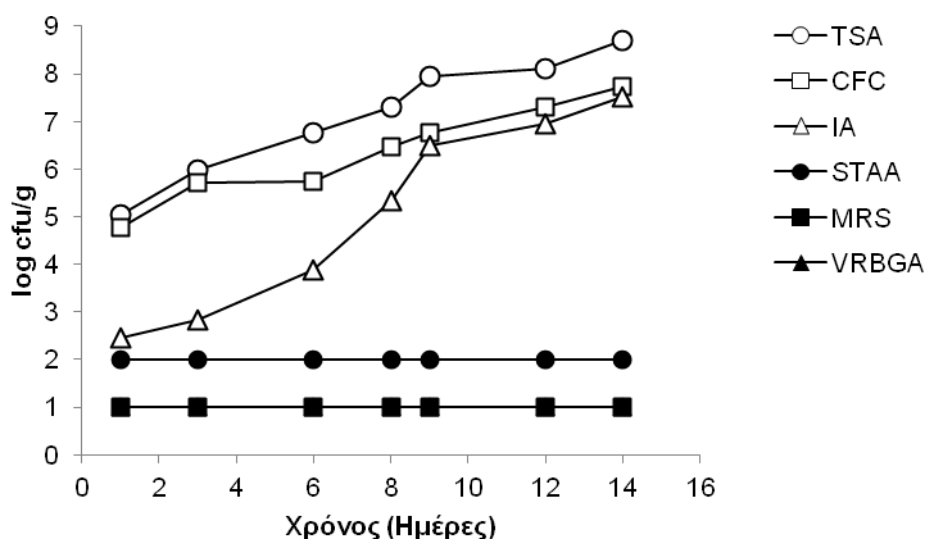


Σχήμα 3.2.1: Πληθυσμιακές μεταβολές του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (TSA) [○], των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.* (CFC) [□], βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H_2S) [Δ], *Brochothrix thermosphacta* [●], Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar [■] και) *Enterobacteriaceae* σε VRBGA [▲] σε κεφάλους αλιευμένων τον Οκτώβρη (πρώτη παρτίδα) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες σε πάγο.

Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) ήταν $5,53 \log_{10}\text{cfu/g}$, και έφτασε στους $7,89 \log_{10}\text{cfu/g}$ στο χρόνο απόρριψης των ιχθύων (ημέρα 7) και $8,63 \log_{10}\text{cfu/g}$ στο τέλος του πειράματος (ημέρα 17). Όσον αφορά τους κυριότερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, οι αρχικοί πληθυσμοί των υδροθειούχων (H_2S) βακτηρίων, *Pseudomonas* spp. και οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν στους $5,07$, $4,97$, $2,67 \log_{10}\text{cfu/g}$, αντίστοιχα, ενώ οι πληθυσμοί των *Brochothrix thermosphacta* και των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 ή $1 \log_{10}\text{cfu/g}$ αντίστοιχα (Σχήμα 3.2.1). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, οι πληθυσμοί των τριών πρώτων προαναφερόμενων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών αυξήθηκαν φτάνοντας σε πληθυσμούς των $7,05$, $7,11$ και $3,29 \log_{10}\text{cfu/g}$, στο χρόνο οργανοληπτικής απόρριψης των ιχθύων (ημέρα 7) (Σχήμα 3.2.1). Οι πληθυσμοί των υδροθειούχων (H_2S) βακτηρίων και *Pseudomonas* spp. βρέθηκαν περίπου στα επίπεδα των 8,5 λογαρίθμων στο τέλος των πειραμάτων, ενώ των οξυγαλακτικών βακτηρίων στους $3,40 \log_{10}\text{cfu/g}$. Οι πληθυσμοί των υπολοίπων μελετώμενων μικροοργανισμών δεν ξεπέρασαν το όριο ανίχνευσης του 1 ή 2 λογαρίθμων καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

3.2.2. Αξιολόγηση ιχθύων δεύτερης παρτίδας (batch2)

Οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών [*Pseudomonas* spp., υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια, βακτήρια *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και *Enterobacteriaceae* σε VRBGA] της δεύτερης παρτίδας κεφάλου που αλιεύθηκε τον Δεκέμβριο, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες στον πάγο παρουσιάζονται στο σχήμα 3.2.2.



Σχήμα 3.2.2: Πληθυσμιακές μεταβολές του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (TSA) [○], των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. (CFC) [□], βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S) [Δ], *Brochothrix thermosphacta* [●], Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar [▪] και) *Enterobacteriaceae* σε VRBGA [▲] σε κεφάλους αλιευμένων το Δεκέμβρη (δεύτερη παρτίδα) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες σε πάγο.

Ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) στην αρχή του πειράματος (ημέρα 1) βρέθηκε στα επίπεδα των 5,04 log₁₀cfu/g, ενώ έφτασε στους 7,31 log₁₀cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής (ημέρα 8) και στους 8,71 log₁₀cfu/g στο τέλος της πειραματικής πορείας (ημέρα 14). Οι αρχικοί πληθυσμοί των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία βρέθηκαν στα επίπεδα των 4,78 και 2,45 log₁₀cfu/g για τα *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια, αντίστοιχα. Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 ή 1 log₁₀cfu/g (Σχήμα 3.2.2). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχων (H₂S) βακτηρίων αυξήθηκαν φτάνοντας σε

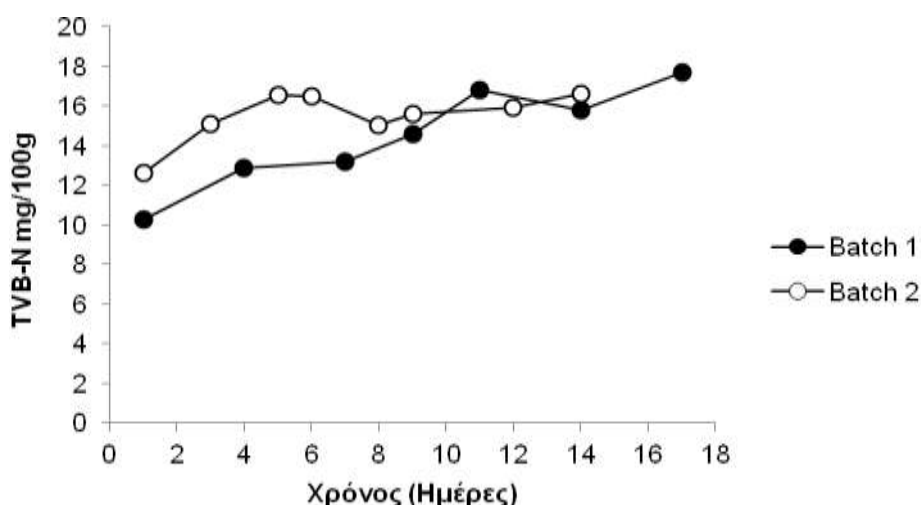
πληθυσμούς των 6,46 και 5,34 $\log_{10}\text{cfu/g}$, στο χρόνο οργανοληπτικής απόρριψης των ιχθύων (ημέρα 8) (Σχήμα 3.2.2). Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν παρέμειναν κάτω του ορίου ανίχνευσης του 1 ή 2 λογαρίθμων καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Οι δύο επικρατέστεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί έφτασαν στα επίπεδα των 7,5 – 8 λογαρίθμων στο τέλος της αποθήκευσης.

Συνολικά, λαμβάνοντας υπόψη τους πληθυσμούς των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στις δύο παρτίδες παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχων (H_2S) βακτηρίων βρέθηκαν σε παρόμοια επίπεδα στην πρώτη παρτίδα (ιχθύες που αλιεύθηκαν τον Οκτώβριο) με τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* να απαντώνται σε αριθμητικά ελάχιστα υψηλότερους πληθυσμούς, ενώ στους ιχθύες που αλιεύθηκαν τον Δεκέμβριο τα *Pseudomonas* βρέθηκαν σε πληθυσμό 1 λογάριθμο υψηλότερο σε σχέση με τα υδροθειούχα. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, τα *Pseudomonas* spp. ήταν οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί και στις δύο περιπτώσεις.

3.3 Χημική ανάλυση

3.3.1 Ανάλυση Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N)

Η ποσότητα του TVB-N (mg N/100 g) σάρκας κεφάλων που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες σε πάγο, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4.1.



Σχήμα 3.4.1: Διακύμανση του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N) των κεφάλων του πρώτου [●] και δεύτερου [○] batch κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες σε πάγο.

Η ποσότητα του TVB-N των κεφάλων στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 1) ήταν 10,3 και 12,6 mg N /100g, για την πρώτη (batch 1) και δεύτερη παρτίδα (batch 2), αντίστοιχα. Στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, η ποσότητα του TVB-N ήταν 13,2 και 15,0 mg N /100g, για την πρώτη και δεύτερη παρτίδα αντίστοιχα, ενώ στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας η ποσότητα έφτασε στα επίπεδα των 17,7 και 16,6 mg N /100g για την πρώτη και δεύτερη παρτίδα, αντίστοιχα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μικροβιακή δραστηριότητα αποτελεί μακράν την κυριότερη αιτία αλλοίωσης-ποιοτικής υποβάθμισης των νωπών ιχθύων (Gram & Dalgaard 2002). Η περιεκτικότητα της σάρκας τους σε μη πρωτεϊνικό άζωτο καθώς και το υψηλό pH (6–7) τα καθιστούν κατάλληλα υποστρώματα για την αύξηση των μικροοργανισμών (Dalgaard 2003). Το ποιοι μικροοργανισμοί θα αυξηθούν και θα επικρατήσουν σε ένα αλιευτικό προϊόν εξαρτάται κυρίως από τις ισχύουσες συνθήκες αποθήκευσης. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η διερεύνηση των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών – Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο, για τον προσδιορισμό της ποιότητας και την πρόβλεψη του εμπορικού χρόνου ζωής του κεφάλου υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ (σε πάγο).

Η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες και ειδικότερα στον πάγο, αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς τρόπους συντήρησης των ιχθύων (Kyra et al. 1997). Η διάρκεια ζωής των ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στον πάγο, κυμαίνεται συνήθως από 15 έως 18 ημέρες, ενώ του λαβρακιού από 11 έως 15 ημέρες (Kyra et al. 1997, Kyra & Lougouvois 2002, Huidobro et al. 2000, Cakli et al. 2007, Parlapani et al. 2014, 2015, Taliadorou et al. 2003). Ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής έχει παρατηρηθεί στο σολομό (*Salmo salar*) από τη Β. Ευρώπη όπου ο χρόνος ζωής εκτιμάται σε 20 ημέρες (Sveinsdottir et al. 2002). Όσον αφορά το μελετώμενο είδος *Mugil cephalus*, ο χρόνος ζωής των ιχθύων αυτών έχει προσδιορισθεί στις 7 ημέρες για τους ιχθύες σε πάγο (Ninan & Zynudheen 2014), 7 ημέρες σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης $3-5^{\circ}\text{C}$ (Shalaby et al. 2013) και 8 ημέρες για τους ιχθύες αποθηκευμένους στους $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Çelik et al. 2012). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτά των παραπάνω ερευνητών. Πράγματι, ο χρόνος ζωής των ιχθύων του είδους *Mugil*

cephalus βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης, λαμβάνοντας κυρίως υπόψη τη γενική εμφάνιση και την οσμή, προσδιορίστηκε στις 7 και 8 ημέρες, για την πρώτη και δεύτερη παρτίδα ιχθύων, αντίστοιχα. Η ψύξη των ψαριών στον πάγο επιβραδύνει την καταστροφική διαδικασία των ενζύμων και των βακτηρίων, οπότε η διάρκεια ζωής των ψαριών μπορεί να παραταθεί κατά πολλές ημέρες. Χαρακτηριστικά των ψαριών όπως η εμφάνιση, η οσμή, η γεύση και η υφή θα πρέπει να αξιολογούνται κάθε φορά που καταναλώνεται ένα προϊόν (Botta 1995, Bremmer 2000, Vaz-Pires *et al.* 2008). Επιπλέον, οι ιχθύες που αλιεύθηκαν τον Οκτώβριο (7 ημέρες, πρώτη παρτίδα) βρέθηκε να έχουν χρόνο ζωής μία ημέρα λιγότερο σε σχέση με αυτά που αλιεύθηκαν τον Δεκέμβριο (8 ημέρες, δεύτερη παρτίδα). Η διαφορά στον χρόνο ζωής μεταξύ των ψαριών των δύο διαφορετικών παρτίδων που αξιολογήθηκαν φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ιχθύες της πρώτης παρτίδας είχαν αρχικό μικροβιακό πληθυσμό μισό λογάριθμο περισσότερο (5,53 log cfu/g) σε σχέση με αυτά της δεύτερης παρτίδας (5,04 log cfu/g). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία είναι γενικώς αποδεκτό ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος ζωής των ιχθύων.

Κατά τη συντήρηση των αλιευμάτων, μόνο ένα μικρό κλάσμα του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού φθάνει σε υψηλά πληθυσμιακά επίπεδα των 7-9 log cfu/g που προκαλούν την αλλοίωση (Dalgaard *et al.* 1993, Gram & Huss 1996). Τα *Pseudomonas* spp. έχουν χαρακτηριστεί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των νωπών ιχθύων οι οποίοι συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες και ιδιαίτερα στον πάγο (Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou *et al.* 2002, Parlapani *et al.* 2013, 2014, 2015). Υπό τις παραπάνω συνθήκες συντήρησης, ως δεύτεροι πιο επικρατέστεροι μικροοργανισμοί στα

αλιεύματα της Μεσογείου, έχουν αναφερθεί πολλές φορές τα υδροθειούχα βακτήρια. Πράγματι στην παρούσα μελέτη, τα *Pseudomonas* αποτέλεσαν τον επικρατέστερο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στους ιχθύες που αλιεύθηκαν τον Δεκέμβριο, ενώ σε γενικές γραμμές βρέθηκε να συγκυριαρχούν με τα υδροθειούχα βακτήρια στα ψάρια και των δύο παρτίδων. Δυστυχώς δεν υπάρχουν άλλες μελέτες σχετικά με τον προσδιορισμό των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε ιχθύες του είδους *Mugil cephalus* αποθηκευμένων σε θερμοκρασίες ψύξης για να μπορεί να γίνει σύγκριση αποτελεσμάτων.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί, *Pseudomonas* και υδροθειούχα βακτήρια, οι οποίοι βρέθηκαν να κυριαρχούν στους ιχθύες της παρούσας μελέτης, είναι γνωστοί ως Ειδικόι Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), διότι παράγουν τους μεταβολίτες εκείνους οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα ιχθυηρά και επομένως την οργανοληπτική τους απόρριψη (Dalgaard *et al.* 1993, Gram & Huss 1996). Οι κύριοι μεταβολίτες που προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη είναι κυρίως αζωτούχα παραπροϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων από τα *Pseudomonas* (Dainty 1996). 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 NH₃ και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις (Dainty 1996). Έτσι, ένας εναλλακτικός τρόπος εκτίμησης της αλλοίωσης στα αλιευτικά προϊόντα αποτελεί ο προσδιορισμός των αζωτούχων ουσιών στην σάρκα τους. Η ποσότητα του TVB-N των κεφάλων στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής βρέθηκε να είναι 10,3 και 12,6 mg N /100g, για την πρώτη και δεύτερη παρτίδα, αντίστοιχα. Πράγματι, σύμφωνα με Etienne (2005), η ποσότητα του TVB-N στους φρέσκους ιχθύες προσδιορίζεται μεταξύ 10-15 mg/100g ιχθύος εκτός

από τα πελαγικά ψάρια, όπου βρίσκεται μεταξύ των 16-18 mg/100g στις σαρδέλες (El Marrakchi et al. 1990), 18-20 mg/100g στο σκουμπρί (Malle *et al.* 1983) και 30 mg/100 g στον μακρύπτερο τόνο (Pérez-Villarreal & Pozo 1990). Ωστόσο, η ηλικία του ιχθύος, η τοποθεσία και ο τρόπος σύλληψης επηρεάζουν την παραγωγή των χημικών αυτών ουσιών (Morishita *et al.* 1989). Στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, η ποσότητα του TVB-N έφτασε στα επίπεδα των 13,2 και 15,0 mg N /100g, για την πρώτη και δεύτερη παρτίδα αντίστοιχα. Σε μελέτη των Çelik *et al.* (2012), στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής ιχθύων κεφάλου αποθηκευμένων στους 4 ± 2 °C, η ποσότητα του TVB-N βρέθηκε στα επίπεδα των 36 mg N/100g. Οι Goulas & Kontominas (2007) αναφέρουν τιμές TVB-N 35 mg/100g ιχθύος μετά από 15-16 ημέρες συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C. Στην παρούσα διατριβή, τη στιγμή της οργανοληπτικής απόρριψης, τα ποσά του TVB-N δεν ξεπέρασαν τα 17,7 mg N/100g, πράγμα που σημαίνει ότι δεν έφτασε ή ξεπέρασε τα επίπεδα των 30-35 mg N /100g δηλαδή την τιμή που έχει οριστεί ως ανώτατο όριο από την (EC) No 2074/2005. Κατά Oehlenschläger (1992, 1997a,b), η ανάλυση του TVB-N αντικατοπτρίζει μόνο τα στάδια της προχωρημένης αλλοίωσης των ιχθύων και δεν θεωρείται αξιόπιστη ουσία για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των ψαριών στο αρχικό στάδιο της αποθήκευσης. Η διαπίστωση αυτή έχει επίσης αποτυπωθεί και από άλλους ερευνητές (Parlapani *et al.* 2014, Parlapani & Boziaris 2016). Έτσι, φαίνεται ότι το TVB-N δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος χημικός δείκτης αλλοίωσης για τους ιχθύες του είδους *Mugil cephalus* αποθηκευμένων στον πάγο.

Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι οι κέφαλοι προερχόμενοι από δύο διαφορετικές παρτίδες, του Οκτώβρη και Δεκέμβρη, παρουσίασαν διαφορά στον χρόνο ζωής (1 ημέρα), στους πληθυσμούς της OMX και των κυριότερων αλλοιωγόνων

μικροοργανισμών αλλά και στην ποσότητα του TVB-N. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις, οι ίδιοι μικροοργανισμοί (συγ-)κυριάρχησαν (*Pseudomonas* και υδροθειούχα βακτήρια), ενώ το TVB-N δεν ξεπέρασε το Νομοθετικό όριο των 30-35 mg N /100g.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων *Mugil cephalus* κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες στον πάγο, βάση οργανοληπτικής αξιολόγησης βρέθηκε να είναι 7 (168h) και 8 ημέρες (192h) για την παρτίδα του Οκτωβρίου και Δεκεμβρίου, αντίστοιχα.

Τα *Pseudomonas* και υδροθειούχα βακτήρια (H_2S) βρέθηκε να επικρατούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων *Mugil cephalus* προερχόμενων από ελληνικά ύδατα.

Το TVB-N δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος χημικός δείκτης αλλοίωσης για τους ιχθύες του είδους *Mugil cephalus* αποθηκευμένων στον πάγο. Η τιμή του παρέμεινε καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (17,7 mg N /100g) σε σχέση με το Νομοθετικό όριο που χρησιμοποιείται για την απόρριψη των νεπών ιχθύων (30-35 mg N /100g).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Ashie I.N.A., Smith J.P., Simpson B.K. (1996) Spoilage and self-life extension of fresh fish and shellfish. Critical reviews.

Botta J.R. (1995) Evaluation of Seafood Freshness Quality, New York, VCH Publishers, Inc.

Bozariis I.S & F.F. Parlapani (2016). Specific Spoilage Organisms (SSO) in Fish. In: Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers. Edited by A. Bevilacqua, M. R. Corbo, M. Sinigaglia & Sykes R.. Elsevier. Woodhead Publishing, pp 60-98

Bremmer H.A. (2000) Toward practical definitions of quality for food science. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40:83-90

Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T., Tolasa S. (2007) Quality differences of whole ungutted seabream (*Sparusaurata*) and seabass (*Dicentrarchuslabrax*) while stored in ice. Food control, 18:391-397

Dainty R.H. (1996) Chemical/biochemical detection of spoilage. International Journal of Food Microbiology, 33:19-33

Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993) Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*,19:283-296

Dalgaard, P. (2003). Spoilage of seafood. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds), *Encyclopedia of food science and nutrition* (pp. 2462-2472). London: Academic Press.

Dhanapal K., Sravani K., Balasubramanian A., Reddy G.V.S. (2013) Quality determination of Rohu (*Labeorohita*) during ice storage. *Tamilnadu Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 9(2):146-152

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

El-Marrakchi A., Bennour M., Bouchriti N., Hamama A., Tagafait H. (1990) Sensory, chemical and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardinapilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*,53(7):600-605

Etienne M. (2005) SEAFOODplus-Traceability-Valid-Methods for chemical quality assessments.Volatile amines as criteria for chemical quality assessment.Ifremer, Nantes.France. <http://archimer.ifremer.fr/doc/2005/rapport-6486.pdf>

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

Gill C.O. (1996) Extending the storage Life of Raw Chilled Meats. Meat Science. Vol 43, No.5, 599-5109

Goulas A.E., Kontominas M.G. (2007) Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparusaurata*) :Biochemical and sensory attributes. Food chemistry,100:287-296

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

Grigorakis K., Alexis M. (2005) Effects of fasting on the meat quality and fat deposition of commercial-size farmed gilt-head bream (*Sparusaurata L.*) fed different dietary regines, Aquaculture Nutrition, 11(5):341-344

Holland B., Brown, Buss D.H. (1993) Fish and fish products, Royal Society of Chemistry, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, U.K.

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

Huidobro A., Pastor A., Tejada M. (2000) Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). Journal of Food Science, 65:1202-1205

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):319-128

Kyranas V.R., Lougovois V.P., Valsamis D.S. (1997) Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. International Journal of Food Science and Technology, 32:339-3470

Leisner J.J., Gram L. (2000) Spoilage of fish. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel O.P.D.(eds) Encyclopedia of Food Microbiology. San Diego: Academic Press, pp.813-820

Lougovois V. P., Kyranas E. R., Kyranas V.R. (2003) Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Food Research International, 36: 551–560.

Malle P., Poumeyrol M. (1989) A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of Food Protection*, 52: 419-423.

Marishita T., Uno K., Araki T., Takahashi T. (1989) Comparison of the fatty acid composition in cultured red sea bream differing in the localities and culture methods and those in the wild fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55:847-852

Mol S., Erkan N., Ucok D., Tosun S.Y. (2007) Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Foods*, 18:120-128

Ninan G.&Zynudheen A.A. (2014)Evaluation of Quality and Shelf Life of Two Commercially Important Fish Species Viz., Tiger Tooth Croaker (*Otolithesruber* Bloch and Schneider) and Flathead Grey Mullet (*Mugilcephalus* Linnaeus) in Iced Conditions.Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological SciencesDecember 2014, Volume 84, Issue 4, pp 1035–1042.

Nychas G.J.E., Skandamis P., Tassou C.C. (2005) Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller S.(ed) *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge UK, pp.176-200

Oehlenschlager 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

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

Oehlenschlager J. (1992) Evaluation of some well established and some unrerrated 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

Olafsdottir G., Lauzon H.L., Martinsdottir E., Kristbergsson K. (2006) Influence of storage temperature on microbial spoilage characteristics of haddock fillets (*Melanogrammus aeglefinus*) evaluated by multivariate quality prediction. *International Journal of Food Microbiology* 111. 112-125

Olafsdottir G., Martinsdottir E., Jonsson E.H. (1997) Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin. In: Lutén J.B., Borresen T., Oehlenschlager J. (ed) *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality, Development in Food Science*. Elsevier, New York, NY, p.507-520

Özogul F., Kuley E., Özogul Y. (2007) Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in

aluminium foil at 2 ± 1 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 903-909.

Ozogul F., Polat A., Ozogul Y. (2004) The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 85: 49–57.

Ozogul Y., Ozogul F., Kuley E., Ozkutuk A.S., Gokbulut C., Kose S. (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. *Food Chemistry* 99, 752–758.

Ozogul Y., Ozyurt G., Ozogul F., Kuley E., Polat A. (2005) Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. *Food Chemistry*, 92: 745–751.

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

Parlapani F.F. & Boziaris I.S. (2016). Exploration of microbiological quality of fish using –omics technology, Hydromedit 2016, 2nd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment conference, Messolonghi, Greece, 10-12 November.

Parlapani F.F., Kormas K. Ar. & I.S. Boziaris (2015). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 2386–2394

Parlapani F.F., Malouchos A., Haroutounian S.A., Boziaris I.S. (2014) Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189,153-163

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

Pastoriza L., Sampedro G., Herrera J.J., Cabo M.L. (1998) Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slices of hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chemistry*, 61: 23-28.

Perez-Villarreal B., Pozo R. (1990) Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnusalalunga*). *Journal of Food Science*,55:678-682

Rodriguez O., Barros-Velazquez J., Ojea A., Pineiro C., Aubourg S.P. (2003) Evaluation of Sensory and Microbiological Changes and Identification of Proteolytic

Bacteria during the Iced Storage of Farmed Turbot (*Psetta maxima*). Journal of Food Science 68 (5), 2764-2771.

Shalaby A.R., Moawad R.K., Emam W.H., Mohamed G.F. (2013) Quality and Shelf-Life of Cold Stored Mullet Fish (*MugilCephalus*) Pretreated by Sorbate/Thyme Oil with Emphasis on Biogenic Amines. Current Nutrition & Food Science, 9 (4), DOI : 10.2174/15734013113099990003

Sveinsdottir K., Martinsdottir E., Hyldig G., Jorgensen B., Kristbersson K. (2002) Application of Quality Index Method (QIM) Scheme in Shelf-life Study of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). Journal of Food Science, 67(4):1570-1579

Taliadorou D., Papadopoulos V., Domvridou E., Savvaidis I.N., Kontomins M.G. (2003) Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filtered Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchuslabrax*) stored in ice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83:1373-1379

Tzikas Z., Ambrosiadis I., Soutos N., Georgakis Sp. (2007) Quality assessment of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) and blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) during storage in ice. Food Control, 18: 1172–1179.

Çelik U., Altinelataman C., Dinçer T., Acarlı D. (2012) Comparison of Fresh and Dried Flathead Grey Mullet (*Mugilcephalus*, Linnaeus 1758) Caviar by means of Proximate

Composition and Quality Changes during Refrigerated Storage at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 12: 1-5*

Vaz-Pirez, Paulo, Pedro, Micaela Mota, Seixas, Lapa-Guimaraes, Judite, Pickova, Jana, Lindo, Andreia, Silva, Teresa (2008) Sensory, microbiological, physical and chemical properties of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail short fin squid (*Illexcoindetii*) stored in ice. *Food Science and Technology*, 41(9):1655-1664

Vyncke W., Luten J., Brunner K., Moermans R. (1987) Determination of total volatile bases in fish: a collaborative study by the West European Fish Technologists Association (WEFTA). *Z. Lebensm. Unters.Forsch.* 184:110-114

6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

Γεωργάκης (2005): Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής προέλευσης. Έκδοση 2. Κεφ. 19: Τεχνολογία Αλιευμάτων

6.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mugilcephalus> (Πρόσβαση:04-12-2017)

<http://www.statistics.gr/el/statistics/agr> (Πρόσβαση:04-12-2017)