

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Προσδιορισμός οξείδωσης λίπους αλιευμάτων  
υπό διάφορες συνθήκες συντήρησης»**

**Γεώργιος Τζεράχογλου**

**ΒΟΛΟΣ 2019**

**«Προσδιορισμός οξείδωσης λίπους αλιευμάτων υπό διάφορες συνθήκες αποθήκευσης»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

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

**2) Έλενα Μεντέ (Δρ.),** Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος.***

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

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να ολοκληρώσω την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενης από τους κα Έλενα Μεντέ και κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Φωτεινή Παρλαπάνη όπως και τον κ. Σωτήρη Οικονόμου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, αλλά και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον πρώην συνάδερφό μου κ. Μανώλη Τάσιο, για τις πολύτιμες συμβουλές του και για την μεταλαμπάδευση των επιστημονικών και τεχνικών γνώσεών του, εντός του εργαστηριακού χώρου. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για τη συμπαράσταση και κατανόηση καθ' όλο το χρονικό διάστημα των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φρέσκοι ιχθύες είναι ιδιαίτερα ευπαθή τρόφιμα με περιορισμένη διάρκεια ζωής, ακόμη και σε κανονικές συνθήκες συντήρησης, λόγω της βιολογικής τους σύστασης. Οι καταναλωτικές απαιτήσεις φρέσκων ιχθύων με μακρά διάρκεια ζωής και η ορθή διαχείριση του ενεργειακού κόστους στη μεταποιητική αλυσίδα καθιστούν τον έλεγχο της ποιότητάς τους βασικό μέλημα στη βιομηχανία τροφίμων. Ο άμεσος προσδιορισμός της ποιότητας όμως είναι δύσκολος λόγω χρονικών περιθωρίων και τεχνικών περιορισμών, που προκύπτουν από τους υπεύθυνους για την αλλοίωση μηχανισμούς, όπως είναι η μικροβιακή και ενζυμική δραστηριότητα και η οξείδωση του λίπους τους.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η εξέλιξη της αλλοίωσης του λίπους στη σαρδέλα (*Sardina pilcardus*) και στη γόπα (*Boops boops*), κάτω από αερόβιες συνθήκες συντήρησης στους 2°C. Για την πληρέστερη εικόνα της ποιοτικής κατάστασης, ως συνάρτηση μικροβιολογικών-φυσικοχημικών και αισθητηριακών παραμέτρων, μελετήθηκε το μοντέλο ανάπτυξης των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, προσδιορίστηκαν ο βαθμός οξύτητας και ο αριθμός υπεροξειδίων και επίσης αποτυπώθηκαν οι μεταβολές των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Και για τη σαρδέλα αλλά και για τη γόπα φαίνεται ότι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί είναι τα θειοαναγωγικά βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*) και οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*), από τους οποίους επικρατέστεροι είναι οι πρώτοι. Η ολική μικροβιακή χλωρίδα, οι ψευδομονάδες και τα θειοαναγωγικά βακτήρια της σαρδέλας εμφάνισαν ταχύτερη ανάπτυξη. Στην μέτρηση  $D_0$  βρέθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα ( $4.52 \log \text{ cfu/g}$ ,  $2.50 \log$

cfu/g και 3.47log cfu/g έναντι 6.54log cfu/g, 5.44log cfu/g και 6.06log cfu/g αντιστοίχως), ενώ κατέληξαν περίπου στα ίδια επίπεδα με αυτά της γόπας (8.74log cfu/g, 7.99log cfu/g και 8.37log cfu/g έναντι 9.17log cfu/g, 8.50log cfu/g και 9.02log cfu/g αντιστοίχως). Τα εντεροβακτηριοειδή, στα δείγματα της γόπας δεν ανιχνεύθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (<1log cfu/g), ενώ στα δείγματα της σαρδέλας, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξή τους. Στο βαθμό οξύτητας υπήρξε διαφορά του εύρους που κυμάνθηκαν οι τιμές, αλλά και του ρυθμού που μεταβλήθηκαν αυτές. Στη σαρδέλα ξεκίνησε από 1.3ml NaOH/100g λιπιδίων και κατέληξε στα 40.4ml NaOH/100g λιπιδίων, έναντι 6.0ml NaOH/100g λιπιδίων και 12.6ml NaOH/100g λιπιδίων αντιστοίχως στη γόπα. Διαφορά υπήρξε και στον τρόπο που κυμάνθηκαν οι τιμές του αριθμού υπεροξειδίων για τα δύο είδη. Ενώ στη σαρδέλα εμφάνισαν ραγδαία αύξηση (από 15.4meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων έως 82.4meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων), στη γόπα αντιθέτως οι τιμές μειώθηκαν από 2.4meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων σε 0.1meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων. Το pH κυμάνθηκε στο ίδιο εύρος τιμών και για τα δύο είδη (6.4-7.0), με μικρή διαφορά στον τρόπο που αυτό μεταβλήθηκε, καθώς στη σαρδέλα παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση (6.3), κατά τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Αυτό που φάνηκε κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση των ιχθύων είναι πως και τα δύο είδη φτάνουν στο σημείο της απόρριψης μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησής τους στους 2°C.

**Λέξεις-Κλειδιά:** Σαρδέλα (*Sardina pilcardus*), Γόπα (*Boop boops*), Αλλοίωση λίπους, Οξειδωτική τάγγιση (Αυτοξείδωση), Βαθμός Οξύτητας, Αριθμός Υπεροξειδίων.

## ABSTRACT

Fresh fish are particularly susceptible foods with a limited shelf life, even under normal conditions of preservation due to their biological composition. Consumption requirements for fresh products with prolonged life span combined with efficient management of energy costs in the processing chain, make quality control of fish a key concern for the food industry. However, direct quality determination is difficult because of time limits and technical constraints resulting from the mechanisms responsible for the deterioration, such as microbial, enzymic activity and fat oxidation.

This study was conducted to investigate the development of fat spoilage in selected fish species, a fatty [sardine (*Sardina pilcardus*)] and a non-fatty [bogue (*Boops boops*)], preserved in aerobic conditions at 2°C. The quality status, as a function of microbiological-physicochemical and sensorial parameters, was determined by the growth model of specific spoilage microorganisms, the degree of acidity, the peroxide value and changes in the organoleptic characteristics. Both, for sardine and for bogue, it appears that dominant spoilage microorganisms are *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas spp.*, of which the predominant are the first. The total microbial flora, *Pseudomonas spp.* and *Shewanella putrefaciens* showed faster growth in case of sardine. Although  $D_0$  was found to be lower for sardine samples (4.52log cfu/g, 2.50log cfu/g and 3.47logs cfu/g versus 6.54log cfu/g, 5.44log cfu/g and 6.06log cfu/g respectively),  $D_6$  ended at the same levels (8.74log cfu/g, 7.99log cfu/g and 8.37log cfu/g versus 9.17log cfu/g, 8.50log cfu/g and 9.02log cfu/g respectively) for both fish species. Regarding *Enterobacteriaceae*, in bogue's samples there were not detected throughout the

experiment ( $<1 \log \text{ cfu/g}$ ), while in sardine's samples there was no growth observed, according to their low levels at which their values fluctuated. As for the degree of acidity, there was a difference in the range of values as well as in the rate at which they changed. The sardine was started from 1.3ml NaOH/100g fat and ended at 40.4ml NaOH/100g fat, versus 6.0ml NaOH/100g fat and 12.6ml NaOH/100g fat respectively. There was also a difference in the peroxide value for the two fish. While sardine showed a rapid increase from 15.4meq  $\text{O}_2/\text{kg}$  to 82.4meq  $\text{O}_2/\text{kg}$ , the bogue on the contrary, showed a reduction from 2.4meq  $\text{O}_2/\text{kg}$  to 0.1meq  $\text{O}_2/\text{kg}$ . The pH ranged in the same range for both fish species (6.4-7.0) with little difference in the way it changed, as for sardine there was a slight reduction (6.3) on the 2<sup>nd</sup> day of preservation. What appeared in the organoleptic assessment of the quality of the fish is that both species reach the point of rejection after the 4<sup>th</sup> day of preservation at 2°C.

**Keywords:** *Sardine (Sardina pilcardus), Bogue (Boops boops), Fat Spoilage, Oxidative Rancidity, Degree of Acidity, Peroxide Value.*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	12
1.1. Γενικά	12
1.1.1. Σύσταση και διατροφική αξία των ιχθύων	12
1.1.2. Φρεσκότητα και συντήρηση των ιχθύων	14
1.2. Η αλλοίωση των ιχθύων	15
1.2.1. Μικροβιακή αλλοίωση	15
1.2.1.1. Ενδογενής μικροχλωρίδα-Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί	17
1.2.1.2. Παράγοντες ετερογένειας και κινητική της ανάπτυξης	18
1.2.1.3. Προϊόντα και δείκτες ποιότητας μικροβιακής δράσης	20
1.2.2. Ενζυμική αλλοίωση	22
1.2.2.1. Γλυκολυτική δράση ενζύμων	22
1.2.2.2. Αυτολυτική δράση ενζύμων	24
1.2.2.3. Επιπτώσεις της ενζυμικής δράσης	25
1.2.3. Χημική αλλοίωση	26
1.2.3.1. Οξειδωτική τάγγιση (Αυτοοξείδωση)	27
1.2.3.2. Φωτοευαισθητοποιημένη οξείδωση (Φωτοξείδωση)	34
1.2.3.3. Μέθοδοι εκτίμησης της λιπιδικής οξείδωσης	35
1.3. Οργανοληπτικός έλεγχος	44
1.3.1. Μέθοδοι οργανοληπτικής μελέτης	44
1.3.1.1. Επιλογή και σχεδίαση μεθόδου	45
1.3.1.2. Αξία οργανοληπτικής μελέτης	45
1.4. Σκοπός και στόχος της μελέτης	46

<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	48
2.1. Επιλογή των δειγμάτων	48
2.1.1. Προετοιμασία και κατανομή των δειγμάτων	49
2.2. Μικροβιολογικές αναλύσεις	50
2.2.1. Εργαστηριακή υποδομή	50
2.2.1.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός	51
2.2.1.2. Παρασκευή θρεπτικών υλικών	51
2.2.2. Προεργασία πειράματος	53
2.2.2.1. Ομογενοποίηση δείγματος	53
2.2.2.2. Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις	54
2.2.3. Πειραματική διαδικασία - Τεχνικές εμβολιασμού	54
2.2.4. Καταμέτρηση τρυβλίων - Έκφραση αποτελεσμάτων	56
2.2.4.1. Καταμέτρηση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας ( <i>OMX</i> )	57
2.2.4.2. Καταμέτρηση Ψευδομονάδων ( <i>Pseudomonas spp.</i> )	57
2.2.4.3. Καταμέτρηση θειοαναγωγικών βακτηρίων( <i>S.putrefaciens</i> )	58
2.2.4.4. Καταμέτρηση εντεροβακτηριοειδών( <i>Enterobacteriaceae</i> )	58
2.3. Χημικές αναλύσεις	59
2.3.1. Εξαγωγή του βάρους του λίπους	59
2.3.2. Προσδιορισμός του Βαθμού Οξύτητας	62
2.3.3. Προσδιορισμός του Αριθμού Υπεροξειδίων	64
2.3.4. Προσδιορισμός του pH	69
2.4. Οργανοληπτικός έλεγχος	70
2.4.1. Χαρακτηριστικά αξιολόγησης	71
2.4.2. Κλίμακα βαθμολόγησης	71

<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	73
3.1. Μικροβιολογικές αναλύσεις	73
3.1.1. Καταμέτρηση μικροοργανισμών στα δείγματα της σαρδέλας	73
3.1.2. Καταμέτρηση μικροοργανισμών στα δείγματα της γόπας	74
3.2. Χημικές αναλύσεις	76
3.2.1. Περιεχόμενο λίπος	76
3.2.2. Βαθμός Οξύτητας	77
3.2.3. Αριθμός Υπεροξειδίων	78
3.2.4. Μεταβολή του pH	79
3.3. Οργανοληπτική αξιολόγηση	80
3.3.1. Οργανοληπτικό σκορ	80
3.4. Συζήτηση	81
3.4.1. Μικροβιολογικά δεδομένα	81
3.4.2. Λιπιδικό περιεχόμενο	86
3.4.3. Λιπιδική υδρόλυση	89
3.4.4. Λιπιδική οξείδωση	90
3.4.5. Μεταβολή του pH	100
3.4.6. Οργανοληπτικά αποτελέσματα - Χρόνος ζωής	102
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	104
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	106
5.1. Ξερόγλωσση βιβλιογραφία	106
5.2. Ελληνική βιβλιογραφία	111
5.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία	113

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Γενικά

Με τη συνεχόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και την ανάγκη για συντήρηση και μεταφορά των τροφίμων από το ένα μέρος στο άλλο, έχει γίνει επιτακτική ανάγκη η ορθή διαχείρισή τους, ώστε αυτά να μπορούν να διατηρήσουν την ποιότητά τους, τη θρεπτική τους αξία, αλλά και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής.

Η αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να συμβεί λόγω χημικής, ενζυμικής και μικροβιακής δράσης. Η χημική και μικροβιακή αλλοίωση είναι υπεύθυνες για την απώλεια του 25% της ακαθάριστης πρωτογενούς γεωργικής και αλιευτικής παραγωγής ετησίως (Baird-Parker, 2000). Το ¼ των παγκόσμιων προμηθειών σε τρόφιμα (Huis in't Veld, 1996) και το 30% των εκφορτωθέντων ιχθύων (Amos, 2007) χάνονται μόνο και μόνο λόγω μικροβίων. Υπογραμμίζεται, ότι η ποιότητα των ιχθύων με την αύξηση των απαιτήσεων της αγοράς σε υψηλής πρωτεϊνικής αξίας τρόφιμα, αποτελεί βασική μέριμνα για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς η ανησυχία για τη δημόσια υγεία έχει καταστεί ζήτημα.

### 1.1.1. Σύσταση και διατροφική αξία των ιχθύων

Οι ιχθύες είναι μία πολύ θρεπτική τροφή, η σύσταση των οποίων διαφέρει ανάλογα με το είδος, το φύλο και την ηλικία, πράγμα που οφείλεται στην γεωγραφική

τοποθεσία, την εποχή, τη θερμοκρασία των νερών, αλλά και τη φάση του αναπαραγωγικού κύκλου στην οποία βρίσκονται (Huss, 1995).

Ως διατροφική αξία των ιχθύων ορίζεται η περιεκτικότητά τους σε ουσίες όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, βιταμίνες, νερό, μέταλλα, ιχνοστοιχεία και υδατάνθρακες, που συγκεντρώνουν και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον (Μπρατσιάκος, 2016).

**Πίνακας 1.1.1.** Διατροφικό περιεχόμενο των ιχθύων (Προσαρμογή από Μυλωνάκη, 2007)

<b>Συστατικά</b>	<b>Ουσίες-στοιχεία</b>
Πρωτεΐνες	Κολλαγόνο, Ιχθυουλίνη
Λιπαρά οξέα	<b>ω-3:</b> [20:5] εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύοξύ(EPA), [22:6] δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA), [18:3] α-λινολενικό οξύ (ALA) <b>ω-6:</b> [18:2] λινελαϊκό οξύ, [20:4] αραχιδονικό οξύ
Βιταμίνες	Υδατοδιαλυτές: <b>B<sub>1</sub></b> (θειαμίνη), <b>B<sub>2</sub></b> (ριβοφλαβίνη) <b>B<sub>3</sub></b> (νιασίνη), <b>B<sub>5</sub></b> (παντοθενικό οξύ), <b>B<sub>6</sub></b> (πυριδοξίνη) Λιποδιαλυτές: <b>A</b> (ρετινόλη), <b>D</b> (εργοκαλσιφερόλη, χολικαλσιφερόλη)
Ιχνοστοιχεία & μέταλλα	<b>(Ca, K, Na, I, Mn, Mg, Zn, P)</b>
Υδατάνθρακες	ποσοστό <1%

Το κολλαγόνο ανήκει στην κατηγορία των δομικών πρωτεϊνών και είναι μία από τις πιο διαδεδομένες ζωικές πρωτεΐνες. Η ιχθυουλίνη, προσφέρει στον οργανισμό τα απαραίτητα αμινοξέα και περιλαμβάνεται σε λευκώματα των ιχθύων. Το μεγαλύτερο μέρος του λίπους, που περιέχεται στους ιχθύες αποτελείται από μακράς αλυσού ω-3 λιπαρά οξέα, ενώ περιέχονται μικρότερες ποσότητες ω-6 λιπαρών οξέων. Σημαντικές ποσότητες ασβεστίου και φωσφόρου περιέχονται κυρίως στα οστά. Το νάτριο και το κάλιο παίζουν σπουδαίο ρόλο στη φυσιολογία των κυττάρων. Το ιώδιο συγκεντρώνεται στους λιπαρούς ιστούς. Το μαγνήσιο είναι σημαντικό στο σύστημα ενεργοποίησης των ενζύμων, ενώ συστατικό στοιχείο των ενζύμων είναι ο ψευδάργυρος, όπως και το μαγγάνιο.

### 1.1.2. Φρεσκότητα και συντήρηση των ιχθύων

Ο όρος «φρεσκότητα» ορίζει την κατάσταση στην οποία η εμφάνιση, η οσμή και η υφή του νωπού αλιευμένου ιχθύος δεν απέχουν από τα χαρακτηριστικά που είχε όταν ήταν ζωντανός σύμφωνα με τους Oehlenschläge and Sorensen, (1997). Ο ορισμός της διάρκειας ζωής ενός ιχθύος, σύμφωνα με τους Kilcast and Subramaniam (2000), θα μπορούσε να οριστεί ως ο χρόνος κατά τον οποίο αυτός θα παραμείνει ασφαλής και θα διατηρεί τα οργανοληπτικά, χημικά, φυσικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του. Η διάρκεια ζωής των ιχθύων είναι συνάρτηση της σύστασής τους, της επεξεργασίας που υπόκεινται και των περιβαλλοντικών συνθηκών, στις οποίες συντηρούνται (Bili and Taoukis, 2007).

Η επεξεργασία των ιχθύων αποτελεί μια πολύ σημαντική πτυχή της αλυσίδας και μπορεί να υποδιαιρεθεί στην πρωτογενή μεταποίηση νωπού ιχθύος και στη δευτερογενή μεταποίηση που παράγει προϊόντα διατηρημένα με απλή ψύξη, κατεψυγμένα και κονσερβοποιημένα ([wikipedia.org/Fish\\_processing](https://wikipedia.org/Fish_processing)). Τα νωπά αλιεύματα είναι ευαίσθητα και χάνουν εύκολα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν υψηλή διατροφική αξία. Έτσι, η διακίνησή τους απαιτεί ταχείες διαδικασίες, υπό άριστες υγειονομικές συνθήκες. Η χρονική υστέρηση μεταξύ της αλίευσης, της μεταφοράς και της διάθεσης ενθαρρύνει την αλλοίωση των ιχθύων, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητάς τους και τη βραχεία διάρκεια ζωής τους.

## **1.2. Η αλλοίωση των ιχθύων**

Ως αλλοίωση τροφίμων θεωρείται κάθε μεταβολή η οποία καθιστά το προϊόν ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση (Huis in't Veld, 1996). Η αλλοίωση των ιχθύων είναι μία σύνθετη διαδικασία η οποία επέρχεται ως συνέπεια τριών διαφορετικών μηχανισμών: α) της μικροβιακής δραστηριότητας, β) της αυτόλυσης και γ) της χημικής οξειδωσης των λιπιδίων τους (Gram & Huss 1996).

Κατά την αλλοίωση λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις (αποδόμηση πρωτεϊνών και λιπιδίων), που προκαλούν την αρχική υποβάθμιση της ποιότητας με μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της σάρκα τους και στη συνέχεια η μικροβιολογική δραστηριότητα, που τελικά καθορίζει τη διάρκεια ζωής τους. Οι ιχθύες αλλοιώνονται αμέσως μετά την αλίευσή τους με ορατές αλλαγές στην εμφάνιση τους όπως ο σχηματισμός βλέννας ή με αλλαγές στη δομή της σάρκας τους που είναι δύσκολο να αναγνωριστούν. Ο βαθμός που ο κάθε μηχανισμός συμβάλλει στη συνολική αλλοίωση εξαρτάται από το είδος του ιχθύος (π.χ. άπαχος ή λιπαρός), τις αρχικές πρακτικές χειρισμού του και τις θερμοκρασιακές συνθήκες συντήρησής του.

### **1.2.1. Μικροβιακή αλλοίωση**

Γενικά είναι αποδεκτό ότι η σάρκα των πρόσφατα αλιευθέντων ιχθύων είναι στείρα μικροβίων αλλά το δέρμα, τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα φέρουν βακτήρια, η είσοδος των οποίων αποτρέπεται από τη φυσική άμυνα του οργανισμού (Adams and Moss, 1995).

Μετά το θάνατο των ιχθύων, οι μικροοργανισμοί αυτοί εισέρχονται και διαχέονται στη σάρκα, όπου αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έντονους ρυθμούς. Εκεί αρχίζουν να μεταβολίζουν τις “γύρω” ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, παράγοντας τις πτητικές ενώσεις που συνδέονται με την αλλοίωση. Αν και υπό συνθήκες αποθήκευσης σε ψύξη, αυτό είναι ένα επιφανειακό φαινόμενο, ωστόσο κάτω από συνθήκες κακών θερμοκρασιών συντήρησης ή λόγω ακατάλληλου χειρισμού, οι μικροοργανισμοί εισβάλλουν σε σχετικά σημαντικό βαθμό στον αποστειρωμένο μυϊκό ιστό, με αποτέλεσμα την ταχύτερη αλλοίωση. Η αλλοίωση μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών, που τελικά γίνεται αντιληπτή μέσω των μεταβολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ιχθύων (Πίν. 1.2.1).

**Πίνακας 1.2.1.** Μικροβιακή αλλοίωση ιχθύων (προσαρμοσμένο από Gram and Huss, 1996)

<b>Μικροβιακή δραστηριότητα</b>	<b>Οργανοληπτική εκδήλωση</b>
Διάσπαση συστατικών του ψαριού	Παραγωγή δυσάρεστων οσμών
Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαριτικού υλικού	Σχηματισμός “βλέννας”
Ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων	Ορατές χρωστικές ή μη αποικίες
CO <sub>2</sub> από υδατάνθρακες ή αμινοξέα	Παραγωγή αερίων
Παραγωγή ουσιών που διαχέονται	Αποχρωματισμός-αλλαγή χρώματος

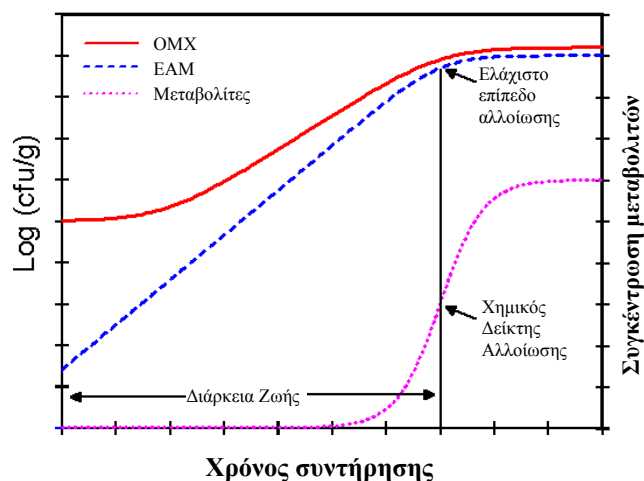
Το μικροβιακό φορτίο του δέρματος ανέρχεται σε  $10^2$ - $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>, στα βράγχια σε  $10^3$ - $10^6$  cfu/g ιστού και στο πεπτικό σύστημα σε  $10^3$ - $10^8$  cfu/ml περιεχομένου (Μπεζιρτζόγλου, 2016). Επειδή η αλλοίωση είναι το αποτέλεσμα της μικροβιακής ανάπτυξης και δραστηριότητας, ο μικροβιακός πληθυσμός και ο βαθμός αλλοίωσης συσχετίζονται και έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο ρόλο τους, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολλών στρατηγικών συντήρησης, για τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού τους στους ιχθύες.



### 1.2.1.1. Ενδογενής μικροχλωρίδα - Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί

Η ενδογενής μικροχλωρίδα των ιχθύων έχει για χρόνια μελετηθεί ενώ ο χάρτης ταξινόμησης έχει υποστεί αλλαγές μέχρι σήμερα. Όλοι οι ερευνητές έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τους περισσότερους ιχθύες αντανακλούν τον μικροβιακό πληθυσμό του περιβάλλοντός τους (Ashie *et al.*, 1996). Ο μικροβιακός πληθυσμός των ιχθύων που προέρχονται από θερμά ύδατα, αποτελείται κυρίως από γένη μεσόφιλων Gram-θετικών βακτηρίων *Micrococcus*, *Coryneforms* και *Bacillus*. Ο αντίστοιχος πληθυσμός των ψυχρών υδάτων αποτελείται κυρίως από γένη ψυχρόφιλων Gram-αρνητικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium* και *Vibrio*. Η αναλογία των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων ποικίλει ανάλογα με τα ύδατα αλίευσης και γενικά επηρεάζει τον χρόνο της επακόλουθης αλλοίωσης σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης (Πιτσούλη, 2009).

Η απλή μορφή αλλοίωσης είναι η περίπτωση όπου εμφανίζονται αντιληπτές μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ιχθύος (οσμή, γεύση και εμφάνιση), ως αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης συγκεκριμένου κάθε φορά μικροβιακού πληθυσμού, ο οποίος είναι γνωστός ως Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) (Huis in't Veld 1996, Gram and Huss 1996). Το επίπεδο της ανάπτυξης των EAM χαρακτηρίζεται ως Ελάχιστο Επίπεδο Αλλοίωσης και προκαλεί την παραγωγή ουσιών (μεταβολίτες), οι συγκεντρώσεις των οποίων αντιπροσωπεύουν την αλλοίωση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες της (Chemical Spoilage Index). Η διαδικασία της μικροβιακής αλλοίωσης παρουσιάζεται στο γράφημα του Σχ. 1.2.1 (προσαρμογή από Κουτσομανής, 2000).



**Σχήμα 1.2.1.** Σχηματική παράσταση της μικροβιακής αλλοίωσης

Στο παραπάνω γράφημα αναπαρίσταται η διαφορά μεταξύ του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού και των EAM, οι οποίοι αρχικά αποτελούν ένα μικρό μέρος του πληθυσμού, αλλά λόγω των ευνοϊκότερων συνθηκών καταφέρνουν να αναπτύσσονται με ταχύτερους ρυθμούς και να επικρατήσουν όταν ο ιχθύς αλλοιώνεται.

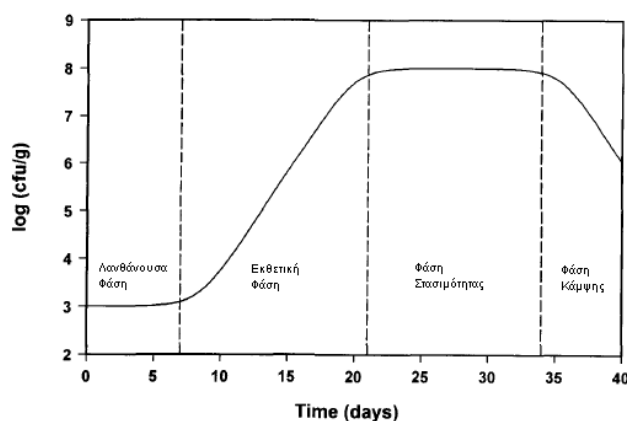
### 1.2.1.2. Παράγοντες ετερογένειας και κινητική της ανάπτυξης

Αν και η ετερογένεια του μικροβιακού φορτίου ενός ιχθύος εξαρτάται από το περιβάλλον που έχει αλιευτεί και όχι από το είδος του (Shewan, 1977) σύμφωνα με πολλούς ερευνητές, ο ρυθμός της μικροβιακής αλλοίωσης επηρεάζεται από το είδος, το περιεχόμενο λίπος, το σχήμα και το μέγεθος, τις εποχιακές βιολογικές μεταβολές, τις διατροφικές συνήθειες, αλλά και τις τεχνικές αλίευσης, επεξεργασίας και αποθήκευσης (Βέρδος, 2014). Οι παράγοντες που καθορίζουν τη μικροβιακή χλωρίδα που αποικίζει έναν ιχθύ και επηρεάζουν τα είδη που θα επικρατήσουν και θα πολλαπλασιαστούν σε αυτόν ταξινομούνται σε πέντε ομάδες όπως φαίνεται παρακάτω (Πίν. 1.2.2):

**Πίνακας 1.2.2.** Παράγοντες μικροβιακής πολυπλοκότητας στα αλιεύματα

	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΕΠΙΡΡΟΗ
1	Ενδογενείς (Intrinsic)	Δομή, σύσταση της σάρκας και ποικιλόθερμη φύση του ψαριού, $a_w$ , pH, Eh
2	Εξωγενείς (Extrinsic)	Θερμοκρασία, σχετική υγρασία και σύσταση της ατμόσφαιρας αποθήκευσης
3	Ενδογενείς βιοτικοί (Implicit)	Φαινόμενα ανταγωνισμού ή συνεργισμού μεταξύ των βακτηρίων
4	Κατά την επεξεργασία (Processing)	Φυσικές ή χημικές μέθοδοι επεξεργασίας που προσδιορίζουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα
5	Συνεργιστικοί (Emergent Effect)	Αλληλεπίδραση παραγόντων με αύξηση της έντασης των φαινομένων

Η τροποποίηση ενός ή περισσότερων από τους περιοριστικούς παράγοντες οδηγεί στην ανάπτυξη ενός μικροβιακού πληθυσμού, ο οποίος θα αρχίσει να πολλαπλασιάζεται σε σχέση με το χρόνο, σύμφωνα με την καμπύλη που παρουσιάζεται στο σχήμα 1.2.2 (Προσαρμογή από Κουτσουμανής, 2000):



**Σχήμα 1.2.2.** Καμπύλη ανάπτυξης ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών

Με βάση την παραπάνω καμπύλη η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις φάσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως: λανθάνουσα φάση (Lag phase), εκθετική φάση (exponential phase), φάση στασιμότητας, (stationary phase) και φάση κάμψης ή θανάτου (death phase). Όπως φαίνεται, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών στη λανθάνουσα φάση είναι αργός γιατί πραγματοποιούνται

βιοχημικές διεργασίες, για την προσαρμογή τους στο νέο περιβάλλον. Μετά το πέρας της προσαρμογής τους, ενώ τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά με τον ταχύτερο δυνατό ρυθμό, επιδεικνύουν ισορροπημένη ανάπτυξη αλλά και μεταβολική δράση. Τα προϊόντα του μεταβολισμού που συσσωρεύονται λόγω της αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας, παρεμποδίζουν τα κύτταρα και μειώνουν το ρυθμό της ανάπτυξής τους, με την εισαγωγή στη φάση στασιμότητας. Αν και η διάρκεια της στασιμότητας ποικίλει ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών και το μέσο ανάπτυξης, τελικά η αυξημένη συγκέντρωση των παρεμποδιστικών μεταβολιτών οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων (φάση θανάτωσης). Αφού έχει αποδειχθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η αλλοίωση των ιχθύων προκαλείται από την μικροβιακή δράση, η συλλογή πληροφοριών για την καμπύλη της μικροβιακής τους ανάπτυξης θα μπορούσε να οδηγήσει στον προσδιορισμό του χρόνου ζωής των ιχθύων μετά την αλίευση.

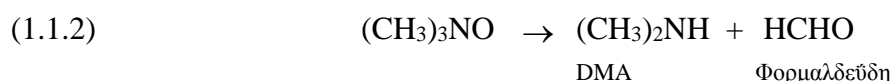
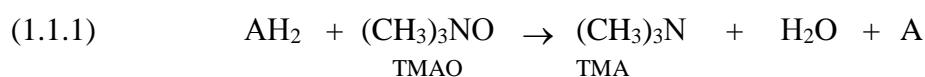
### **1.2.1.3. Προϊόντα και δείκτες ποιότητας μικροβιακής δράσης**

Βάσει της ομόφωνης αποδοχής του βακτηριακού πληθυσμού ως αποκλειστικά υπευθύνου για την αλλοίωση, η μέτρησή του είναι μία χρήσιμη μέθοδος για την εκτίμηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής των νωπών ιχθύων. Ωστόσο στην πράξη, τα μικροβιολογικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται εναλλακτικά είναι το φορτίο των ΕΑΜ και κυρίως η μεταβολική τους δραστηριότητα, αφού τα προϊόντα της είναι που σχετίζονται περισσότερο άμεσα με την αλλοίωση των ιχθύων. Στη βιβλιογραφία, έως σήμερα έχουν αναφερθεί διάφορες χημικές ουσίες, που παράγονται μεταθανάτια από τους μικροοργανισμούς. Συνοπτική περιγραφή τους παρουσιάζεται στον Πίν. 1.2.3.

**Πίνακας 1.2.3.** Ουσίες βακτηριακής αλλοίωσης (Church, 1998)

Αλλοιογόνα βακτήρια	Προϊόντα αλλοίωσης
<i>Shewanella putrefaciens</i>	TMA, H <sub>2</sub> S, CH <sub>3</sub> SH, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S, HX
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	TMA, HX
<i>Pseudomonas spp.</i>	Αλδεϋδες, Κετόνες, Εστέρες, σουλφίδια (πλην H <sub>2</sub> S)
<i>Vibrionaceae</i>	TMA, H <sub>2</sub> S
<i>Aeróβια spoilers</i>	NH <sub>3</sub> , Οξικό, Βουτυρικό και Προπιονικό οξύ
TMA: Τριμεθυλαμίνη, H <sub>2</sub> S: Υδροθείο, CH <sub>3</sub> SH: Μεθυλ-μερκαππτάνη; (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S: Διμεθυλοσουλφίδιο, HX: Υποξανθίνη, NH <sub>3</sub> : Αμμωνία	

Πολλά βακτήρια χρησιμοποιούν το οξειδίο τριμεθυλαμίνης (TMAO) ως τελικό αποδέκτη υδρογόνου όταν τα αποθέματα οξυγόνου εξαντληθούν, ώστε να αναπτυχθούν σε ανοξικές συνθήκες, σύμφωνα με τις αντιδράσεις 1.1.1 και 1.1.2 (Ashie *et al.*, 1996):



όπου A είναι ένα οξειδωμένο υπόστρωμα και AH<sub>2</sub> είναι η ανηγμένη μορφή του υποστρώματος. Τα επίπεδα τριμεθυλαμίνης (TMA) χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για τον προσδιορισμό της μικροβιακής δράσης που οδηγεί στην αλλοίωση των ιχθύων. Μία χημική ουσία που ορίζεται ως προϊόν μεταβολισμού ενός ειδικού αλλοιογόνου μικροοργανισμού και πιστοποιεί την μικροβιακή του δράση, για να χαρακτηριστεί ως δείκτης ποιότητας πρέπει: α) να βρίσκεται σε μηδενική ή μικρή αρχική συγκέντρωση και να αυξάνεται όσο προχωρά η αλλοίωση, β) να μην επηρεάζεται δυσμενώς από τον υπόλοιπο βακτηριακό πληθυσμό και να μην αυξομειώνεται, γ) να σχετίζεται με κάποιο οργανοληπτικό χαρακτηριστικό και δ) ο προσδιορισμός της να είναι ταχύς, εύκολος και ακριβής (Κουτσουμανής, 2000).

### **1.2.2. Ενζυμική αλλοίωση**

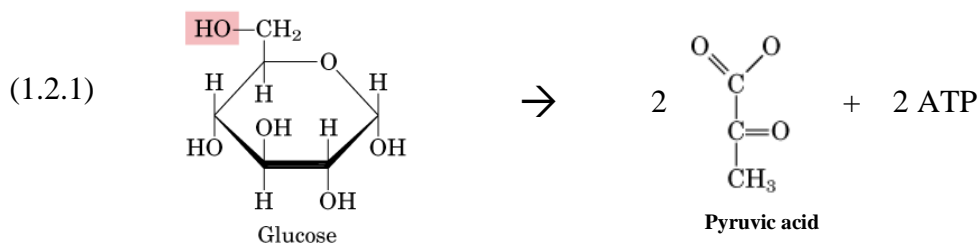
Αν και η αλλοίωση των ιχθύων αποδίδεται στη δραστηριότητα μολυσματικών μικροοργανισμών, η απώλεια φρεσκότητας η οποία προηγείται της μικροβιακής αλλοίωσης, εμπλέκει αυτολυτικές αντιδράσεις τόσο των ενδογενών ενζύμων του μυϊκού ιστού, αλλά και των ενζύμων που διαρρέουν από το έντερο.

Στους ζώντες ιχθύες, οι κινήσεις τους ελέγχονται από χημικά σήματα που προκαλούν την ελαστική σύσφιξη και χαλάρωση των μυών. Μετά το θάνατο, το κυκλοφορικό σύστημα σπάει και τα χημικά σήματα διαρρέουν μέσα στους μύες, προκαλώντας τη σκλήρυνσή τους. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως νεκρική ακαμψία.

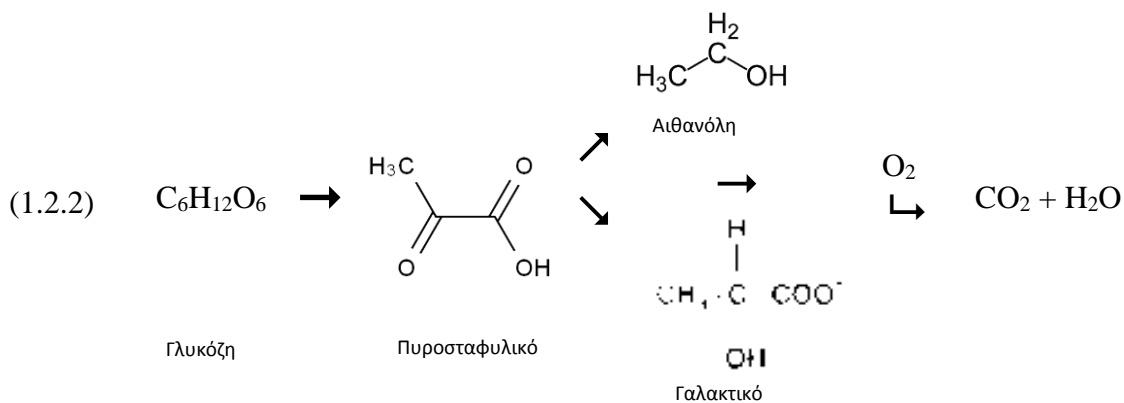
#### **1.2.2.1. Γλυκολυτική δράση ενζύμων**

Το γλυκογόνο που υπάρχει στους μύες των ζώντων ιχθύων μετατρέπεται σε γλυκόζη, η οποία με την παροχή οξυγόνου διασπάται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, από μία σειρά γλυκολυτικών ενζύμων.

Γλυκόλυση είναι η μεταβολική πορεία κατά την οποία η γλυκόζη καταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή νουκλεοτιδίων Τριφωσφορικής Αδενοσίνης (ATP), σύμφωνα με την αντίδραση 1.2.1 που ακολουθεί (eclass.uth.gr/γλυκόλυση):



Μεταθανάτια, εφόσον η κυκλοφορία του αίματος σταματά, τα κύτταρα δεν τροφοδοτούνται με οξυγόνο και ως εκ τούτου η γλυκόλυση προχωρά μέσω της αναερόβιας οδού, όπου το τελικό προϊόν είναι το γαλακτικό οξύ (αντίδραση 1.2.2) (eclass.uth.gr/γλυκόλυση). Καθώς το γαλακτικό οξύ συσσωρεύεται, το pH των μυών μειώνεται, μέχρι να εξαντληθεί πλήρως η παροχή γλυκογόνου.



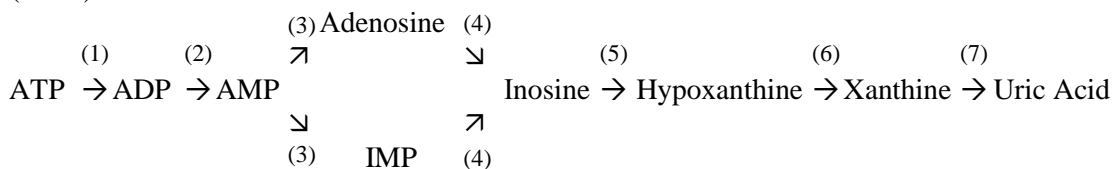
Γενικά, οι μύες των ιχθύων περιέχουν σχετικά χαμηλή ποσότητα γλυκογόνου σε σύγκριση με τους μύες των θηλαστικών και το τελικό μεταθανάτιο pH είναι κατά συνέπεια υψηλότερο. Αυτό κάνει το κρέας των ιχθύων πιο ευαίσθητο σε μικροβιακή επίθεση.

#### 1.2.2.2. Αυτολυτική δράση ενζύμων

Μετά την κατανάλωση των αποθεμάτων γλυκογόνου, η νεκρική ακαμψία μειώνεται σταδιακά συνοδευόμενη από αύξηση του pH, καταλήγοντας στη χαλάρωση των μυών. Αυτή η διαδικασία ακολουθείται από την αυτόλυση, που περιγράφεται ως εσωτερική διάσπαση πρωτεΐνης και λίπους μέσω μιας πολύπλοκης αλληλουχίας αντιδράσεων από ένζυμα.

Η Τριφωσφορική Αδενοσίνη (ATP) κατέχει το ρόλο της κύριας πηγής ενέργειας στη μεταβολική δραστηριότητα και την κυτταρική επικοινωνία, καθώς αποτελεί βασικό συστατικό των μυών των ιχθύων. Ο καταβολισμός της έχει τεκμηριωθεί εκτενώς και έχει ορισθεί ότι προχωράει μέσω της ακολουθίας που φαίνεται στην αντίδραση 1.2.3 (Ashie *et al.*, 1996).

(1.2.3)



Η προοδευτική υποβάθμιση της ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP), ινοσίνη (INO) και υποξανθίνη (HX) προχωρά σχετικά γρήγορα ως αποτέλεσμα της δράσης των ενδογενών ένζυμων. Αντιθέτως, η οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά στο ουρικό οξύ είναι πολύ πιο αργή και είναι το αποτέλεσμα της δραστηριότητας των μικροβιακών ένζυμων.

### 1.2.2.3. Επιπτώσεις της ενζυμικής δράσης



Ο ρυθμιστικός έλεγχος των ενζυμικών αντιδράσεων χάνεται όταν οι ιχθύες πεθάνουν. Τότε αρχίζει η αλλοίωση της σάρκας τους ως αναπόφευκτη συνέπεια των βιοχημικών αλλαγών του μεταβολισμού. Τα πεπτικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τις βιοχημικές αλλαγές εξακολουθούν να είναι ενεργά και αντί να δρουν στην τροφή εσωτερικά του εντέρου, αρχίζουν να αφομοιώνουν συστατικά του ιστού όπως λιπίδια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Πέρα από αυτά, τα εγγενή βακτήρια που εμφανίζονται στους ιχθύες πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και εκκρίνουν επίσης μεγάλο αριθμό ενζύμων, που προκαλούν ταχεία διάσπαση των ιστών τους, με αποτέλεσμα να καθίστανται μη βρώσιμοι για τον άνθρωπο. Ακολούθως, περιγράφονται τα σημεία που επιδρούν τα ένζυμα και οι επιπτώσεις της δράσης στους ιστούς των ψαριών (Πίν. 1.2.4):

**Πίνακας 1.2.4.** Ένζυμα και σημεία επίδρασης αυτών στους ιστούς των ψαριών (προσαρμογή από Ghaly *et al.*, 2010, Source FAO 2005)

Ένζυμα	Υπόστρωμα	Δράσεις	Επιπτώσεις
Γλυκολυτικά ένζυμα	Γλυκογόνο	Παραγωγή γαλακτικού οξέος (μείωση pH)	Σύσφιξη και σκλήρυνση των μυών του ψαριού (νεκρική ακαμψία)
Αυτολυτικά ένζυμα	ATP, ADP, AMP, IMP	Σταδιακή παραγωγή και συσσώρευση υποξανθίνης	Πικρή γεύση σάρκας και απώλεια φρεσκάδας
Χυμοτρυψίνη, Τρυψίνη, Καρβοξυ-πεπτιδάσες	Πρωτεΐνες, Πεπτίδια	Πρωτεϊνική μετουσίωση	Ανάπτυξη μικροβίων και παραγωγή βιογενών αμινών, με ρήξη τοιχωμάτων κοιλίας και αποστράγγιση του νερού του αίματος
Καθεψίνες	Μυοϊνδιακές πρωτεΐνες	Εύκολη εισχώρηση στα μυϊκά νήματα και υδρόλυση μυοσίνης και ακτίνης, σε όξινο pH	Αδυναμία συγκράτησης νερού και μεγάλη ευθρυπτότητα ιστών
Καλπαΐνες	Μυοϊνδιακές πρωτεΐνες	Αποικοδόμηση Ζ-δίσκου, τιττίνης, νεβουλίνης, τροπομυοσίνης και τροπονίνης, παρουσία Ca <sup>++</sup>	Σημαντικότερος ο ρόλος στη μαλάκυνση των ιστών από τις καθεψίνες
Κολλαγενάσες	Κολλαγόνο	Υδρόλυση του μορίου του κολλαγόνου σε μικρά πεπτίδια	Μαλάκυνση και ρηγμάτωση των συνδετικών ιστών
TMAO Απομεθυλάση	TMAO	Προϊόντα διάσπασης υδροϋπεροξειδίων (φορμαλδεϋδη)	Ανάπτυξη off-flavors με αποτέλεσμα την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών π.χ. μυρωδιά «ψαρίλας»

### 1.2.3. Χημική αλλοίωση

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην τάγγιση των λιπιδίων και εμφανίζονται μέσω διαφορετικών οδών, είναι του σχηματισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων από ένζυμα (υδρολυτική τάγγιση), των ελεύθερων ριζών (οξειδωτική τάγγιση) και επίσης της μεσολάβησης του διοξυγόνου απλής κατάστασης (φωτοοξειδωση). Υπάρχουν δύο κύριες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα λιπίδια και έχουν ως αποτέλεσμα την υποβάθμισή τους: η οξείδωση και η υδρόλυση (ή αλλιώς λιπόλυση). Συχνά καλούνται και οι δύο με τον όρο “τάγγιση”, ωστόσο μερικοί επιστήμονες τείνουν να χρησιμοποιούν αυτόν τον όρο περισσότερο για την αντίδραση της οξείδωσης. Όπως υποδηλώνουν τα ονόματά τους, η οξείδωση απαιτεί την παρουσία οξυγόνου προκειμένου να προχωρήσει η αντίδραση και η υδρόλυση την παρουσία ύδατος (Talbot, 2011).

Η επίδραση των γλυκολυτικών και αυτολυτικών ενζύμων συζητήθηκε ήδη στο προηγούμενο κεφάλαιο. Όμως, υπάρχουν λιπολυτικά ένζυμα (λιπάσες) που ευθύνονται για την υδρόλυση των λιπιδίων και τη διάσπαση των γλυκεριδίων τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Εκτός της αλλοίωσης από τα λιπολυτικά ένζυμα, υπάρχουν μη ενζυμικοί τύποι αλλοίωσης που σχετίζονται με το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων, όπως η οξειδωτική τάγγιση και η μη ενζυμική αμαύρωση (Ashie *et al.*, 1996). Αυτοί οι τύποι κυρίως οφείλονται σε χημικές μεταβολές στους ιστούς των μυών, ως αποτέλεσμα ενός ευρέους φάσματος παραγόντων και ιδιαιτέρως της φύσης των λιπιδίων. Η οξείδωση μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες υποομάδες: Αυτοοξειδωση, φωτοοξειδωση και ενζυμικά καταλυόμενη οξείδωση (Talbot, 2011), με το φαινόμενο της αυτοοξειδωσης να κυριαρχεί στις περισσότερες αντιδράσεις οξείδωσης των λιπιδίων.

### **1.2.3.1. Οξειδωτική Τάγγιση (Αυτοοξειδωση)**

Η αυτοξειδωση, έχει από καιρό αναγνωριστεί ως η κύρια αιτία αλλοίωσης των ιχθύων και είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση, κατά την οποία το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των ουδέτερων λιπιδίων και των φωσφολιπιδίων, που εξελίσσεται σε τρεις διαδοχικές φάσεις μέσω του μηχανισμού των ελεύθερων ριζών.

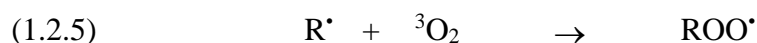
### α) Μηχανισμός της αυτοξειδωσης

Ο μηχανισμός των ελεύθερων ριζών της αυτοξειδωσης αν και είναι αρκετά πολύπλοκος, μπορεί να αναπαρασταθεί με τρία βασικά στάδια (Σχ. 1.2.3):

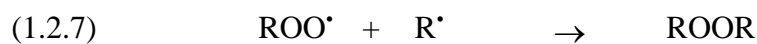
Έναρξη:



Πολλαπλασιασμός:



Τερματισμός:



**Σχήμα 1.2.3.** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της αυτοξειδωσης

Με την έναρξη της οξείδωσης αποσπάται το υδρογόνο από ένα ακόρεστο λιπίδιο RH και σχηματίζεται μια ελεύθερη ρίζα λιπιδίου R<sup>•</sup> (1.2.4). Στο πρώτο αυτό στάδιο η

οξειδωση είναι σχετικά μικρή και ο ρυθμός της αντίστοιχα αργός. Η σχηματισμένη ρίζα αντιδρά με το οξυγόνο και δημιουργεί μια ελεύθερη υπεροξειδική ρίζα λιπιδίου ROO<sup>•</sup> (1.2.5), η οποία αντιδρά στη συνέχεια με άλλο ακόρεστο λιπίδιο που δεν έχει οξειδωθεί, σχηματίζοντας υδροϋπεροξειδία ROOH και νέες ελεύθερες ρίζες (1.2.6). Μιας και η αντίδραση ξεκινήσει, τα σχηματισμένα ασταθή υδροϋπεροξειδία μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, που με τη σειρά τους επιταχύνουν το ρυθμό της αυτοοξειδωσης. Αυτή η επιτάχυνση είναι γνωστή και ως στάδιο του πολλαπλασιασμού. Όταν δύο ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζουν αδρανή τελικά προϊόντα ROOR και R-R (1.2.7), (1.2.8) από τα οποία σταματάει ο πολλαπλασιασμός και κατά συνέπεια η οξειδωση φθάνει στο στάδιο του τερματισμού.

### β) Φάσεις της αυτοοξειδωσης

Η διαδικασία της αυτοοξειδωσης συμβαίνει σε δύο διαδοχικές φάσεις. Η πρώτη χρονικά ορίζεται από το διάστημα ακριβώς πριν την εμφάνιση αλλαγών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ιχθύων και η δεύτερη φάση ορίζεται από το σημείο που αρχίζει η σαφής τάγγιση του λίπους. Η πρώτη φάση είναι γνωστή ως “περίοδος επαγωγής” ή κοινώς “περίοδος επώασης” (Induction Period), όπου η οξειδωση προχωρά με αργό ρυθμό, καθώς σχηματίζονται τα πρωτογενή προϊόντα οξειδωσης (υπεροξειδία). Στη δεύτερη φάση σχηματίζονται τα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης, με ρυθμό που αυξάνεται σημαντικά λόγω της καταλυτικής δράσης των παραγόμενων προϊόντων διάσπασης των υπεροξειδίων (Σχ. 1.2.4).



#### Σχήμα 1.2.4. Φάσεις οξειδωτικής τάγγισης λιπαρής ύλης

### γ) Παράγοντες που επηρεάζουν την αυτοοξείδωση

Αρκετοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση και λειτουργούν ενισχυτικά στα στάδια της αυτοοξείδωσης, από τους οποίους οι κυριότεροι είναι: το οξυγόνο, η θερμοκρασία, το pH, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα μέταλλα. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την οξείδωση των λιπιδίων και συνεπώς την αλλοίωση των αλιευμάτων είναι η ενεργότητα του ύδατος και το φως.

#### i. Οξυγόνο

Υπάρχουν αρκετά γνωστά αλλότροπα του οξυγόνου ανάλογα με την κατάσταση που βρίσκεται το μόριό του. Στη βασική του μορφή βρίσκεται ως διοξυγόνο τριπλής κατάστασης ( $^3\text{O}_2$ ), που είναι και το κυρίως υπεύθυνο για την αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών στην οξείδωση των λιπιδίων, ενώ σε υψηλότερης ενεργειακής στάθμης μορφή βρίσκεται σε δυο μετασταθείς καταστάσεις, γνωστές ως διοξυγόνο απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ ), που προωθεί την οξείδωση των λιπιδίων, παρουσία φωτοευαισθητοποιητών.

Η αντίδραση του  $^3\text{O}_2$  με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι απαγορευτική λόγω περιορισμών στα μοριακά τροχιακά του (Κανόνας του Hund), οι οποίοι μπορούν να ξεπεραστούν με την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) (Hsieh and Kinsella, 1989). Τέτοια είδη είναι οι ρίζες υδροξυλίων ( $\text{HO}^\bullet$ ), υπεροξυλίων ( $\text{ROO}^\bullet$ ), αλκοξυλίων ( $\text{RO}^\bullet$ ), υδροϋπεροξυλίων ( $\text{HOO}^\bullet$ ), όπως και το ανιόν υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ), που επιταχύνουν την οξειδωση των λιπιδίων (Choe and Min, 2005). Επομένως για να ξεπεραστούν οι ηλεκτρονικοί περιορισμοί spin, απαιτείται πρώτα ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών, ώστε να γίνει θερμοδυναμικά ευνοϊκή η αντίδραση μεταξύ του οξυγόνου και των λιπαρών οξέων.

## ii. Θερμοκρασία και pH

Η θερμοκρασία επηρεάζει τη σταθερά ταχύτητας  $k$  των περισσότερων βιοχημικών αντιδράσεων. Αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της περιόδου επαγωγής, ενώ ο ρυθμός της οξειδωσης αυξάνεται εκθετικά. Επιδρά στο ρυθμό αποχρωματισμού των ιχθύων επιδρώντας στην ευαισθησία των μυοσφαιρινών κατά την αυτοοξειδωση (Livingston and Brown, 1981) και επιπλέον επηρεάζει έντονα τις εναλλαγές του pH. Από την άλλη, το pH επιδρά στους μικροοργανισμούς και στην ενζυμική τους ενεργότητα. Μεταθανάτια, παρατηρείται μείωση των τιμών του συνήθως από 5.5 έως 6.5 εξαιτίας του παραγόμενου γαλακτικού οξέος από τη γλυκογονόλυση που λαμβάνει χώρα κάτω από ανοξικές συνθήκες.

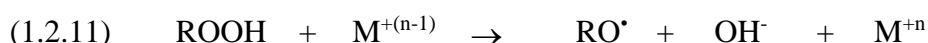
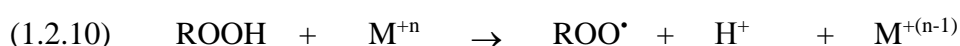
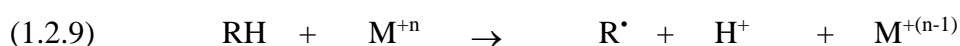
## iii. Ελεύθερα λιπαρά οξέα

Η παρουσία των ελεύθερων λιπαρών οξέων ακόμα και σε συγκέντρωση 0.5% επιταχύνει την αυτοοξειδωση δια μέσου ενός καταλυτικού μηχανισμού, όπου η

καρβοξυλική τους ομάδα καταλύει τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, υποβοηθώντας την διάσπαση υπεροξειδίων (Μανούρας, 2014). Ουσιαστικά η αυτοοξειδωση των λιπαρών οξέων λαμβάνει χώρα στο φωσφολιποειδικό κλάσμα του ψαριού επειδή εκεί περιέχεται η σημαντικότερη ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Έχει αποδειχτεί ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη οξειδωτική αποικοδόμηση είναι εκείνα που περιέχουν στο μόριό τους περισσότερους από τέσσερις δεσμούς (Μορφής, 2014).

#### iv. Μέταλλα

Τα σημαντικότερα μεταλλικά ιόντα που εμπλέκονται και ενεργούν σαν καταλύτες στην οξείδωση των λιπιδίων είναι τα  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ . Στις αντιδράσεις, αυτά απλώς αλλάζουν σθένος και συνεχίζουν την καταλυτική τους δράση σύμφωνα με τις αντιδράσεις που ακολουθούν (Σχ.1.2.5):



**Σχήμα 1.2.5** Δρόμοι καταλυτικής δράσης των μεταλλικών ιόντων στην οξείδωση των λιπιδίων

Όπως φαίνεται στο ανωτέρω σχήμα τα μεταλλικά ιόντα εμπλέκονται στην εκκίνηση της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών με την απευθείας αντίδραση στα λιπίδια. Παράγουν δραστικά είδη οξυγόνου που επιταχύνουν την αντίδραση διάσπασης των αλκυλοϋδροϋπεροξειδίων σε ρίζες αλκοξυλίων και υπεραλκοξυλίων. Οι

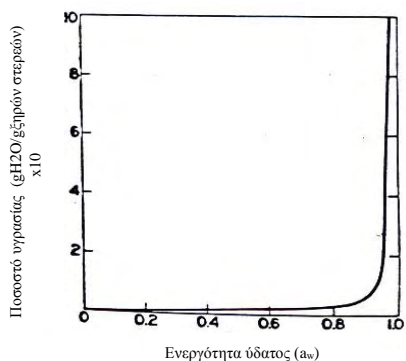
Khayat and Schwall, (1983) μελετώντας την επίδραση των ιχνοστοιχείων και της αιμίνης σε ομογενοποιημένο πολτό σάρκας γάδου Αλάσκας με έλαιο σκουμπριού, απέδειξαν την επιτάχυνση της διαδικασίας από αυτά τα ιόντα, αλλά και τη φθίνουσα σειρά της σχετικής δραστηριότητάς τους, στην απορρόφηση του οξυγόνου ( $Fe^{2+} > \text{αιμίνη} > Cu^{2+} > Fe^{3+}$ ).

## v. Ενεργότητα ύδατος

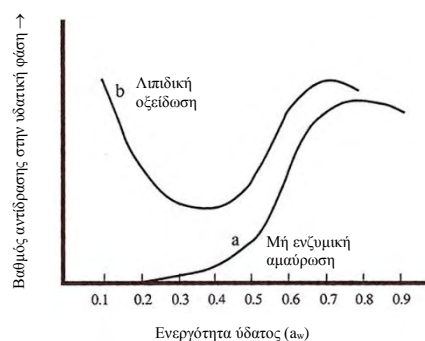
Αντιπροσωπεύει το μη δεσμευμένο νερό στα μόρια του τροφίμου και ορίζεται ως το κλάσμα της μερικής τάσης ατμών του νερού στο τρόφιμο προς τη μερική τάση ατμών του νερού, στην ίδια θερμοκρασία.

$$a_w = p/p_o$$

Όσο αυξάνεται η ενεργότητά του, περισσότερο νερό είναι διαθέσιμο ώστε να διευκολύνει τις αντιδράσεις τερματισμού, που περιλαμβάνουν τον ανασυνδυασμό των ελευθέρων ριζών, προς το σχηματισμό νέων προϊόντων. Σε χαμηλές ενεργότητες, το νερό είναι ανεπαρκές για να πραγματοποιήσει τις παραπάνω αντιδράσεις. Έτσι ο βαθμός λιπιδικής οξείδωσης είναι αρκετά υψηλός. Στο σχήμα 1.2.6, το οποίο δείχνει τη σχέση μεταξύ της υγρασίας και του βαθμού λιπιδικής οξείδωσης, φαίνεται ότι η πλειονότητα των τροφίμων από ιστούς με ποσοστά υγρασίας 60-95% παρουσιάζουν ενεργότητα ύδατος πολύ κοντά στο 1.0.



**Σχήμα 1.2.6.** Ισοθερμική υγρασίας για τρόφιμο



**Σχήμα 1.2.7.** Σχετικός βαθμός αντίδρασης σε σχέση με την ενεργότητα ύδατος



Στο σχήμα 1.2.7 (προσαρμογή από Σταματόπουλος, 2015) φαίνεται ότι σε πολύ χαμηλές ενεργότητες ύδατος ο βαθμός λιπιδικής οξείδωσης (b) είναι αρκετά υψηλός και ελαττώνεται στις τιμές  $a_w$  0.2-0.4. Για τις τιμές  $a_w$  0.4-0.7 η ταχύτητα οξείδωσης των ακόρεστων λιπιδίων αυξάνει λόγω της αυξημένης κινητικότητας των καταλυτών στην υδατική φάση. Σε μεγαλύτερες τιμές από  $a_w$  0.7 ο βαθμός της λιπιδικής οξείδωσης ελαττώνεται πιθανόν λόγω αραίωσης των καταλυτών.

#### **vi. Άλλοι παράγοντες**

Επίσης, η φυσική δομή της σάρκας αλλά και η σύνθεση του λίπους, με την κατανομή των λιπιδίων (σε συνεχή φάση ή διασκορπισμένα) παίζουν σημαντικό ρόλο στο ρυθμό της οξείδωσης. Το κλάσμα των επιφανειακών λιπιδίων που είναι εκτεθειμένο στον ατμοσφαιρικό αέρα είναι πιο ευαίσθητο στην οξείδωση. Η δράση ορισμένων χρωστικών ουσιών όπως η αιμοσφαιρίνη και η πορφυρίνη της αίμης, σε συνδιασμό με το φως επιταχύνουν την οξείδωση της λιπαρής ύλης (φωτοοξείδωση), όπου το οξυγόνο αντιδρά αμέσως με τα λιπίδια δημιουργώντας υπεροξειδία, χωρίς να προηγηθεί απόσπαση υδρογόνου.

#### **1.2.3.2. Φωτοευαίσθητοποιημένη οξείδωση (Φωτοοξείδωση)**

Ενώ στο μηχανισμό της αυτοοξείδωσης απαιτείται μια αρχική ενέργεια ενεργοποίησης για την απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου, που ενισχύεται από τις υψηλές θερμοκρασίες και την παρουσία διπλών δεσμών, ο αντίστοιχος μηχανισμός της

φωτοξείδωσης ενεργοποιείται από το εξαιρετικά αντιδραστικό διοξυγόνο απλής κατάστασης, το οποίο σχηματίζεται από διέγερση του διοξυγόνου τριπλής κατάστασης, υπό την έκθεση στο φως, παρουσία φωτοευαισθητοποιητών (Choe and Min, 2005; Min and Boff, 2002) για να παραχθούν οι ελευθères ρίζες που είναι απαραίτητες στην έναρξη της οξείδωσης. Ως φωτοευαισθητοποιητές, θεωρούνται οι χημικές ουσίες που όταν απορροφούν φωτεινή ακτινοβολία μεταπίπτουν από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση, που μπορεί να ενεργοποιήσει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ή το μοριακό οξυγόνο. Ορισμένες χρωστικές των τροφίμων όπως είναι οι πορφυρίνες της αίμης και της χλωροφύλλης, η μυοσφαιρίνη, καθώς και άλλες ενώσεις όπως η ριβοφλαβίνη μπορούν να δράσουν ως φωτοευαισθητοποιητές με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς, από τους οποίους σχηματίζονται μονοϋδροϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσία οξυγόνου, ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας (Frankel 1998). Στον πρώτο μηχανισμό, η ριβοφλαβίνη μπορεί να αντιδράσει με λιπαρά οξέα, σχηματίζοντας με μεταφορά ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου μια σύμπλοκη ένωση, που στη συνέχεια αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας αντίστοιχα μονοϋδροϋπεροξειδία. Στο δεύτερο μηχανισμό, η χλωροφύλλη αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο, οπότε σχηματίζεται διοξυγόνο απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ ). Το οξυγόνο αυτό μπορεί να προσβάλλει απ' ευθείας τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και μάλιστα με μεγάλη ταχύτητα σχηματίζοντας τα αντίστοιχα μονοϋδροϋπεροξειδία (Chan, 1987).

### **1.2.3.3. Μέθοδοι εκτίμησης της λιπιδικής οξείδωσης**

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που εξελίσσεται σταδιακά μέσω διαφόρων μηχανισμών, που οδηγούν στην παραγωγή πολλών ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων. Η εκτίμηση της εξέλιξης της λοιπόν προϋποθέτει τη

μέτρηση αξιόπιστων ουσιών-δεικτών που αντιπροσωπεύουν τα παραγόμενα προϊόντα, τα οποία διαφέρουν ανάλογα με τον χρόνο, την έκταση και το μηχανισμό που ενεργοποιείται. Πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μέτρηση αυτών των ουσιών-δεικτών καθώς δεν υπάρχει ενιαία και τυποποιημένη μέθοδος ανίχνευσης όλων των οξειδωτικών μεταβολών για όλα τα συστήματα τροφίμων. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για κάθε συγκεκριμένη εφαρμογή, ενώ συχνότερα κρίνεται απαραίτητη η συνδυαστική χρήση αυτών των μεθόδων. Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του βαθμού της αλλοίωσης στην οποία έχει προχωρήσει η κατάσταση των λιπιδίων χωρίζονται σε: α) μεθόδους προσδιορισμού της οξειδωτικής κατάστασης των λιπιδίων και β) μεθόδους εκτίμησης της ενδεχόμενης οξειδωτικής σταθερότητας των λιπιδίων.

Οι μέθοδοι της πρώτης κατηγορίας απεικονίζουν στην ουσία την εικόνα της οξειδωτικής κατάστασης των λιπιδίων, για τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της μέτρησης και μπορούν να διαχωριστούν με βάση τις κύριες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα. Από τη μία είναι η υδρόλυση, που είναι ενδεικτική της αυξημένης ευαισθησίας των λιπιδίων και από την άλλη είναι η οξείδωση, ως αποτέλεσμα της περαιτέρω υποβάθμισης, λόγω οξειδωτικής αποικοδόμησης. Οι διαθέσιμες μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν επίσης με βάση αυτού που μετράνε: την απορρόφηση οξυγόνου, την απώλεια των αρχικών υποστρωμάτων, τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών και τον σχηματισμό πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Οι πλέον κοινές μέθοδοι είναι του αριθμού υπεροξειδίων (AY), των συζευγμένων διενίων, των δραστικών στο θειοβαρβιτουρικό οξύ ουσιών (TBARS) και της εξανάλης. Από τις μεθόδους αυτές, οι δύο πρώτες χρησιμοποιούν ως ουσίες-δείκτες τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων όπως τα υπεροξειδία και συζευγμένα διένια αντίστοιχα, ενώ οι άλλες δύο

χρησιμοποιούν ως ουσίες-δείκτες τα δευτερογενή προϊόντα όπως είναι η μαλονική διαλδεϋδη και η εξανάλη, αντίστοιχα. Μία μεγάλη ποικιλία μεθοδολογιών έχει αναπτυχθεί και εφαρμοστεί μέχρι τώρα, τόσο για τον προσδιορισμό των πρωτογενών προϊόντων όσο και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Οι σύγχρονες μέθοδοι περιλαμβάνουν νεότερες τεχνικές που εφαρμόζουν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), φθορισμομετρία, φασματοφωτομετρία μάζας, χημειοφωταύγεια κ.λπ. οι οποίες παρέχουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα και θα πρέπει να τους δοθεί προσοχή, στον τομέα της ανάλυσης των λιπιδίων (Gray, 1978; Ladikos and Lougouois, 1990; Farhoosh, 2007; Barriuso *et al.*, 2013). Υπάρχουν περιορισμοί, όσον αφορά το υψηλό κόστος καθώς και ορισμένα πρακτικά ζητήματα, που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή τους.

Σχετικά με τις μεθόδους εκτίμησης της σταθερότητας των λιπιδίων, οι οποίες ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία, αυτές παρέχουν μέτρηση του χρονικού διαστήματος που απαιτείται μέχρι να επιτευχθεί ένα ορισμένο οξειδωτικό επίπεδο, μέσω τεχνητής προώθησης της οξείδωσης. Ενώ σε συνθήκες περιβάλλοντος, η οξείδωση λαμβάνει χώρα με αργό ρυθμό, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που χρησιμοποιούν υψηλές θερμοκρασίες και παροχή αέρα, ώστε να το επίπεδο αυτό να επιτευχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα. Σε ό,τι αφορά τον όρο σταθερότητα, χαρακτηρίζεται η αντίσταση που παρουσιάζουν τα λιπίδια στην οξείδωση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή/και συντήρησης των τροφίμων που περιέχονται αυτά (Guillén, Cabo, 2002). Μια φθηνή, εύκολη στη χρήση και αναπαραγώγιμη μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά για την εκτίμηση της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπιδίων είναι η Rancimat. Η μέθοδος βασίζεται στις μεταβολές της αγωγιμότητας του απιονισμένου ύδατος, μετά τη συλλογή πτητικών οργανικών ενώσεων που παράγονται στα λιπίδια από την επιταχυνόμενη διαδικασία

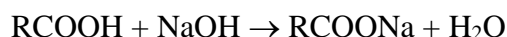
οξειδωσης (Farhoosh, 2007; Farhoosh and Moosavi, 2007). Το μέτρο της σταθερότητας ή του χρόνου ζωής των λιπιδίων ορίζεται από την περίοδο επαγωγής (IP), ως ο χρόνος που απαιτείται μέχρι το τελικό σημείο της οξειδωσης, κατά οποίο ανιχνεύεται η ξαφνική αύξηση της αγωγιμότητας (Mendez *et al.*, 1996).

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται μόνο σε εκείνες τις μεθόδους της πρώτης κύριας κατηγορίας, που καθορίζουν την πραγματική και τρέχουσα κατάσταση των λιπιδίων, μέσω της υδρολυτικής και οξειδωτικής τάγγισης, οι οποίες είναι και οι πιο κοινές από τις διαθέσιμες που εφαρμόζονται συνηθέστερα, για την εκτίμηση της οξειδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα. Αυτές είναι ο βαθμός υδρόλυσης μέσω μέτρησης του περιεχόμενου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και ο προσδιορισμός κυρίως των πρωτογενών προϊόντων μέσω του αριθμού υπεροξειδίων (PV).

#### **α) Μέθοδος προσδιορισμού της οξύτητας (Free Fatty Acids)**

Ένα μέτρο της ποιότητας των λιπιδίων είναι η οξύτητα, η οποία ορίζεται με το περιεχόμενο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία απελευθερώνονται από τα γλυκερίδια τους λόγω μικροβιακής δραστηριότητας. Η οξύτητα είναι δείκτης του βαθμού της υδρολυτικής και όχι της οξειδωτικής τάγγισης, αφού προκαλείται από λιπολυτικά ένζυμα (λιπάσες), με τη δράση του νερού και της θερμοκρασίας. Επειδή τα καρβοξυλικά οξέα (ελεύθερα λιπαρά) αντιδρούν με βάσεις προς σχηματισμό αλάτων, η ποσότητά τους σε μια λιπαρή ύλη μπορεί να προσδιοριστεί, μέσω της πλήρους εξουδετέρωσής τους από ένα ισχυρά αλκαλικό διάλυμα (π.χ. NaOH) γνωστής συγκέντρωσης, σύμφωνα με την αντίδραση:

(1.2.12)



Συνήθως στα έλαια και λίπη ο προσδιορισμός όλων των ελεύθερων λιπαρών οξέων ανάγεται σε ελαιϊκό οξύ  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  (απλώς  $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$  με μοριακό βάρος 282), θεωρώντας ότι είναι το μόνο λιπαρό οξύ στη συγκεκριμένη λιπαρή ύλη. Επίσης, συχνά αναφέρονται ο αριθμός οξύτητας ή ο βαθμός οξύτητας και για να μη δημιουργείται σύγχυση αυτών των όρων δίνονται οι ορισμοί τους:

- i) Αριθμός οξύτητας είναι τα mg KOH που απαιτούνται για την πλήρη εξουδετέρωση των ελευθέρων λιπαρών οξέων σε 1g λιπαρής ύλης.
- ii) Βαθμός οξύτητας είναι ο αριθμός των ml διαλύματος 1N NaOH ή KOH (στο εργαστήριο χρησιμοποιείται 0.1N), που απαιτείται για την πλήρη εξουδετέρωση των ελευθέρων λιπαρών οξέων σε 100g λιπαρής ύλης.

Η οξύτητα που αφορά στα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ως δείκτης για την αλλοίωση του λίπους, είναι λιγότερο σημαντικός σε σχέση με τον προσδιορισμό του Αριθμού Υπεροξειδίων, η οποία μέθοδος αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω.

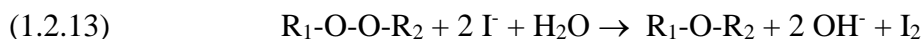
### **β) Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτογενών προϊόντων οξειδωσης**

Από όσα έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα τα υπεροξειδία και κυρίως τα υδροϋπεροξειδία είναι τα πρωτογενή προϊόντα της περίπλοκης αλυσίδας αντιδράσεων στην οξείδωση των λιπιδίων. Οι υπεροξειδικές ενώσεις σχηματίζονται κατά τα πρώτα

στάδια της οξείδωσης και παρά το γεγονός ότι είναι ενδιάμεσα προϊόντα της, είναι σχετικά σταθερές (ανάλογα με τη δομή των λιπιδίων), οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την αξιολόγηση της οξειδωτικής κατάστασης των λιπιδίων, δεδομένου ότι στο δείγμα δεν αναπτύσσεται πολύ προηγμένη αυτοοξείδωση.

### **i) Αριθμός Υπεροξειδίων (Peroxide Value)**

Η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων εκφράζεται με τον Αριθμό Υπεροξειδίων, ο οποίος δίνει το μέτρο του υπεροξειδικού οξυγόνου που σχηματίστηκε στους διπλούς δεσμούς των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνότερα για τη μέτρηση του ΑΥ είναι η Ιωδιομετρική, κατά την οποία τα υπεροξειδία αντιδρούν με τα ανιόντα ιωδίου, ενώ το στοιχειακό ιώδιο που απελευθερώνεται προσδιορίζεται ογκομετρικά με θειοθειικό νάτριο, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (1.2.13) και (1.2.14). Ο ΑΥ εκφράζεται σε χιλιοστοϊσοδύναμα (meq) ενεργού οξυγόνου ανά Kg λιπαρής ύλης και σύμφωνα με τη μέθοδο, θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την ποσότητα ενεργού οξυγόνου (σε meq), που περιέχεται σε 1Kg λιπιδίων και η οποία μπορεί να οξειδώσει το ιωδιούχο κάλιο. Αν και η διαδικασία απαιτεί προηγούμενη εκχύλιση λιπιδίων, παρέχονται γρήγορα, εύκολα και κατανοητά αποτελέσματα. Η μέθοδος έχει τυποποιηθεί από IUPAC 2.501, AOCS Cd 8b-90 (προγενέστερη Cd8-53) και από άλλους οργανισμούς, ως η επίσημη μέθοδος ανάλυσης των λιπών.



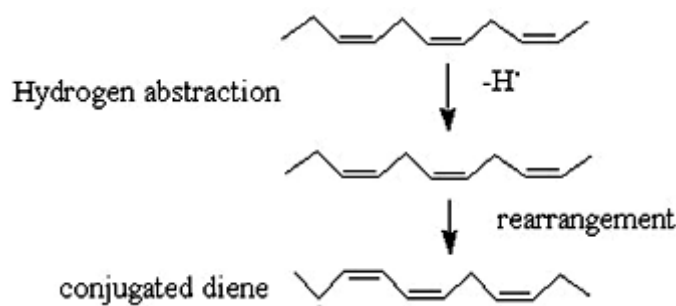
όπου με  $R_1-O-O-R_2$  συμβολίζεται μια υπεροξειδική ένωση, στην οποία το  $R_2$  εκτός από οργανική ρίζα μπορεί να είναι και H, δηλαδή η ένωση να είναι ένα υδροϋπεροξειδίο.

Επειδή τα υπεροξειδία αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα και κατά συνέπεια η μέτρησή τους εκφράζει τη διαφορά ανάμεσα στον σχηματισμό και τη διάσπαση αυτών, θα πρέπει να συνδυάζεται με μια μέθοδο μέτρησης των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπου τα υδροϋπεροξειδία είναι ασταθή και διασπώνται σε δευτερογενή προϊόντα ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα οξείδωσης (Velasco *et al.*, 2010). Κατάλληλη μέθοδος προσδιορισμού των δευτερογενών προϊόντων (π.χ. αλδεΐδες, κετόνες) είναι του 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος, η οποία αναφέρεται παρακάτω.

## **ii) Συζευγμένα διένια (Conjugated Dienes)**

Τα συζευγμένα διένια είναι τα πρώτα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων, που εμφανίζονται με την αναδιάταξη και μετανάστευση των διπλών δεσμών σε γειτονικές θέσεις, λόγω μετατόπισης των ηλεκτρονίων, κατά το σχηματισμό των υδροϋπροξειδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η μέτρηση των συζευγμένων διενίων αποτελεί ένα απλό και γρήγορο τρόπο προσδιορισμού των σχηματιζόμενων πρωτογενών προϊόντων, που απαιτεί μικρότερο μέγεθος δείγματος. Αυτές οι ενώσεις απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα (UV) σε μήκος κύματος 235nm, οπότε είναι ανιχνεύσιμες με φασματομετρικές τεχνικές. Εξαιτίας της απλότητάς της, αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα, ωστόσο, παρουσιάζει μειονεκτήματα αφού η απορρόφηση μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με το διαλύτη, με τα συζευγμένα διένια που μπορεί να συνεχίζουν να δημιουργούνται ενώ η διαδικασία ανίχνευσης είναι σε εξέλιξη ή να χάνονται αποδομημένα σε δευτερογενή προϊόντα, ή ακόμη και με την παρουσία άλλων ουσιών που προκαλούν παρεμβολές στις μετρήσεις. Τα συζευγμένα διένια μπορούν να θεωρηθούν μόνο γενικοί δείκτες της οξείδωσης και στις περισσότερες περιπτώσεις θα πρέπει να συνδυάζονται με αναλύσεις και άλλων δεικτών οξείδωσης των λιπιδίων.





**Σχήμα 1.2.8.** Σχηματική αναπαράσταση της αναδιάταξης των συζευγμένων διενίων

### γ) Μέθοδοι προσδιορισμού δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης

Τα υδροϋπεροξειδία συνήθως υφίστανται περαιτέρω οξείδωση όταν εκτίθενται σε εκτεταμένες συνθήκες, για να δώσουν δευτερογενή προϊόντα, των οποίων η μεγάλη ποικιλία περιλαμβάνει αλδεΐδες, κετόνες, εποξειδία, υδροξυ-ενώσεις, ολιγομερή και πολυμερή. Μεταξύ αυτών, μπορούν να βρεθούν τόσο πτητικές όσο και μη πτητικές ενώσεις, όπως η εξανάλη (Hexanal) και η μαλονική διαλδεΐδη (Malondialdehyde), αντίστοιχα, ως κύριοι εκπρόσωποι.

#### i) Μέθοδος του 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA)

Η μαλονική διαλδεΐδη (MDA) είναι μία από τις κυριότερες αλδεΐδες που παράγονται κατά την δευτερογενή οξείδωση των λιπιδίων και συχνά χρησιμοποιείται ως δείκτης της οξείδωσης. Η συνηθέστερη μέθοδος προσδιορισμού των αλδεϊδικών προϊόντων βασίζεται στην ικανότητα της MDA να αντιδρά με το TBA, σχηματίζοντας κόκκινο φθορίζον σύμπλοκο (σχ. 1.2.9), που μπορεί εύκολα να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 532nm. Δεν απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό και θεωρείται

εύκολη στην εκτέλεση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές απορρόφησης του χρώματος στο συγκεκριμένο μήκος κύματος ή σε mg μαλονικής διαλδεύδης ανά Kg (ppm). Το πρόβλημα της μεθόδου είναι ότι εκτός από την MDA, το TBA αντιδρά και με άλλες ενώσεις όπως είναι υδατάνθρακες, αμινοξέα και νουκλεϊνικά οξέα που δεν αποτελούν προϊόντα οξείδωσης, δίνοντας έτσι εσφαλμένα υψηλότερες μετρήσεις και αποτελέσματα που ποικίλλουν (Salih *et al.*, 1987; Guillen-Sans and Guzman-Chozas, 1998). Εξαιτίας αυτού του προβλήματος, οι περισσότεροι ερευνητές που χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο αναφέρουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε TBARS (TBA Reactive Substances), δηλαδή σε ουσίες που αντιδρούν με το TBA και αυτό επειδή δεν γνωρίζουν επακριβώς ποιες είναι οι ουσίες που ουσιαστικά προσδιορίζονται.

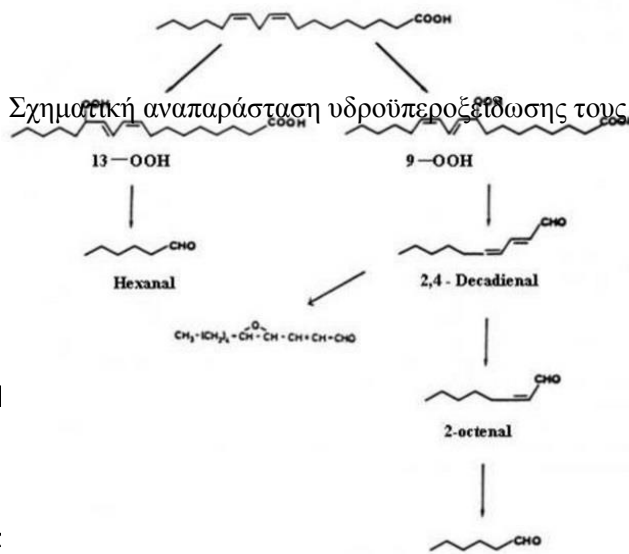
**Σχήμα 1.2.9.** Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης της MDA με το TBA

### **ii) Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης της εξανάλης**

Η ανάλυση των πτητικών προϊόντων παρέχει μια εικόνα της οξείδωσης των λιπιδίων και ορισμένα πτητικά, όπως η εξανάλη μπορούν να είναι δείκτες των διεργασιών της. Η εξανάλη είναι παραπροϊόν από την υδροϋπεροξείδωση του λινολεϊκού οξέος (σχ. 1.2.10) και εμφανίζεται σε πολλές μελέτες ως ένωση που υποδεικνύει διαδικασίες οξείδωσης των καταναλωτικών τροφίμων που περιέχουν ω-6 λιπαρά οξέα (Shahidi *et al.*, 1987). Η μέθοδος που βασίζεται σε αέρια χρωματογραφία είναι σχετικά χρονοβόρα και

απαιτεί υψηλού κόστους εξοπλισμό, αλλά μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες απαιτείται επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων άλλων σχετικών μεθόδων.

Σχήμα 1.2.10. Σχηματική αναπαράσταση υδροϋπεροξείδωσης του λινολεϊκού οξέος



### 1.3. Οργανολη

Η αλλοίωση οργανοληπτικών παραμέτρων και οσμοχημικών και μικροβιολογικών διαδικασιών, που επιφέρουν μεταβολές στην εμφάνιση, την οσμή και την υφή των αλιευμάτων. Οι αλλαγές είναι χαρακτηριστικές για κάθε είδος και μπορούν να εκτιμηθούν με τη μέτρηση οργανοληπτικών παραμέτρων, χρησιμοποιώντας τις ανθρώπινες αισθήσεις όπως η όραση, η όσφρηση και η αφή. Ο οργανοληπτικός έλεγχος

στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί μαζί με τον φυσικοχημικό και μικροβιολογικό έλεγχο τους βασικούς τομείς του ποιοτικού ελέγχου.

### **1.3.1. Μέθοδοι οργανοληπτικής μελέτης**

Η εκτίμηση της μεταβολής των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των αλιευμάτων λόγω της αλλοίωσής τους διακρίνεται στις:

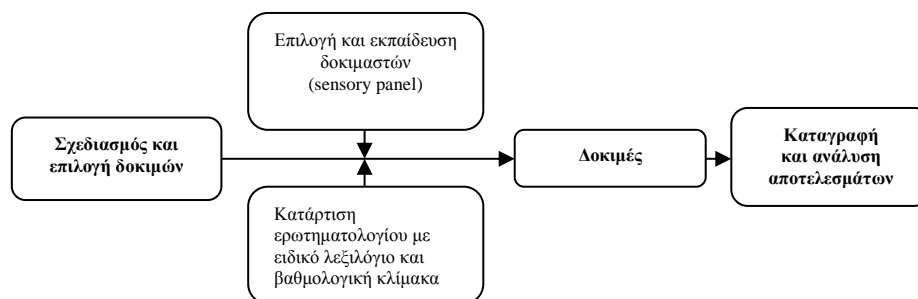
**α)** αναλυτικές μεθόδους, όπως είναι οι δοκιμές διαφοράς, όπου γίνεται η διάκριση μεταξύ δυο δειγμάτων και οι περιγραφικές δοκιμές, όπου γίνεται η ταυτοποίηση και η μέτρηση της έντασης των χαρακτηριστικών ενός δείγματος.

**β)** συναισθηματικές μεθόδους, όπως είναι οι δοκιμές κατάταξης με τη μέτρηση παραμέτρων εκτίμησης του μεγέθους των διαφορών και οι δοκιμές βαθμολόγησης, με τη χρήση αριθμών που δείχνουν την ένταση των ποιοτικών χαρακτηριστικών.

#### **1.3.1.1. Επιλογή και σχεδίαση μεθόδου**

Έμπειροι και εκπαιδευμένοι δοκιμαστές της ομάδας αξιολόγησης (sensory panel), αφού καθορίσουν τους επιμέρους στόχους των δοκιμών, καταρτίζουν ειδικό λεξιλόγιο βαθμολόγησης της αντιλαμβανόμενης έντασης των χαρακτηριστικών των δειγμάτων που θα εξεταστούν. Κατά τις δοκιμές τηρούνται κανόνες και προδιαγραφές που έχουν τεθεί,

ενώ ακολουθεί ανάλυση και παρουσίαση των αποτελεσμάτων με χρήση στατιστικών μοντέλων για την εξαγωγή συμπερασμάτων (Σχ. 1.2.11).



**Σχήμα 1.2.11.** Πλάνο οργάνωσης για την διεξαγωγή οργανοληπτικού ελέγχου

### 1.3.1.2. Αξία οργανοληπτικής μελέτης

Ο σκοπός του οργανοληπτικού ελέγχου στα αλιεύματα είναι η εκτίμηση της φρεσκότητας, ως το σημαντικότερο κριτήριο της ποιότητάς τους και μπορεί να πραγματοποιηθεί στα πλαίσια του ποιοτικού ελέγχου, κατά τη συντήρησής τους. Από την άλλη, οι χημικές/μικροβιολογικές μέθοδοι αξιολόγησής της φρεσκότητας, αλλά και του προσδιορισμού του εμπορικού χρόνου ζωής των αλιευμάτων είναι χρήσιμες για την έρευνα αλλά δεν είναι πρακτικές, καθώς είναι χρονοβόρες και απαιτείται ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός και εκπαιδευμένο προσωπικό.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του οργανοληπτικού ελέγχου είναι η δυνατότητα καθορισμού των χαρακτηριστικών που διασφαλίζουν την ποιότητα και την τυπικότητα των προϊόντων αλιείας και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των ενόργανων τεχνικών ανάλυσης, καθίσταται πιθανή η εύρεση μοντέλων βελτίωσης των πρακτικών χειρισμού τους, από την παραγωγή (αλίευση), μέχρι την αποθήκευση και κατανάλωσή τους.

#### 1.4. Σκοπός και στόχος της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η εξέλιξη της αλλοίωσης του λίπους σε επιλεγμένα είδη ψαριών, ενός λιπαρού όπως είναι η σαρδέλα του είδους *Sardina pilchardus* και κι ενός μη λιπαρού όπως είναι η γόπα του είδους *Boops boops*, σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης στους 2°C.

Στόχος της επίσης, είναι να αναπτυχθεί και να εφαρμοσθεί μία συστηματική πειραματική διαδικασία από επιμέρους αναλύσεις προσδιορισμού της οξειδωτικής κατάστασης του λίπους, μέσω των μεθόδων του βαθμού οξύτητας και του αριθμού υπεροξειδίων. Κι επειδή η εκτίμηση της αλλοίωσης προϋποθέτει την πλήρη εικόνα της κατάστασης των ιχθύων, η οποία είναι συνάρτηση μικροβιολογικών, φυσικοχημικών και αισθητηριακών παραμέτρων, μελετήθηκαν ταυτόχρονα το μοντέλο ανάπτυξης των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και το αποτύπωμα των μεταβολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Η πειραματική διαδικασία του προσδιορισμού της αλλοίωσης στηρίχθηκε στην ορθότητα, την ακρίβεια και την πιστότητα των μεθόδων, ξεκινώντας τόσο από τα κριτήρια επιλογής των δειγμάτων, όσο και το χειρισμό των γνωστών ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, σχετικών με την ευαισθησία τους (π.χ. όρια ανίχνευσης).

Τέλος, τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη, εφόσον υποστηριχθούν ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά (επαναληψιμότητα-αναπαραγωγικότητα), μπορούν να αξιοποιηθούν για μελλοντική χρήση στην πρόβλεψη του σχετικού ρυθμού αλλοίωσης και συνεπώς της διάρκειας ζωής των συγκεκριμένων ειδών ψαριών, κάτω από πραγματικές συνθήκες συντήρησης. Θα

μπορούσε να προταθεί, η παρούσα εργασία να αποτελέσει εγχειρίδιο για την περαιτέρω διερεύνηση της οξειδωτικής τάγγισης του λίπους των συγκεκριμένων ιχθύων ή και άλλων ειδών, ακόμη και σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησής τους.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Επιλογή των δειγμάτων**

Τα είδη των ιχθύων που επιλέχθηκαν βάσει κριτηρίων λιποπεριεκτικότητας είναι α) ένας λιπαρός και β) ένας μη λιπαρός ιχθύς.

α) Η *Sardina pilchardus* (Εικ. 2.1.1) κοινώς γνωστή ως σαρδέλα, είναι ευρέως διαδεδομένο είδος ψαριού στις περισσότερες θάλασσες και ένα από τα πλέον εμπορεύσιμα, με σημαντική διατροφική συμβολή. Το μέγιστο καταγεγραμμένο μήκος είναι 27.5cm, ενώ το μέσο μήκος είναι 20cm.

β) Η γόπα (*Boops boops*) (Εικ. 2.1.2) ανήκει στην οικογένεια των Σπαριδών και συναντάται στα νερά του Ατλαντικού, της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας, ενώ η γόπα είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα ψάρια των ελληνικών θαλασσών. Το μήκος της μπορεί να φθάσει ως και 35cm ενώ το βάρος της ως και 1Kg.



Εικόνα 2.1.1. Σαρδέλα Ευρώπης, το είδος *Sardina pilchardus*



Εικόνα 2.1.2. Γόπα Ευρώπης, το είδος *BoopsBoops*

Η συστηματική ταξινόμησή τους περιγράφεται στον πίνακα 2.1.1 ακολούθως:

Πίνακας 2.1.1. Συστηματική ταξινόμηση των υπό μελέτη ιχθύων

Κατηγορία	Λατινική Ονομασία		Ελληνική Ονομασία	
	Σαρδέλα	Γόπα	Σαρδέλα	Γόπα
Φύλο	<i>Chordata</i>		Χορδωτά	
Ομοταξία	<i>Actinopterygii</i>		Ακτινοπτερύγια	
Διαίρεση	<i>Teleostei</i>		Τελεόστεα	
Τάξη	<i>Clupeiformes</i>	<i>Perciformes</i>	Κλυπεόμορφα	Περκόμορφα
Οικογένεια	<i>Clupeidae</i>	<i>Sparidae</i>	Κλουποειδές	Σπαρίδες
Γένος	<i>Sardina</i>	<i>Boops</i>	Σαρδίνη	Βόωψ
Είδος	<i>Sardina pilchardus</i>	<i>Boops Boops</i>	Σαρδέλα	Γόπα



### **2.1.1. Προετοιμασία και κατανομή δειγμάτων**

Η προμήθεια των προς εξέταση ιχθύων έγινε από ιχθυοπωλείο της αγοράς του Βόλου (Ιούνιος 2018, τόπος αλίευσης μη διαθέσιμος), η μεταφορά στο εργαστήριο έγινε χωρίς πάγο, ενώ οι ιχθύες δεν υπέστησαν καμία περαιτέρω επεξεργασία. Από το κάθε είδος επιλέχθηκαν ισομεγέθη άτομα και μοιράστηκαν σε παρτίδες, για τις μετρήσεις των 4 ημερών (D<sub>0</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>4</sub> και D<sub>6</sub>). Η κάθε παρτίδα για τη σαρδέλα αποτελούταν από 7 άτομα των 30g περίπου το καθένα και για τη γόπα αποτελούταν από 5 άτομα των 50g περίπου.

Μετά τη διαλογή και το μοίρασμα σε παρτίδες τοποθετήθηκαν κατά είδος σε πλαστικά σακουλάκια χωρίς σφράγιση, μέσα σε ανοιχτά πλαστικά δοχεία τροφίμων. Αποθηκεύτηκαν σε θάλαμο συντήρησης ψυγείου, με σταθερή θερμοκρασία 2°C και κάθε ημέρα εξέτασης λαμβάνονταν ένα σακουλάκι (παρτίδα) από κάθε είδος ιχθύος. Από κάθε παρτίδα ληφθήκαν διπλά δείγματα σάρκας και δέρματος μαζί (χωρίς οστά και εντόσθια), δηλαδή περίπου 2x100g για τις χημικές αναλύσεις, 2x10g για τις μικροβιολογικές αναλύσεις και περίπου 30g για μελλοντική μοριακή ταυτοποίηση.

### **2.2. Μικροβιολογικές αναλύσεις**

Σε πρώτη φάση, τη μελέτη απασχολεί η εξέλιξη της μικροβιολογικής ποιότητας των ιχθύων, κατά τη διάρκεια της πειραματικής πορείας. Για το λόγο αυτό βασίζεται στην ανίχνευση και απομόνωση των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη μικροβιολογική αλλοίωση των δειγμάτων τους και στον προσδιορισμό του πληθυσμού διαφόρων ομάδων βακτηρίων (π.χ. *Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα*, *Θειοαναγωγικά βακτήρια*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*). Ο πληθυσμός των βακτηρίων αναπτύσσεται με τη χρήση

συγκεκριμένου θρεπτικού υποστρώματος, σε ορισμένη θερμοκρασία και χρόνο επώσεως. Βασική μέθοδος προσδιορισμού του πληθυσμού των ζώντων βακτηρίων αποτελεί η “Πρότυπη μέθοδος αριθμήσεως σε τρυβλία” (Standard Plate Count).

### **2.2.1. Εργαστηριακή υποδομή**

Για την πραγματοποίηση όλων των μικροβιολογικών εργασιών απαιτείται κατάλληλη εργαστηριακή υποδομή και μεθοδολογία. Το εργαστήριο που εκτελέστηκε η μελέτη διέθετε την κατάλληλη υποδομή και τον εξοπλισμό για τις εργασίες ρουτίνας και τις μικροβιολογικές δοκιμασίες (αποστείρωση υλικών, παρασκευή/συντήρηση θρεπτικών υλικών και αντιδραστηρίων, καλλιέργεια μικροοργανισμών κ.λπ). Κυρίως όμως, εφαρμόστηκαν οι κανόνες ασφαλείας και υγιεινής, καθώς και οι βασικές αρχές απολύμανσης και αποστείρωσης που διέπουν την ορθή εργαστηριακή λειτουργία και την τυπικότητα της πειραματικής διαδικασίας.

#### **2.2.1.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός**

Ο εξοπλισμός αυτός αναφέρεται επιγραμματικά:

- Απεσταγμένο νερό
- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri, πλαστικά μίας χρήσεως, διαμέτρου 85mm και βάθους 12mm
- Φιάλες αραιώσεως με βιδωτό πώμα, βαθμολογημένες για όγκο 99ml ή φιαλίδια, με βιδωτό πώμα, των 20-30ml
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα

- Πιπέτες δοσημετρικές με tips μιας χρήσεως για μικροβιολογική χρήση και χωρητικότητας από 0.1ml και 1.0 ml
- Υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C
- Ηλεκτρικός ομοιογενοποιητής τύπου Stomacher
- Αυτόκαυστο
- Ζυγός με ευαισθησία 0.1g
- Αποστειρωμένες πιπέτες
- Κλίβανος επώασης 30°C
- Λύχνοι Bunsen

#### 2.2.1.2. Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Αφού συγκεντρώθηκαν τα συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε νερό και αφού διορθώθηκε το pH τους, αποστειρώθηκαν (121°C, 15 lb/inch<sup>2</sup>, 15min) για να διατηρηθούν και να φυλαχτούν μέχρι την κατανάλωσή τους. Τα συστατικά των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και η επιλεκτικότητά τους στους διάφορους μικροοργανισμούς περιγράφονται παρακάτω:

##### i. Iron Agar (IA) 1000ml pH 7.4 (*Θειοαναγωγικά βακτήρια*)

- Bacteriological peptone 20g
- Yeast extract 3g
- Beef extract 3g
- Sodium thiosulfate 0.3g
- Sodium chloride 5g
- Ferric citrate 0.3g
- L-Cysteine 0.6g
- Bacteriological agar 14g

**ii. Cetrimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC) 500ml pH 7.2 (*Pseudomonas*)**

- Agar Base 24.2g (Gelatin peptone 16g/l, Casein hydrolysate 10g/l, Potassium sulphate 10g/l, Magnesium chloride 1.4g/l, Agar 15g/l)
- Glycerol 5ml
- Cetrimide 5mg
- Fusidin 5mg
- Cephaloridine 25mg

**iii. Tryptone Soy Agar (TSA) 1000ml (*Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα*)**

- Tryptone 15g
- Soy Peptone 5g
- Sodium Chloride 5g
- Bacteriological Agar 15g

**iv. Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) 1000ml (*Enterobacteriaceae*)**

- Dehydrated medium 41.5g (Enzymatic digest of animal tissues 7g/l, Yeast Extract 3g/l, Bile Salts 1.5g/l, Sodium chloride 5g/l, Neutral red 0.03g/l, Crystal violet 0.002g/l, Glucose 10g/l, Agar 12g/l)

**2.2.2. Προεργασία πειράματος**

Για την ασηπτική δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα εργαλεία, κοντά σε φλόγα από λύχνο Bunsen και για να είναι το δείγμα αντιπροσωπευτικό της μικροβιολογικής κατάστασης των υπό εξέταση ιχθύων πάρθηκαν όλα τα κατάλληλα μέτρα ασηψίας, ώστε κατά την συλλογή και την ανάλυσή του να αποκλειστεί η μικροβιολογική μόλυνση από εξωτερικές πηγές.

### 2.2.2.1. Ομογενοποίηση δείγματος

Κόπηκαν και ζυγίστηκαν ακριβώς 10g από τη σάρκα των ιχθύων σε αποστειρωμένη σακούλα και προστέθηκαν 90g αραιωτικού υγρού Maximum Recovery Diluent (MRD), ώστε αυτή να είναι η πρώτη αραιώση  $10^{-1}$ . Αφαιρέθηκε ο περισσότερος αέρας από τη σακούλα, για να μην “σκάσει” κατά την ομογενοποίηση και τοποθετήθηκε στον ομογενοποιητή ιστών τύπου Stomacher, για 2min.



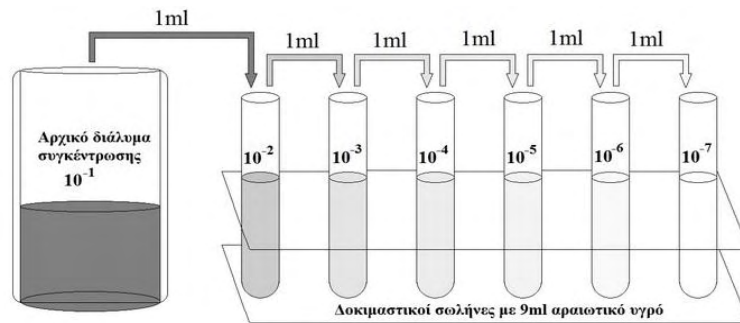
**Εικόνα 2.2.1.** Κοπή και ζύγιση σάρκας

**Εικόνα 2.2.2.** Ομογενοποιητής Stomacher

### 2.2.2.2. Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις

Κάτω από ασηπτικές συνθήκες ακολούθησαν και οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος συγκέντρωσης  $10^{-1}$  σε συγκέντρωση  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  και  $10^{-7}$ , με μεταφορά 1ml από το δοκιμαστικό σωλήνα με το διάλυμα της προηγούμενης συγκέντρωσης, στον αμέσως επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 ml αραιωτικού υγρού αντιστοίχως (Σχ. 2.1.1). Για τις αραιώσεις, οι οποίες

πραγματοποιήθηκαν μέσα σε χρόνο 10min από την ομογενοποίηση του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε dispenser με αποστειρωμένες πιπέτες.



Σχήμα2.1.1. Σχηματική απεικόνιση διαδοχικών αραιώσεων

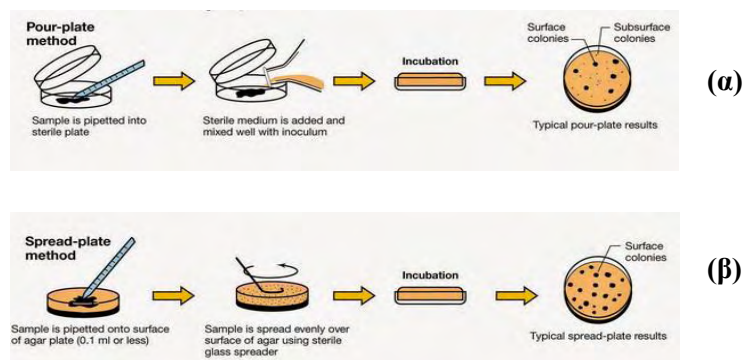
### 2.2.3. Πειραματική διαδικασία-Τεχνικές εμβολιασμού

Ανάλογα με την ημέρα δοκιμασίας, για κάθε δείγμα επιλέχθηκαν τα διαλύματα κυρίως τριών διαδοχικών αραιώσεων, για τον εμβολιασμό τους σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα. Ο εμβολιασμός αυτός εκτελέστηκε με δύο ποσοτικές τεχνικές:

**α)** την τεχνική της **ενσωμάτωσης** (pour plate technique) (Σχ. 2.1.2.α), η οποία εφαρμόστηκε στα θρεπτικά υλικά Iron Agar (IA) και Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA). Πρώτα ρευστοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό στα μικροκύματα και διατηρήθηκε σε υδατόλουτρο στους 45-50°C. Μετά τοποθετήθηκαν διπλές σειρές κενών αποστειρωμένων τρυβλίων δίπλα στη φλόγα, αφού προηγουμένως είχαν σημειωθεί κι αριθμηθεί στην κάτω πλευρά. Από τα διαλύματα της αρμόζουσας αραιώσης μεταφέρθηκε ποσότητα 1ml στο κέντρο του πυθμένα των τρυβλίων, με τη βοήθεια dispenser και των αντίστοιχων πιπετών. Αμέσως προστέθηκε ποσότητα θρεπτικού υλικού, τόση ώστε να

καλυφθεί ο πυθμένας των τρυβλίων (12-15ml) και στη συνέχεια ανακινήθηκαν προσεκτικά, με ήπιες περιστροφικές κινήσεις σε σχήμα 8 και προς τις δύο κατευθύνσεις. Αφού παρέμειναν για στερεοποίηση σε απόλυτα οριζόντια θέση και μετά από χρόνο 30min, προστέθηκε άλλη μια στρώση θρεπτικού υλικού. Τέλος, τα τρυβλία αναστράφηκαν και μεταφέρθηκαν σε κλιβάνους επώασης, αυτά με το ΙΑ στους 25°C για 48h κι αυτά με το VRBGA στους 37°C για 24h.

**β)** την τεχνική της **επιφανειακής επίστρωσης** (spread plate technique) (Σχ. 2.1.2.β), η οποία εφαρμόστηκε για τα θρεπτικά υλικά Tryptone Soy Agar (TSA) και Cetrimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC). Ρευστοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό στα μικροκύματα και διατηρήθηκε σε υδατόλουτρο στους 45-50°C. Τοποθετήθηκαν διπλές αριθμημένες σειρές κενών αποστειρωμένων τρυβλίων κοντά στη φλόγα, προστέθηκε ποσότητα θρεπτικού υλικού 12-15ml κι αυτά παρέμειναν σε απόλυτα οριζόντια θέση για να στερεοποιηθούν. Με dispenser και αντίστοιχες πιπιέτες, εγχύθηκαν 100μl από τα διαλύματα της αρμόζουσας αραιώσεως πάνω στο στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό και εξαπλώθηκε το δείγμα με διαμορφωμένη γυάλινη ράβδο ειδικά γι' αυτή την περίπτωση σε όλη την επιφάνεια του, με κυκλικές κινήσεις. Τα τρυβλία αναστράφηκαν και μεταφέρθηκαν για επώαση στους 25°C για 48h, για τα δύο θρεπτικά υλικά (CFC, TSA).



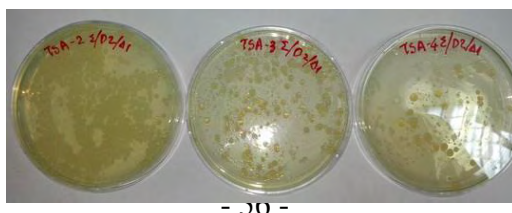
**Σχήμα 2.1.2.** Απεικόνιση των τεχνικών της ενσωμάτωσης (α)  
και της επιφανειακής επίστρωσης (β)

**2.2.4. Καταμέτρηση τρυβλίων - Έκφραση των αποτελεσμάτων**

Από τα τρυβλία των τριών διαδοχικών αραιώσεων, καταμετρήθηκαν και επιλέχθηκαν αυτά στα οποία διαπιστώθηκαν 30-300 αποικίες. Για την αρίθμηση τους δόθηκε η ανάλογη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η σύγχυση των αποικιών με σωματίδια των δειγμάτων ή/και ιζήματα των θρεπτικών υλικών. Το αποτέλεσμα της μέτρησης δεν εκφράζει αριθμό μικροβίων, αλλά αριθμό αποικιών (colony forming unit), που αναπτύχθηκαν σε ορισμένο χρόνο και θερμοκρασία από συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος (cfu/g).

**2.2.4.1. Καταμέτρηση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX)**

Το θρεπτικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε για την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού και την καταμέτρηση των αποικιών της (OMX), ήταν το Tryptone Soy Agar (TSA). Εφαρμόστηκε η επιφανειακή επίστρωση, ως τεχνική εμβολιασμού και ακολούθησε επώαση στους 25°C για 48h (Εικ 2.2.3).



**Εικόνα 2.2.3.**

Καλλιέργειες OMX σε TSA για τρεις  
διαδοχικές αραιώσεις



#### 2.2.4.2. Καταμέτρηση Ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*)

Το επιλεκτικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και καταμέτρηση των ψευδομονάδων ήταν το Ceftrimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC). Ο εμβολιασμός στο υλικό έγινε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25°C για 48h (Εικ 2.2.4).



**Εικόνα 2.2.4**  
Καλλιέργειες ψευδομονάδων σε CFC για  
τρεις διαδοχικές αραιώσεις

#### 2.2.4.3. Καταμέτρηση θειοαναγωγικών βακτηρίων (*S. putrefaciens*)

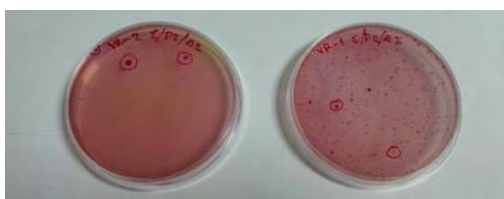
Τα θειοαναγωγικά βακτήρια αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα Iron Agar (IA) και η τεχνική εμβολιασμού που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της ενσωμάτωσης. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία 25°C για 48h/72h (Εικ 2.2.5).



**Εικόνα 2.2.5.**  
Καλλιέργειες θειοαναγωγικών βακτηρίων  
σε IA για τρεις διαδοχικές αραιώσεις

#### 2.2.4.4. Καταμέτρηση εντεροβακτηριοειδών (*Enterobacteriaceae*)

Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA), ενώ εφαρμόστηκε κι εδώ η τεχνική της ενσωμάτωσης και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 24h (Εικ 2.2.6).



**Εικόνα 2.2.6.**  
Καλλιέργειες εντεροβακτηριοειδων σε  
VRBGA για δύο διαδοχικές αραιώσεις

### 2.3. Χημικές αναλύσεις

Στο σημείο αυτό εκτιμώνται οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών ως προϊόντα μεταβολισμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (χημικοί δείκτες αλλοίωσης), οι οποίοι έχουν άμεση συσχέτιση με τους δείκτες της μικροβιολογικής ποιότητας αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ιχθύων κατά τη διάρκεια του πειράματος.

### 2.3.1. Εξαγωγή του βάρους του λίπους

#### α) Αντιδραστήρια

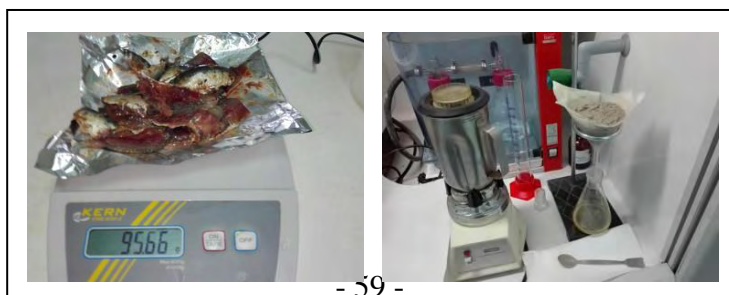
- Χλωροφόρμιο ( $\text{CHCl}_3$ )
- Άνυδρο θειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

#### β) Όργανα

- Blender με μεταλλικό δοχείο
- Γυάλινος ογκομετρικός κύλινδρος των 250ml
- Γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 250ml με εσφυρισμένο πώμα
- Στατό και μεγάλο γυάλινο χωνί
- Διηθητικό χαρτί
- Σιφόνια των 10ml, 20ml και 25ml
- Κάψες πορσελάνης των 50ml τουλάχιστον
- Υδατόλουτρο
- Φούρνος
- Ξηραντήρας (με silicagel)
- Ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων

#### γ) Παρασκευή χλωροφορμικού εκχυλίσματος

Μετά το φιλετάρισμα της σάρκας τοποθετήθηκαν περίπου 100g ιχθύος σε blender με μεταλλικό δοχείο, που δεν προσβάλλεται από διαλύτες και προστέθηκαν περίπου 250ml χλωροφορμίου. Το δείγμα λιανίστηκε σε χαμηλή ταχύτητα, ενώ η προσθήκη του διαλύτη έγινε σταδιακά, ώστε να επιτευχθεί πλήρης ανάμιξη και να εκχυλίσει όσο το δυνατό περισσότερο λίπος (Εικ. 2.3.1 και 2).



### Εικόνες 2.3.1. & 2. Φιλετάρισμα, λιάνισμα και εκχύλιση λίπους

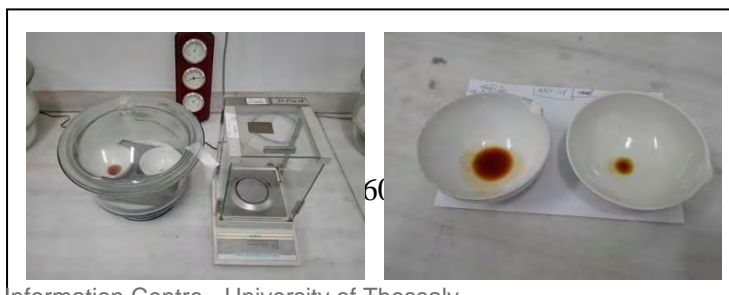
Αμέσως μετά την πλήρη ανάμιξή του, το μίγμα διηθήθηκε με πτυχωτό ηθμό και επαναλήφθηκε η διαδικασία της διήθησης με άλλο ηθμό, που περιείχε μικρή ποσότητα άνυδρου θειϊκού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), ως ξηραντικό μέσο της περιέχουσας υγρασίας. Επιδιώχθηκε η λήψη όσο το δυνατόν περισσότερου όγκου του διηθήματος, που να επαρκέσει για όλες τις απαραίτητες μετρήσεις και κυρίως να είναι αντιπροσωπευτικός για την εξαγωγή του βάρους του λίπους στους ιχθύες (Εικ. 2.3.3).



Εικόνες 2.3.3. & 4. Συλλογή εκχυλίσματος και εξάτμιση διαλύτη

#### δ) Υπολογισμός του βάρους του λίπους

Με το αντίστοιχης χωρητικότητας σιφώνιο πάρθηκαν από 20ml έως 25ml, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα κάθε φορά από το διήθημα, σε προ ξηραμένη και προ ζυγισμένη κάνα από πορσελάνη. Αφού εξατμίστηκε ο διαλύτης σε υδατόλουτρο, το δείγμα ξηράθηκε σε φούρνο, στους  $100^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια ψύχθηκε μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ξηραντήρα και ζυγίστηκε σε ζυγό, με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων (Εικ. 2.3.4 έως 6).



### Εικόνες 2.3.5 & 6. Ξήρανση και ζύγιση εξαγόμενου λίπους

Το βάρος του λίπους στο διήθημα λοιπόν προκύπτει από τη σχέση:

$$(2.3.1) \quad W_f = W_{crF} - W_{crE}$$

όπου:

$W_f$  = βάρος της λιπαρής ύλης (fat) σε g

$W_{crF}$  = βάρος κάψας πορσελάνης με τη λιπαρή ύλη σε g

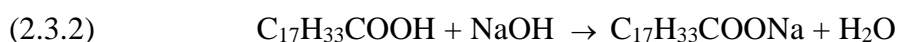
$W_{crE}$  = βάρος κενής κάψας πορσελάνης σε g

### 2.3.2. Προσδιορισμός του Βαθμού Οξύτητας

Ανεξάρτητα από τον τρόπο που εκφράζεται η οξύτητα (%w/w ελεύθερα λιπαρά οξέα, αριθμός ή βαθμός οξύτητας, κλπ), η μέθοδος προσδιορισμού είναι η ίδια και στηρίζεται στην ίδια αρχή:

Σε προ-εξουδετερωμένη ποσότητα αιθυλικής αλκοόλης προστίθεται ποσότητα χλωροφορμικού εκχυλίσματος λίπους ιχθύος, με λίγες σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης, ενώ το μείγμα ογκομετρείται με αλκαλικό διάλυμα (NaOH0.1N). Η αιθυλική αλκοόλη είναι κοινός διαλύτης του χλωροφορμικού διαλύματος του λίπους, αλλά και του υδατικού

αλκαλικού διαλύματος. Η ποσότητα του αλκαλικού διαλύματος που καταναλώνεται αποτελεί το μέτρο της οξύτητας της λιπαρής ύλης, βάσει στοιχειομετρίας της αντίδρασης 2.3.2, όπου τα mol του RCOOH και του NaOH αντιδρούν σε αναλογία 1:1.



#### α) Αντιδραστήρια

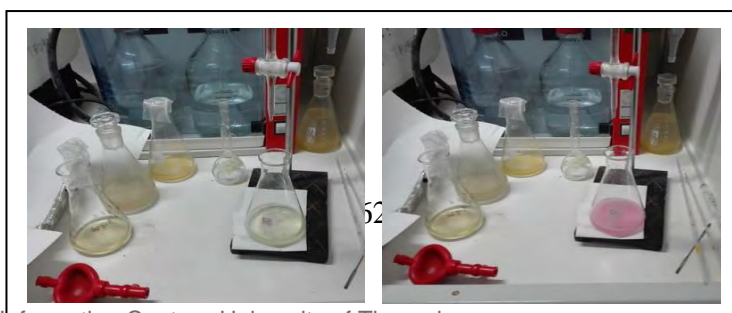
- Αιθυλική αλκοόλη 95%Vol
- Διάλυμα Καυστικού Νατρίου (NaOH) 0.1N
- Δείκτης Φαινολοφθαλεΐνης

#### β) Όργανα

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 25ml
- Σιφόνιο των 25ml
- Πουάρ
- Κωνική φιάλη των 250ml
- Προχοΐδα

#### γ) Τεχνική

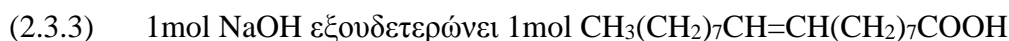
Μέσα σε κωνική φιάλη των 250ml μεταφέρθηκαν με τον ογκομετρικό κύλινδρο 25ml αιθυλικής αλκοόλης 95%Vol και εξουδετερώθηκαν με λίγες σταγόνες NaOH 0.1N, αφού προστέθηκε φαινολοφθαλεΐνη. Με το σιφόνιο των 25ml προστέθηκε ο αντίστοιχος όγκος του διηθήματος και στη συνέχεια το διάλυμα αναδεύτηκε, ώστε να ομογενοποιηθεί. Ακολούθησε ογκομέτρηση με NaOH 0.1N, μέχρι που σχηματίστηκε ροζ χρώμα, το οποίο διατηρήθηκε τουλάχιστον για 15sec (Εικ. 2.3.7 και 8).



### Εικόνες 2.3.7. & 8. Αρχικό και τελικό σημείο ογκομέτρησης

#### δ) Υπολογισμοί

Σύμφωνα με την αντίδραση (2.3.2) για τον υπολογισμό της οξύτητας του λίπους εκφρασμένης % σε ελαϊκό οξύ ισχύει:



ή  $1\text{ml NaOH } 0.1\text{N} \equiv 0.0282\text{g ελαϊκού οξέος}$

Τότε:

$$(2.3.4) \quad \% \text{w/w ελεύθερα λιπαρά οξέα (ως ελαϊκό οξύ)} = \frac{V \times 0.0282 \times 100}{W_f}$$

Ενώ για τον υπολογισμό του Βαθμού Οξύτητας (BO) του λίπους, με τον οποίο εκφράζονται τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η σχέση:

$$(2.3.5) \quad \text{BO} = \frac{V}{W_f}$$

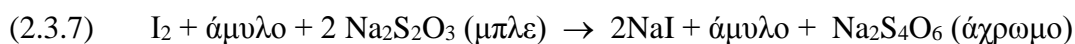
#### 2.3.3. Προσδιορισμός του Αριθμού Υπεροξειδίων

Στο χλωροφορμικό εκχύλισμα του λίπους προστίθεται οξικό οξύ και περίσσεια ιωδιούχου καλίου. Το μείγμα ανακινείται και αφήνεται στο σκοτάδι (το ιωδιούχο κάλιο διασπάται στο φως και απελευθερώνεται το ιώδιο), μέχρι να λάβει μέρος η αντίδραση

της οξείδωσης των ιωδιούχων ανιόντων από το υπεροξειδικό οξυγόνο. Κατόπιν προστίθεται νερό (σχηματίζονται δύο στοιβάδες, η κάτω είναι του χλωροφορμίου) και το απελευθερωμένο ιώδιο ογκομετρείται παρουσία δείκτη αμύλου, με θειοθειικό νάτριο. Η απελευθέρωση του ιωδίου είναι συνέπεια της δέσμευσης του καλίου από την υδροξυλική ομάδα των υδροϋπεροξειδίων, των οποίων η ικανότητα να απελευθερώνουν ιώδιο από το ιωδιούχο κάλιο, αναπαρίσταται από την ακόλουθη αντίδραση:



Η ποσότητα των υπεροξειδίων υπολογίζεται από την ποσότητα του  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  που καταναλώνεται και εκφράζεται σε μονάδες χιλιοστοϊσοδυνάμων (meq) υπεροξειδίου ανά 1Kg λίπους που εξάγεται από τον ιχθύ, σύμφωνα με την αντίδραση:



#### **α) Αντιδραστήρια**

- Παγόμορφο οξικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  Glacial)
- Κορεσμένο υδατικό διάλυμα ιωδιούχου καλίου (KI), (Σημ. 1)
- Διάλυμα δείκτη αμύλου 1%, (Σημ. 2)
- Διάλυμα θειοθειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0.002N, (Σημ. 3)

#### **β) Όργανα**

- Κωνικές φιάλες των 250ml με εσφυρισμένο πώμα
- Ογκομετρικές φιάλες των 100ml
- Σιφόνια του 1ml και των 25ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 50ml

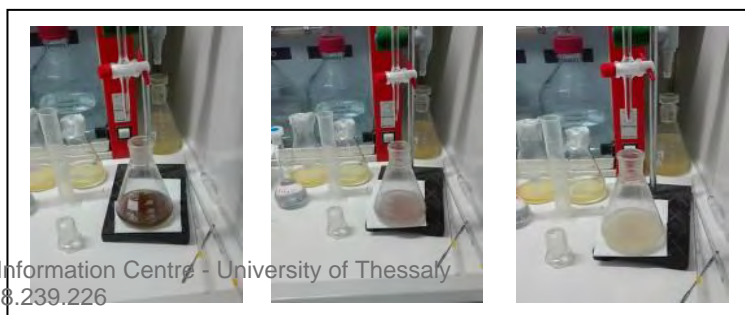


- Ποτήρια ζέσεως των 50ml και των 100ml
- Υδροβολείς με απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- Αναλυτικό ζυγός
- Θερμαντική εστία με αναδευτήρα
- Προχοΐδα των 25ml, βαθμονομημένη ανά 0.05ml

### γ) Τεχνική

Σε κωνική φιάλη των 250ml με εσφυρισμένο πώμα, μεταφέρθηκαν με σιφόνιο 25ml από το διήθημα του χλωροφορμικού εκχυλίσματος (παράγραφος 2.3.1). Προστέθηκαν 37ml οξικού οξέος και 1ml φρέσκου κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Η φιάλη πωματίστηκε αμέσως και αφού ανακινήθηκε επί 1min, παρέμεινε στο σκοτάδι ακριβώς 5min, σε θερμοκρασία 25°C. Κατόπιν προστέθηκαν, με ογκομετρικό κύλινδρο 30ml H<sub>2</sub>O και με σιφόνιο 1ml από το διάλυμα του δείκτη αμύλου, ενώ στη συνέχεια πληρώθηκε η προχοΐδα με το διάλυμα Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και ακολούθησε η ογκομετρική διαδικασία. Η προσθήκη του Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> έγινε βαθμιαία στάγδην, μέχρι την πλήρη δέσμευση του ιωδίου, που συμπίπτει και με την πλήρη εξαφάνιση του μπλε χρώματος του διαλύματος (Εικ 2.3.9 έως 11).

Ταυτόχρονα εφαρμόστηκε ισχυρή ανάδευση στη φιάλη με το διάλυμα, για να απελευθερωθεί το τυχόν δεσμευμένο ιώδιο από το χλωροφόρμιο. Διενεργήθηκαν δύο προσδιορισμοί ανά δείγμα και συγχρόνως λευκός προσδιορισμός τυφλού δείγματος (blank sample), όπου ακολουθήθηκε η ίδια δοκιμή χωρίς όμως το δείγμα της λιπαρής ύλης. Στη περίπτωση που το αποτέλεσμα του λευκού προσδιορισμού ξεπεράσει την κατανάλωση του 0.05ml διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, τα αντιδραστήρια αντικαθίστανται.



**Εικόνες 2.3.9., 10. & 11.** Αρχικό σημείο, κοντά στο ισοδύναμο και τελικό σημείο ογκομέτρησης

**Σημείωση 1:** Για την παρασκευή του φρέσκου κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου, ζυγίστηκαν 20g και προστέθηκαν σε μικρό ποτήρι ζέσεως που περιείχε 15ml H<sub>2</sub>O. Επειδή η διάλυση της ουσίας στο νερό γίνεται ενδόθερμα και το ποτήρι πάγωσε, κρατήθηκε μέσα στη χούφτα για να απορροφήσει θερμότητα, ενώ το διάλυμα αναδεύονταν συνεχώς, μέχρι που να παραμένουν λίγοι κρύσταλλοι της ουσίας στον πυθμένα του ποτηριού. Για κάθε ημέρα μέτρησης, παρασκευαζόταν φρέσκο διάλυμα, το οποίο φυλασσόταν σε σκούρα φιάλη μέχρι τη χρήση, στο σκοτάδι.

**Σημείωση 2:** Για την παρασκευή του δείκτη αμύλου, ζυγίστηκε 0.5g άμυλο πατάτας το οποίο προστέθηκε σε ποτήρι ζέσεως με περίπου 90ml βραστό H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα έβρασε για λίγα λεπτά ακόμη και μετά μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100ml. Στη συνέχεια αφέθηκε κάτω από βρύση με τρεχούμενο νερό για να κρυώσει και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος με H<sub>2</sub>O, μέχρι τη χαραγή. Προεραϊτικά, για να μην παρασκευάζεται κάθε φορά φρέσκο διάλυμα του δείκτη, προστέθηκε 1ml οξικού οξέος, ως συντηρητικό.

**Σημείωση 3:** Καθημερινώς, παρασκευαζόταν διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0.002N, με αραιώση πρότυπου διαλύματος κανονικότητας 0.1N, από τυποποιημένη

αμπούλα. Αρχικά, αραιώθηκε το περιεχόμενο της αμπούλας σε φιάλη των 1000ml με H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια λαμβάνονταν 2ml από το διάλυμα για περαιτέρω αραιώση με H<sub>2</sub>O, σε φιάλη των 100ml. Επιλέχθηκε η κανονικότητα του διαλύματος 0.002N, για μεγαλύτερη ευαισθησία σε μικρές συγκεντρώσεις.

#### δ) Υπολογισμοί

##### i. Αραίωση του πρότυπου διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.1N

Ο όγκος του πρότυπου διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.1N που πρέπει να ληφθεί για να αραιωθεί η συγκέντρωσή του σε 0.002N, υπολογίζεται ως εξής:

$$(2.3.8) \quad N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$(2.3.9) \quad V_1 = \frac{N_2 \times V_2}{N_1}$$

όπου:

$N_1$  = η κανονικότητα του διαθέσιμου διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.1N)

$V_1$  = ο όγκος σε ml του διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, που πρέπει να ληφθεί και να αραιωθεί με H<sub>2</sub>O

$N_2$  = η επιθυμητή κανονικότητα του διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.002N)

$V_2$  = ο τελικός όγκος του αραιωμένου διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (100ml)

επομένως:

$$(2.3.10) \quad V_1 = \frac{0.002 \times 100}{0.1} = 2ml$$

**ii.** Έκφραση των αποτελεσμάτων

Από τις παραπάνω αντιδράσεις (2.3.6) και (2.3.7) αποδίδεται η σχέση μεταξύ:

$$(2.3.11) \quad meqNa_2S_2O_3 = meqI_2 = meqυπεροξειδίων$$

οπότε:

$$(2.3.12) \quad meq \text{ υπεροξειδίων} = N_t \times V_t = 0.002 \times V_t$$

όπου:

$N_t$  = η κανονικότητα του διαλύματος  $Na_2S_2O_3$  (0.002N)

$V_t$  = ο όγκος σε ml του διαλύματος  $Na_2S_2O_3$  που καταναλώθηκε κατά την ογκομέτρηση, διορθωμένος από το τυφλό δείγμα

Επομένως, αφού στην ποσότητα του δείγματος που εξετάζεται περιέχονται  $0.002 \times V_t$  meq υπεροξειδίων, τότε στα 1000g (Kg) θα περιέχονται meq υπεροξειδίων, όπως προκύπτει από τον παρακάτω τύπο:

$$(2.3.13) \quad AY = \frac{N_t \times V_t \times 1000}{W_f}$$

όπου:

$W_f$  = το βάρος της λιπαρής ύλης (fat) σε g

Και από τους δύο αμέσως προηγούμενους τύπους προκύπτει:

$$(2.3.14) \quad AY = \frac{2 \times V_t}{W_f}$$

Ως αποτέλεσμα αναφέρεται αριθμητικός μέσος όρος των δύο μετρήσεων, με ένα δεκαδικό ψηφίο.

#### **2.3.4. Προσδιορισμός του pH**

Για να προσδιοριστεί το pH των δειγμάτων των ψαριών, χρησιμοποιήθηκε το ομογενοποιημένο διάλυμα της προεργασίας των 10g σάρκας των ιχθύων, αυτό που προοριζόταν για τις μικροβιολογικές δοκιμασίες. Οι μετρήσεις του pH εκτελέστηκαν στο μίγμα της αρχικής διάλυσης, αφού προηγουμένως ελήφθησαν οι ανάλογοι όγκοι για τις απαραίτητες αραιώσεις όλων των μικροβιολογικών εξετάσεων. Χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό πεχάμετρο τύπου inoLab pH730 WTW series με ηλεκτρόδιο κλειστού τύπου (Εικ. 2.3.12), με το οποίο έγιναν διπλές μετρήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ) για κάθε δείγμα και λήφθηκε ο μέσος όρος αυτών.



**Εικόνα 2.3.12.** Ηλεκτρονικό πεχάμετρο inoLab pH730 WTW

Ακολουθήθηκε πιστά το πρωτόκολλο λειτουργίας του οργάνου, σχετικά με την καθαριότητα του ηλεκτροδίου, τη βαθμονόμηση και τη συντήρησή του, για την αποφυγή

επιμολύνσεων των δειγμάτων μεταξύ τους, για την ακρίβεια των μετρήσεων, καθώς και για την διαχρονικά καλή λειτουργία του οργάνου.

## 2.4. Οργανοληπτικός έλεγχος

Παράλληλα με τις χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις, πραγματοποιήθηκαν οργανοληπτικές δοκιμασίες ανά δεύτερη ημέρα του διαστήματος συντήρησης των ιχθύων στους 2°C, από δύο μη εκπαιδευμένους αξιολογητές, ώστε να καταγραφούν οι μεταβολές των εξωτερικών χαρακτηριστικών τους και να συνεκτιμηθεί η συνολική εικόνα της κατάστασής τους.

### 2.4.1. Χαρακτηριστικά αξιολόγησης

Προετοιμάστηκε ένα ερωτηματολόγιο με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που ήταν η εξωτερική εμφάνιση, η οσμή, το χρώμα και η συνεκτικότητα της σάρκας, στα οποία παρατηρήθηκαν μεταβολές. Αυτά τα χαρακτηριστικά, εξετάστηκαν στο δέρμα, στα μάτια, στα βράγχια και στο σώμα των ιχθύων. Ακολουθεί ο πίνακας που εφαρμόστηκε ως εμπειρική οδηγία για την παρακολούθηση των σημείων που εμφάνισαν υποβάθμιση των ιδιοτήτων τους (Πίν. 2.1.2)

**Πίνακας 2.1.2.** Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ποιοτικών παραμέτρων

Κατάσταση ιδιοτήτων	Εξωτερική εμφάνιση	Οσμή	Χρώμα	Συνεκτικότητα σάρκας
	Ελέγχονται το δέρμα και τα μάτια	Ελέγχονται τα βράγχια, το στόμα και η κοιλιά αφού αφαιρεθούν τα εντόσθια	Ελέγχονται το δέρμα και τα βράγχια	Ελέγχεται το σώμα

<b>Φρέσκο</b>	Το δέρμα τους είναι λαμπερό. Τα λέπια είναι κολλημένα στο σώμα, δεν βγαίνουν εύκολα, γυαλίζουν και είναι υγρά, ενώ αν ανασηκωθούν επανέρχονται στη θέση τους αμέσως. Τα μάτια είναι ζωηρά, στρογγυλά, γυαλιστερά και πιάνουν όλη τη κοιλότητά.	Έχουν ευχάριστη, ελαφριά οσμή που μοιάζει με αυτή των φυκιών της θάλασσας.	Το δέρμα τους έχει γυαλιστερή όψη σαν μεταλλική λάμψη και το χρώμα είναι ζωηρό.	Κρατώντας από το κεφάλι σε οριζόντια θέση είναι δύσκαμπτο και δελυγίζει. Εάν η σάρκα πιεστεί με τα δάχτυλα επανέρχεται και δεν μένει σημάδι.
<b>Αλλοιωμένο</b>	Είναι γλοιώδη στην αφή και τα λέπια αφαιρούνται πολύ εύκολα, ενώ τα μάτια είναι θολά, μαλακά και έχουν μπει προς τα μέσα.	Έχουν έντονη, δυσάρεστη οσμή.	Το δέρμα τους είναι θαμπό και τα βράγχια άχρωμα.	Κρατώντας το σε οριζόντια θέση κάμπτεται, ενώ εάν η σάρκα πιεστεί με τα δάχτυλα, το βαθύλωμα παραμένει.

#### 2.4.2. Κλίμακα βαθμολόγησης

Στη συνέχεια του ερωτηματολογίου με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά καταρτίστηκε βαθμολογική κλίμακα, με την οποία αποτυπώνεται η ένταση της υποβάθμισής τους, για κάθε ένα ξεχωριστά (Πιν. 2.1.3):

**Πίνακας 2.1.3.** Βαθμολογική αποτύπωση της έντασης των ιδιοτήτων

	Εξωτερική εμφάνιση		Οσμή		Χρώμα		Συνεκτικότητα σάρκας		Συνολική Εμφάνιση - Αποδοχή	
<b>Αξιολογητές</b>										
<b>Ημέρα</b>	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>0</b>	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	<b>MO<sub>A</sub></b>	<b>MO<sub>B</sub></b>
<b>2</b>	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	<b>MO<sub>A</sub></b>	<b>MO<sub>B</sub></b>
<b>4</b>	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	<b>MO<sub>A</sub></b>	<b>MO<sub>B</sub></b>
<b>6</b>	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	5-1	<b>MO<sub>A</sub></b>	<b>MO<sub>B</sub></b>

Όπου:

Άριστο: 5, Πολύ καλό: 4-4.9, Καλό: 3-3.9, Αποδεκτό: 2-2.9, Απαραδέκτο: 1-1.9  
 ενώ στη Συνολική Εμφάνιση & Αποδοχή αναφέρεται ο μέσος όρος των βαθμολογιών των τεσσάρων παραμέτρων για κάθε αξιολογητή (A, B).

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

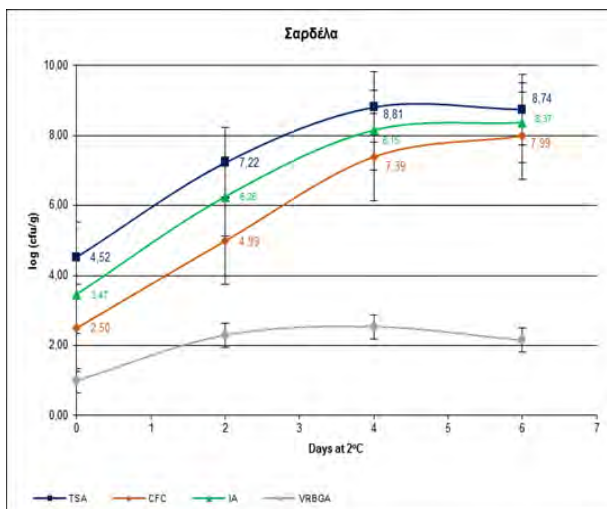
#### **3.1. Μικροβιολογικές αναλύσεις**

Στο σημείο αυτό παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των μικροοργανισμών των καλλιεργητικών τεχνικών ανάπτυξης στις μικροβιολογικές δοκιμασίες, όπως εκτελέστηκε η κάθε μία ξεχωριστά και για τα δύο είδη ιχθύων.

##### **3.1.1. Καταμέτρηση μικροοργανισμών στα δείγματα της σαρδέλας**



Οι μεταβολές που σημειώθηκαν κατά την καταμέτρηση των αποικιών της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών [ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*), θειοαναγωγικά βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*), εντεροβακτηριοειδή (*Enterobacteriaceae*)] των δειγμάτων της σαρδέλας παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.1.1. Παρατίθενται συγκριτικά όλες οι παραπάνω παράμετροι, με την αποτύπωση των μέσων όρων των τιμών από τις διπλές μετρήσεις σε δύο δείγματα του συγκεκριμένου είδους (2δείγματα x2μετρήσεις), για κάθε μέρα εξέτασης, σε όλη τη διάρκεια συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 2°C. Σε πρώτη ανάγνωση, όλες οι παράμετροι εμφανίζουν ταχεία αύξηση, όπως φαίνεται από τη διαφορά μεταξύ της πρώτης και της τρίτης μέτρησης (D<sub>0</sub> και D<sub>4</sub>), που κυμαίνεται περίπου στα 4.5logs cfu/g, εξαιρώντας τα εντεροβακτηριοειδή που στην ουσία δεν αναπτύσσονται.



**Διάγραμμα 3.1.1.**

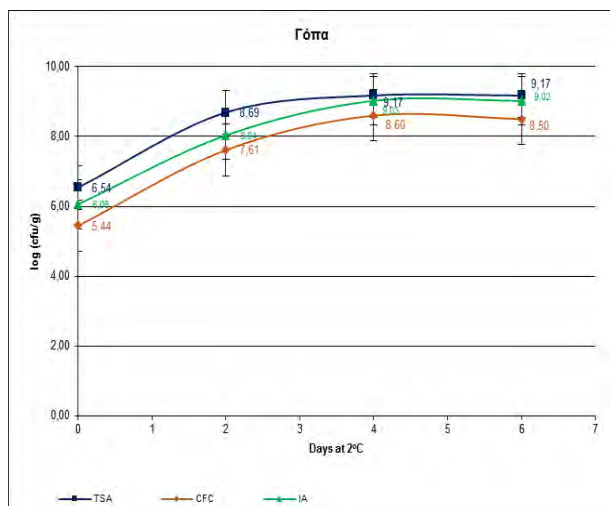
Συγκριτική παράθεση των μικροβιολογικών παραμέτρων OMX [■], ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*) [●], θειοαναγωγικά βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*) [▲], εντεροβακτηριοειδή, *Enterobacteriaceae*) [●], κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων της σαρδέλας, σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης στους 2°C. Τα αποτυπωμένα ανά 2<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος σημεία αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τιμών από δύο επαναλήψεις για τα δύο δείγματα σαρδέλας (2x2), ενώ οι κάθετες μπάρες, πάνω στα ίδια σημεία για τις ίδιες ημέρες, αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των διπλών μετρήσεων.

Φαίνεται ξεκάθαρα ότι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί είναι τα θειοαναγωγικά βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*) και οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*), από τους οποίους επικρατέστεροι είναι οι πρώτοι. Επίσης παρατηρείται πως ο

λόγος της διαφοράς μεταξύ των TSA-IA και TSA-CFC, παραμένει σταθερός στο  $\frac{1}{2}$ , τόσο κατά την έναρξη των μετρήσεων (1log cfu/g και 2logs cfu/g αντιστοίχως), όσο και κατά το πέρας του πειράματος (0.37log cfu/g και 0.75log cfu/g αντιστοίχως).

### 3.1.2. Καταμέτρηση μικροοργανισμών στα δείγματα της γόπας

Όπως στην προηγούμενη περίπτωση των δειγμάτων της σαρδέλας, έτσι κι εδώ παρουσιάζονται οι αντίστοιχες μεταβολές των μικροβιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν στα δείγματα της γόπας. Στο διάγραμμα 3.1.2 αποτυπώνονται οι μέσοι όροι των τιμών από τις διπλές μετρήσεις σε δύο δείγματα της γόπας (2δείγματα x2μετρήσεις), για κάθε μέρα εξέτασης, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2°C.



#### Διάγραμμα 3.1.2.

Συγκριτική παράθεση των μικροβιολογικών παραμέτρων OMX [■], ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*) [●], θειοαναγωγικά βακτήρια (*Shewanella putrifaciens*) [▲], κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων της γόπας, σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης στους 2°C. Τα αποτυπωμένα ανά 2<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος σημεία αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τιμών από δύο επαναλήψεις για τα δύο δείγματα σαρδέλας (2x2), ενώ οι κάθετες μπάρες, πάνω στα ίδια σημεία για τις ίδιες ημέρες, αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των διπλών μετρήσεων.

Σε αυτό το διάγραμμα, εξαιρώντας κι αυτή τη φορά τις τιμές των εντεροβακτηριοειδών οι οποίες σε όλη τη διάρκεια του πειράματος καταμετρήθηκαν

<1log cfu/g, παρατηρείται αύξηση από τη διαφορά μεταξύ των τιμών έναρξης (D<sub>0</sub>) και των τιμών της 3<sup>ης</sup> μέτρησης (D<sub>4</sub>) που κυμαίνεται περίπου στα 3log cfu/g. Και στην περίπτωση των δειγμάτων της γόπας επικρατέστεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί είναι τα θειοαναγωγικά βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*) και ακολουθούν οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*). Με την έναρξη των μετρήσεων (D<sub>0</sub>) οι διαφορές μεταξύ των τιμών των TSA-IA είναι περίπου 0.5log cfu/g και μεταξύ των τιμών των TSA-CFC είναι περίπου 1log cfu/g, ενώ κατά τη λήξη (D<sub>6</sub>) οι διαφορές είναι περίπου 0.15log cfu/g μεταξύ των TSA-IA και περίπου 0.6log cfu/g μεταξύ των TSA-CFC, που σημαίνει ότι ο λόγος της διαφοράς από ½ πέφτει στο ¼.

### **3.2. Χημικές αναλύσεις**

Στο σημείο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των χημικών παραμέτρων που εξετάστηκαν και στα δύο είδη ιχθύων κατά την πειραματική διαδικασία αυτής της εκπόνησης. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων τόσο του Βαθμού Οξύτητας όσο και του Αριθμού Υπεροξειδίων γίνεται ταυτόχρονα και συγκριτικά για τους δύο ιχθύες, ώστε να υπάρχει αντιπαράθεση στον τρόπο που οξειδώνεται το λίπος, ανάλογα με τη λιποπεριεκτικότητα του κάθε είδους.

#### **3.2.1. Περιεχόμενο λίπος**

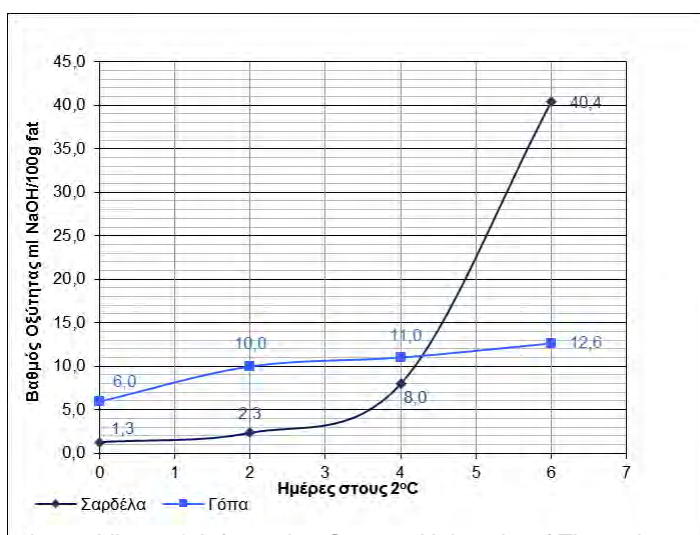
Στον παρακάτω πίνακα 3.1.1. καταγράφονται τα επίπεδα που κυμάνθηκαν οι τιμές κατά τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπίδια, στη διάρκεια της περιόδου συντήρησης της σαρδέλας και της γόπας στους 2°C. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων μπορούν να εξηγηθούν από την άποψη των διακυμάνσεων μεταξύ των ατόμων των ιχθύων, αντί των προκαταρκτικών συνθηκών ψύξης.

**Πίνακας 3.1.1.** % w/w περιεχόμενο λίπος στη ληφθείσα σάρκα των ιχθύων

α/α	Ημέρα	Σαρδέλα	Γόπα
1	D <sub>0</sub>	4.70	1.44
2	D <sub>2</sub>	11.51	3.87
3	D <sub>4</sub>	6.63	3.40
4	D <sub>6</sub>	5.42	3.98

### 3.2.2. Βαθμός Οξύτητας

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διαγ. 3.2.1) συγκρίνονται οι τιμές των μέσων όρων των δύο μετρήσεων κατά τον προσδιορισμό του βαθμού οξύτητας των δύο ειδών ιχθύων, όπου αποτυπώνεται η διαφορά της αυξητικής τάσης μεταξύ τους.



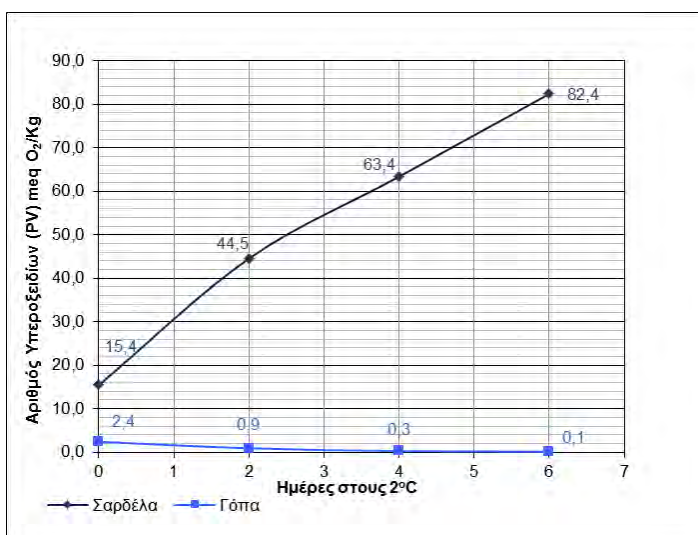
**Διάγραμμα 3.2.1.**

Συγκριτική απεικόνιση του Β.Ο. με την αποτύπωση των μέσων όρων των δύο μετρήσεων για τα δείγματα των δύο ειδών ιχθύων

Συγκεκριμένα, παρατηρείται διαφορά στον τρόπο που μεταβλήθηκαν οι τιμές του βαθμού οξύτητας στα δύο είδη ιχθύων, η οποία εντοπίζεται τόσο στο εύρος της περιοχής που κυμάνθηκαν αυτές από την έναρξη μέχρι και το πέρας του πειράματος, όσο και στο ρυθμό με τον οποίο παρατηρήθηκε η αύξησή τους. Για τη σαρδέλα, ενώ η αρχική τιμή είναι χαμηλότερη από αυτή της γόπας, η αύξησή της είναι ραγδαία από την 4<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους και μετά (από 1.3ml NaOH/100g λίπους κατέληξε στα 40.4ml NaOH/100g λίπους, έναντι 6.0ml NaOH/100g λίπους και 12.6ml NaOH/100g λίπους αντιστοίχως για τη γόπα).

### 3.2.3. Αριθμός Υπεροξειδίων

Οι τιμές που μετρήθηκαν κατά τον προσδιορισμό του Αριθμού Υπεροξειδίων στους δύο ιχθύες, παρουσιάζονται στο διάγραμμα (Διαγ. 3.2.2).



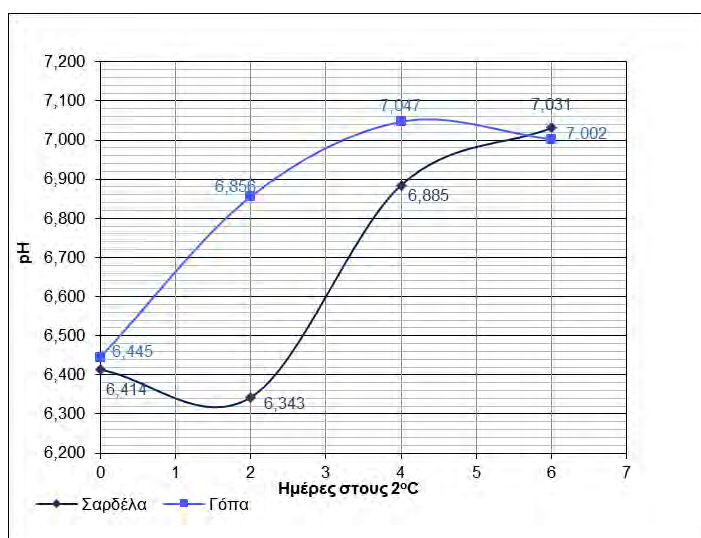
**Διάγραμμα 3.2.2.**

Συγκριτική απεικόνιση του Α.Υ. με την αποτύπωση των μέσων όρων των δύο μετρήσεων για τα δείγματα των δύο ειδών ιχθύων

Όπως στην περίπτωση του ΒΟ, παρατηρείται διαφορά στο εύρος και στο ρυθμό που μεταβλήθηκαν οι τιμές του ΑΥ και για τα δύο είδη ιχθύων. Στη σαρδέλα εμφανίζεται ραγδαία αύξηση από την 1<sup>η</sup> στη 2<sup>η</sup> μέτρηση (διαφορά περίπου 30meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων) που συνεχίζει με σταθερό ρυθμό από τη 2<sup>η</sup> στην 3<sup>η</sup> και από την 3<sup>η</sup> στην 4<sup>η</sup> μέτρηση (διαφορά στις δύο μετρήσεις περίπου 20meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων). Αντίθετα, στη γόπα εμφανίζεται μεταβολή από τα 2.4meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων της αρχικής τιμής να ελαττώνονται αμέσως στο 0.9meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων και να καταλήγουν στο 0.1meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων.

#### 3.2.4. Μεταβολή του pH

Ακολουθεί το διάγραμμα με τη μεταβολή των τιμών του pH για τα δύο είδη ιχθύων (Διαγ 3.2.3), όπως καταγράφηκαν κατά την προεργασία των δειγμάτων, πριν από τις μικροβιολογικές δοκιμασίες.



**Διάγραμμα 3.2.3.**  
Απεικόνιση των μεταβολών του pH με καταγραφή των μέσων όρων των τιμών από μία μέτρηση για τα δύο δείγματα από κάθε είδος ιχθύος, στη διάρκεια συντήρησής τους στους 2°C

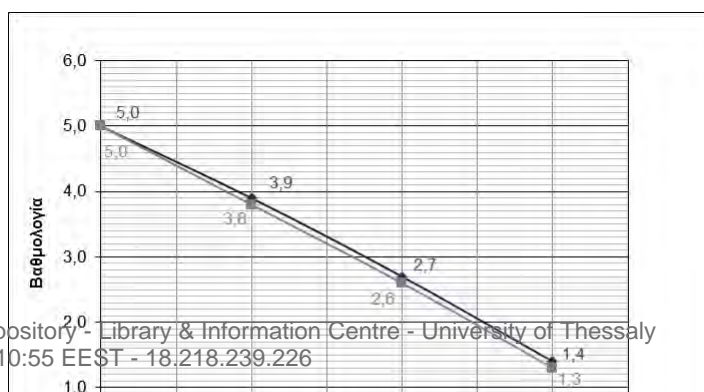
Διαφορά υπάρχει και στον τρόπο που μεταβάλλεται το pH για τα δύο εξεταζόμενα είδη, από την 1<sup>η</sup> μέτρηση κατά τη οποία ξεκινάμε με παραπλήσια αρχική τιμή (6.41 για τη σαρδέλα και 6.44 για τη γόπα), μέχρι και την 4<sup>η</sup> μέτρηση όπου καταλήγουν επίσης σε παραπλήσια τελική τιμή του pH (7.00 για τη σαρδέλα και 7.03 για τη γόπα). Η διαφορά εντοπίζεται για την περίπτωση της σαρδέλας, όπου στην τιμή της 2<sup>ης</sup> μέτρησης εμφανίζει «βύθιση» της τάξης του 0.1 (6.34) και στη συνέχεια ανεβαίνει κατακόρυφα, μέχρι να φτάσει την τελική τιμή της γόπας.

### 3.3. Οργανοληπτικός έλεγχος

Εδώ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την οργανοληπτική εξέταση, η οποία διενεργήθηκε συγχρόνως με τις μικροβιολογικές και χημικές δοκιμασίες.

#### 3.3.1. Οργανοληπτικό σκορ

Στο ακόλουθο διάγραμμα (Διαγ. 3.3.1) αποτυπώνονται οι βαθμολογίες με τις οποίες αξιολογήθηκαν οι μεταβολές των εξωτερικών ποιοτικών χαρακτηριστικών, ξεχωριστά από κάθε αξιολογητή.



### **Διάγραμμα 3.3.1.**

Διαγραμματική απεικόνιση της ποιοτικής υποβάθμισης των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των δύο ειδών ιχθύων κατά τη συντήρησή τους στους 2°C

Αυτό που φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα είναι η πανομοιότυπη αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και στα δύο είδη ιχθύων. Και τα δύο φτάνουν στο σημείο της απόρριψης την 5<sup>η</sup> ημέρα συντήρησής τους στους 2°C, με τα δείγματα της σαρδέλας να τερματίζουν σε λίγο καλύτερη κατάσταση από τα δείγματα της γόπας.

### **3.4. Συζήτηση**

Στο σημείο αυτό θα επιχειρηθεί η ενδεδειγμένη μελέτη της σχετικής με το θεωρητικό υπόβαθρο βιβλιογραφίας, πάνω στους μηχανισμούς που ισχύουν στην αλλοίωση των αλιευμάτων γενικότερα. Μετά την επιμελή διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών και τη συστηματική συγκέντρωση των πειραματικών δεδομένων, αξιολογούνται τα αποτελέσματα και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα προγενέστερων ή/και σύγχρονων εργασιών, σε μία απόπειρα εμπειριστατωμένης ανάλυσης της συνολικής εικόνας της αλλοίωσης, που αφορά στα συγκεκριμένα είδη ιχθύων, τη σαρδέλα και τη γόπα.

#### **3.4.1. Μικροβιολογικά δεδομένα**



Η αρχική και η τελική αλλοιωγόνος μικροχλωρίδα που ανιχνεύθηκε στην παρούσα μελέτη, τόσο στη νωπή σαρδέλα όσο και στη νωπή γόπα είναι παρόμοιες ως προς τα κυρίαρχα γένη, με αυτές που αναφέρονται στη ευρύτερη βιβλιογραφία που διερευνήθηκε, για ίδια αλλά και για διαφορετικά είδη ιχθύων που μελετήθηκαν σε αντίστοιχες συνθήκες συντήρησης, αλλά όχι και ως προς το επικρατέστερο γένος.

Είναι ήδη τεκμηριωμένο ότι η βακτηριακή αλλοίωση σε ιχθύες και προϊόντα αυτών που συντηρούνται υπό συνθήκες αερόβιας ψύξης προκαλείται από Gram-αρνητικούς ψυχοτρόπους οργανισμούς όπως οι *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* και *Flavobacterium spp.* (Hubbs, 1991). Στην παρούσα μελέτη οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν ήταν τα θειοαναγωγικά βακτήρια (συμπεριλαμβανομένων των *Shewanella putrefaciens*) και οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*), πράγμα που συμφωνεί μερικώς με παλαιότερες αναφορές μελετών σε μεσογειακούς ιχθύες (Koutsoumanis and Nychas, 1999) ή σε ιχθύες από εύκρατα και τροπικά ύδατα (Gillespie, 1981; Limados Santos, 1981; Gram and Huss, 1996), τα οποία συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες ψύξης ή και σε πάγο (Gennari *et al.*, 1999). Οι Chytiri *et al.*, (2003) με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση του φιλεταρίσματος στις μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες της ιριδίζουσας πέστροφας (*Onchorynchus mykiss*) ιχθυοκαλλιέργειας, η οποία συντηρήθηκε σε πάγο για 18 ημέρες, διαπίστωσαν ότι οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas*) και τα θειοαναγωγικά βακτήρια (συμπεριλαμβανομένων των *S. Putrefaciens*) ήταν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί. Το 2004 οι El Otmani *et al.* εξέτασαν σαρδέλες (*Sardina pilchardus*) αλιευμένες στις μαροκινές ακτές του Ατλαντικού και διαπίστωσαν ότι η συντήρηση σε πάγο επέτρεψε την ανάπτυξη Gram-αρνητικών βακτηρίων κυρίως (*Pseudomonas spp.*) ως κυρίαρχα, ακολουθούμενα από τα *S. putrefaciens*. Το ίδιο διαπίστωσαν για τους κυρίαρχους

αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς και οι Parlapani *et al.*, κατά τη μελέτη του προφίλ των παραγόμενων πτητικών ενώσεων λόγω μικροβιακής αλλοίωσης της τσιπούρας (*Sparus Aurata*), σε διάφορες συνθήκες συντήρησης (2014) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*), σε αερόβια ψύξη αλλά και σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 2°C.

Η ασυμφωνία που υπάρχει μεταξύ της παρούσας μελέτης και των άλλων μελετών εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι επικρατέστεροι από τους ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς που καταγράφηκαν στους υπό εξέταση ιχθύες ήταν τα θειοαναγωγικά βακτήρια και όχι οι ψευδομονάδες, όπως ήδη έχουν αναφερθεί οι ερευνητές των σχετικών μελετών. Τα θειοαναγωγικά βακτήρια αποτελούν τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε είδη προέλευσης Βόρειων θαλασσών που συντηρούνται στους 0°C (Gram *et al.*, 1987; Jørgensen and Huss, 1998), ενώ στα μεσογειακά είδη είναι δευτερεύοντες απέναντι στις ψευδομονάδες (Papadopoulos *et al.*, 2003; Taliadourou *et al.*, 2003; Paleologos *et al.*, 2004; Tryfinopoulou *et al.*, 2007). Το βακτήριο *S. putrefaciens* θεωρείται ως δυναμικά αλλοιωγόνος μικροοργανισμός των ψυχρών ή εύκρατων υδάτων που παράγει σουλφίδια και όταν ο πληθυσμός του υπερβαίνει τα 6log cfu/g, εμφανίζονται οι ενδείξεις αλλοίωσης (Gram *et al.*, 1987). Αν και έχουν συλλεχθεί στοιχεία που συσχετίζουν την απώλεια της φρεσκότητας με τα θειοαναγωγικά βακτήρια, ωστόσο είναι σημαντική η κατανόηση της αλληλεπίδρασης των *Pseudomonas spp.* στην αλλοίωση των ιχθύων (Koutsoumanis and Nychas, 1998).

Από τη μία έχει αναφερθεί ότι οι *Pseudomonas spp.* μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των *S. Putrefaciens* λόγω της ικανότητάς τους να εκκρίνουν σιδηροφόρα και αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει την ανάπτυξη της αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας (Gram and Melchiorson, 1996). Από την άλλη, μελέτες

σε νωπό κρέας έδειξαν ότι οι *Pseudomonas spp.* υπερέβαιναν τα άλλα βακτήρια λόγω της ταχύτερης ανάπτυξης, της μεγαλύτερης συγγένειάς τους με το οξυγόνο και ως εκ τούτου, του μεγαλύτερου καταβολισμού της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέως (Gill and Newton, 1977). Γενικά, η αλληλεπίδραση βακτηρίων με άλλα βακτήρια μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως ο περιορισμός του οξυγόνου και του θρεπτικού υποστρώματος και επομένως ο ανταγωνισμός μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας, αλλά και τις χημικές αλλαγές που ουσιαστικά είναι η έκφραση της ανάπτυξής της. Δεδομένου του ότι και τα *Pseudomonas spp.* και τα *S. putrefaciens* είναι δύο ισχυρά ανταγωνιστικοί ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί (Koutsoumanis *et al.*, 1999) στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε η αρχική φάση υστέρησης (λανθάνουσα) κάποιου από τα δύο γένη βακτηρίων που πιθανό να υποδεικνύει το αποτέλεσμα της αναστολικής δράσης του άλλου γένους. Επίσης στην εισαγωγή αυτής της μελέτης αναφέρθηκε ότι η ετερογένεια της μικροχλωρίδας ενός ιχθύος εξαρτάται από το περιβάλλον που έχει αλιευτεί και όχι από το είδος του, ενώ επηρεάζει το χρόνο της ακόλουθης αλλοίωσης, σύμφωνα με τις συνθήκες συντήρησης. Οι θερμοκρασιακές μεταβολές της Μεσογείου επηρεάζουν τη βακτηριακή ανάπτυξη με αποτέλεσμα οι βακτηριακοί πληθυσμοί που απαντώνται στη σάρκα των ιχθύων τους καλοκαιρινούς μήνες να υφίστανται έντονη θερμική καταπόνηση κατά τη συντήρησή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Κατά την έρευνα που διεξήγαγαν οι Ababouch *et al.*, (1996) σε σαρδέλα (*Sardina pilchardus*) κατά τη συντήρηση σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος και σε πάγο, παρατηρήθηκε ταχύς πολλαπλασιασμός των βακτηρίων (τα ψυχρότροφα πολλαπλασιάστηκαν βραδέως) για τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ στον πάγο τα βακτήρια πολλαπλασιάστηκαν αργά μετά από λανθάνουσα φάση

(προσαρμογή). Τα θειοαναγωγικά βακτήρια αναπτύχθηκαν με αρκετά μικρότερη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης.

Εφόσον κανένα από τα δύο δεν έπαψε να αναπτύσσεται εξαιτίας της εξάντλησης του υποστρώματος, η διαθεσιμότητα οξυγόνου προτείνεται να είναι ο περιοριστικός παράγοντας που οφείλεται κυρίως στη μαζική ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων (Ringo *et al.*, 1984). Κάτω από τέτοιες συνθήκες, εκείνα τα βακτήρια που μπορούν να στραφούν στη χρήση του άμεσα διαθέσιμου ΤΜΑΟ ως δέκτη ηλεκτρονίων πρέπει να έχουν ένα μεγάλο οικολογικό πλεονέκτημα έναντι των βακτηρίων που δεν έχουν αυτή την ικανότητα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει για το *S. putrefaciens*, ένα μη ζυμωτικό βακτήριο (Scott and Neelson, 1994), που αναπτύσσεται στις εκτεθειμένες περιοχές του ιχθύος και παράγει μεγάλες ποσότητες ΤΜΑ (Dalgaard *et al.*, 1993), ενώ το *Pseudomonas spp.* δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει ΤΜΑΟ για την παραγωγή ΤΜΑ (Gram *et al.*, 1990). Μέχρι τη στιγμή που ένας σημαντικός αριθμός βακτηρίων μπορεί να διεισδύσει στο μυ λόγω της πρωτεόλυσης (Gill and Penney, 1977), οι ιχθύες είναι σε μεγάλο βαθμό μη αποδεκτοί για ανθρώπινη κατανάλωση, λόγω του σχηματισμού δυσοσμίας. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη η υποβάθμιση της οσμής των ιχθύων επήλθε σχετικά γρήγορα και πιθανολογείται ότι αιτία αυτής της εξέλιξης είναι ότι χρησιμοποιήθηκαν μικρές σακούλες τροφίμων, οι οποίες αν και διατηρήθηκαν ανοιχτές, δεν επήρκεσε το οξυγόνο και δημιουργήθηκαν αναερόβιες συνθήκες.

Από τη μελέτη των χημικών και οργανοληπτικών αλλαγών που σχετίζονται με τη μικροβιακή χλωρίδα κατά την αερόβια συντήρηση της Μεσογειακής γόπας (*Boops boops*) στους 0, 3, 7 και 10°C, οι Koutsoumanis and Nychas (1998) διαπίστωσαν ότι τα κυρίαρχα βακτήρια υπήρξαν οι *Pseudomonas* και οι *S. Putrefaciens*. Οι αρχικές τιμές για την OMX ήταν 5.5log cfu/g, για τους *Pseudomonas* ήταν 4.4log cfu/g και για τους *S.*

*Putrefaciens* 3.3log cfu/g, ενώ στο τέλος της περιόδου συντήρησης ανεξαρτήτως θερμοκρασίας οι τιμές κατέληξαν περίπου στα 9log cfu/g. Επίσης, καταμετρήθηκαν και *Enterobacteriaceae*. Στη γόπα που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη δεν καταμετρήθηκαν εντεροβακτηριοειδή, ενώ στη σαρδέλα βρέθηκαν λίγο πάνω από το όριο ανίχνευσης και δεν παρουσίασαν καμία ανάπτυξη, πράγμα που υποδηλώνει την καθαρότητα των υδάτων και των πρακτικών χειρισμού μετά την αλίευσή τους. Συγκριτικά με την παρούσα μελέτη στους 2°C, για τη σαρδέλα οι αρχικές τιμές της OMX ήταν 4.5log cfu/g, των *S. Putrefaciens* ήταν 3.5log cfu/g και των *Pseudomonas* 2.5log cfu/g, καθώς όλες κατέληξαν στα 8.8, 8.4 και 8.0log cfu/g αντιστοίχως, ενώ για τη γόπα οι αρχικές τιμές της OMX ήταν 6.5log cfu/g, των *S. Putrefaciens* ήταν 6.0log cfu/g και των *Pseudomonas* 5.5log cfu/g, καθώς όλες κατέληξαν στα 8.5, 9.0 και 9.2log cfu/g αντιστοίχως. Τα υψηλά αρχικά μικροβιολογικά επίπεδα της γόπας (1log cfu/g διαφορά από τη μελέτη των Koutsoumanis and Nychas) πιθανόν να ερμηνεύονται από κακές πρακτικές χειρισμού της. Σύμφωνα με τους Fagan *et al.*, (2003) οι οποίοι μελετώντας την πρακτική της κατάψυξης πριν τη συντήρηση στους 4°C σε συσκευασμένες μερίδες ταουκιού, σκουμπριού και σολομού, ερμήνευσαν τα δεδομένα των μετρήσεων των OMX ως δείκτες υγιεινής, αφού στα δύο πρώτα φρέσκα είδη οι τιμές μετά την 3<sup>η</sup> ημέρα ήταν αποδεκτές από το Department of Health and Children, Ireland, 1992 ( $\leq 5$ log cfu/g), ενώ στο σολομό μετά την 5<sup>η</sup> ημέρα βρέθηκαν  $> 7$ log cfu/g, τη στιγμή που η αρχική τιμή ήταν 5.08log cfu/g, πράγμα που είναι ενδεικτικό των συνθηκών υγιεινής κατά τις εργοστασιακές πρακτικές μεταποίησης. Από τη μία ένα όριο αποδοχής 6log cfu/g, με βάση τις χημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες, έχει προταθεί για προϊόντα φρέσκων ιχθύων (Huss, 1988; Aguilera *et al.*, 1992). Από την άλλη κατά τους Kyrana and Lougonois, (2002) και Taliadourou *et al.*, (2003) το όριο αποδοχής για ιχθύες θαλασσινού

και γλυκού νερού είναι  $7 \log \text{ cfu/g}$ , ενώ σύμφωνα με τους Papadopoulos *et al.*, (2003) τιμές  $3 \log \text{ cfu/g}$  υποδηλώνουν καλή ποιότητα σάρκας για τους νωπούς ιχθύες που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες.

### 3.4.2. Λιπιδικό περιεχόμενο

Υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στη χημική σύνθεση των ιχθύων ακόμη και στα άτομα του ίδιου είδους, που οφείλεται κυρίως στο φύλο, την ηλικία, το περιβάλλον και τη μετανάστευση (Hyldig *et al.*, 2007). Εξίσου, είναι γνωστό ότι το περιεχόμενο των λιπιδίων στους ιχθύες εκτός από τους παραπάνω παράγοντες επηρεάζεται και από τις διατροφικές συνήθειες. Ωστόσο, οι διατροφικές συνήθειες δεν είναι μόνο συνέπεια των διαφορών μεταξύ των ειδών, αλλά και μεταξύ των ατόμων, ανάλογα με τις εποχιακές αλλαγές και βαθμό της αναπαραγωγικής ωριμότητας (Gruger, 1967; Farkas *et al.*, 1980; Nettleton, 1985; Ackman, 1989; Saito *et al.*, 1999; Özyurt and Polat, 2006).

Οι ιχθύες μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες με βάση την περιεκτικότητά τους σε λίπος: στους άπαχους (<2%), στους χαμηλού λίπους (2-4%), στους μεσαίου λίπους (4-8%) και στους υψηλού λίπους (> 8%) (Ackman, 1989). Οι De Leonardis and Macciola, (2004) σε μελέτη τους εξέτασαν τα λιπίδια σε φιλέτα σαρδέλας που αλιεύθηκαν στην Αδριατική Θάλασσα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και ομαδοποίησαν τα δείγματα σύμφωνα με τη συνολική περιεκτικότητα των λιπιδίων, σε μη λιπαρά (<4%) και σε λιπαρά (> 4%). Αποδείχθηκε ότι οι διαφορές των συνολικών λιπιδίων οφειλόταν αποκλειστικά στην εποχιακή κυκλική αύξηση των ουδέτερων λιπιδίων. Στην πραγματικότητα, οι σαρδέλες κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών

συσσώρευσαν αποθεματικό λίπος το οποίο μεταβολίστηκε κατά τους χειμερινούς μήνες. Στην παρούσα μελέτη το περιεχόμενο σε λιπίδια για τα δείγματα της σαρδέλας κυμάνθηκε από 4.71% έως 11.52%, δηλαδή σε λογικά επίπεδα σύμφωνα με την προηγούμενη παρατήρηση εφόσον η πειραματική διαδικασία διεξήχθη στις αρχές Ιουνίου. Οι Losada *et al.*, (2007) κατόπιν εξέτασης σε κατεψυγμένες σαρδέλες Ατλαντικού που υποβλήθηκαν σε προκαταρκτική ψύξη με πολτοποιημένο πάγο, αλιευμένες Νοέμβριο μήνα στις βορειοδυτικές ακτές της Ισπανίας, βρήκαν περιεκτικότητα σε λιπίδια που κυμάνθηκε μεταξύ 2.5% και 4.5%, με μέσες αρχικές τιμές των νωπών ιχθύων 3.5%. Σύμφωνα με τους Bandarra *et al.*, (1997) τα συνολικά λιπίδια της σαρδέλας κατά τις μελέτες που διεξήχθησαν μηνιαία σε διάρκεια ενός έτους, κυμάνθηκαν μεταξύ 1.2% και 18.4%, ενώ οι Lugasi *et al.*, (2003) βρήκαν στο αλιευμένο το Νοέμβριο μήνα γκριζοσαύριδο (*Trachurus trachurus*), περιεχόμενο σε λιπίδια από 5.0-9.0g/100g σάρκας. Οι Viji *et al.*, (2015) βρήκαν λιπιδικό περιεχόμενο περίπου 2.0% σε ιχθύες παγκάσιους (*Pangasianodon hyporhthalmus*), όταν αντίστοιχο για το ίδιο είδος κυμαίνεται σε μία ευρεία κλίμακα με τιμές μικρότερες από 2% έως και 20%, ανάλογα με τον τύπο της τροφής, την ηλικία, το μέγεθος των ατόμων κ.λπ.

Ο αντίκτυπος του γύρω περιβάλλοντος και των διατροφικών συνηθειών διαπιστώθηκε κατά την έρευνα που διεξήχθη από τους Bogdanović *et al.*, (2011) σε γόπες (*Boops boops*) από περιοχές της Αδριατικής Θάλασσας, πλησίον κλωβών ιχθυοκαλλιέργειας και περιοχές που δεν επηρεάζονται από αυτές, βάσει των διαφορών στο λιπιδικό περιεχόμενο που παρατηρήθηκε (>19% έναντι <2% αντιστοίχως). Οι Özogul *et al.*, (2007) ταξινόμησαν τη γόπα στους ιχθύες με χαμηλή περιεκτικότητα λιπιδίων (<3%). Οι τιμές που κυμάνθηκε το περιεχόμενο σε λιπίδια της γόπας κατά την παρούσα μελέτη ήταν μεταξύ 1.45% και 3.98%, δηλαδή εντός της βαθμίδας που την

κατατάσει στους μη λιπαρούς ιχθύες. Μερικές μελέτες έχουν αναφέρει υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια (έως 10.1%) στη γόπα, από τα άλλα είδη των Σπαριδών (FAO 1989). Ωστόσο, το ιδιαίτερα υψηλό περιεχόμενο σε λιπίδια που βρέθηκε για τα δείγματα πλησίων των κλωβών δεν είχε αναφερθεί προηγουμένως. Η απόκλιση μπορεί να αποδοθεί στην πρόσθετη διαθέσιμη τροφή γύρω από τους κλωβούς, αλλά και την προστασία που προσφέρει η απαγόρευση της αλίευσης 300 μέτρα γύρω από τις εγκαταστάσεις τους. Οι Ochrem *et al.*, (2015) μέτρησαν την περιεκτικότητα σε λιπίδια και διαπίστωσαν διαφορετικές τιμές στα διάφορα μέρη των ιχθύων, όπως 4.12% στο κεφάλι, 4.51% στην κοιλιά και 5.03% στην ουρά. Οι Fagan *et al.*, (2003) για να εξάγουν το λίπος, χρησιμοποίησαν ίσες ποσότητες μείγματος πετρελαϊκού αιθέρα και διαιθυλαιθέρα (500ml) που αναμείχθηκαν με 300g σάρκας ιχθύος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μόνο χλωροφόρμιο (250ml) για 100g σάρκας ιχθύος αντιστοίχως.

### 3.4.3. Λιπιδική Υδρόλυση

Ενώ ο σχηματισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) από μόνος του δεν οδηγεί σε απώλεια της διατροφικής αξίας, είναι σημαντική η εκτίμησή του όταν εξετάζεται η τάγγιση μέσω της ενζυμικής οδού. Ο δείκτης του περιεχομένου g FFA/100g λιπιδίων εκφράζει το βαθμό της υδρολυτικής τάγγισης από τη λιπόλυση. Οι Losada *et al.*, (2007) στη μελέτη τους πάνω στη σαρδέλα, προκειμένου να διασαφηνίσουν τα πιθανά οφέλη της προκαταρκτικής ψύξης στον έλεγχο της εξέλιξης της τάγγισης στο κατεψυγμένο προϊόν, παρατήρησαν προοδευτική αύξηση του σχηματισμού FFA, πράγμα που συμβάδιζε με προηγούμενες εργασίες, στις οποίες περιγράφονταν αξιοσημείωτοι ρυθμοί λιπιδικής υδρόλυσης σε διαφορετικά είδη ιχθύων κατά τη διάρκεια της



κατάψυξης (Aubourg *et al.*, 1998; Refsgaard *et al.*, 2000). Την ίδια παρατήρηση είχαν ήδη κάνει οι Simeonidou *et al.*, (1996) σε μελέτη πάνω σε ολόκληρους ιχθύες και φιλέτα γκριζοσαύριδου (*Trachurus trachurus*) και μεσογειακού βακαλάου (*Merluccius mediterraneus*). Οι Viji *et al.*, (2015) στη μελέτη των βιοχημικών μεταβολών κατά τη συντήρηση σε πάγο εκσπλαχνισμένων και μη εκσπλαχνισμένων ιχθύων παγκάσιους που καλλιεργούνται σε χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας, βρήκαν ότι και τα δύο δείγματα έδειξαν οριακή αύξηση στις τιμές FFA μέχρι την 16<sup>η</sup> ημέρα, η οποία ακολουθήθηκε από σημαντικά προοδευτική αύξηση, μέχρι το τέλος της περιόδου συντήρησης. Τον εκσπλαχνισμό ακολουθεί η έκπλυση η οποία μπορεί να μειώσει σημαντικά το μικροβιακό φορτίο στην περιοχή της κοιλιάς και συνεπώς να μειώσει την υδρόλυση των λιπιδίων από μικροβιακά ένζυμα. Υπάρχουν προηγούμενες αναφορές ότι ο εκσπλαχνισμός των ιχθύων προκαλεί χαμηλότερο βαθμό λιπιδικής υδρόλυσης (Lehmann and Aubourg, 2008; Erkan and Özden, 2008). Στην παρούσα μελέτη τα δείγματα της σαρδέλας έδειξαν την ίδια συμπεριφορά μέχρι την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 2°C, όπου από εκεί και πέρα η αύξηση ήταν ραγδαία μέχρι το τέλος της περιόδου συντήρησης. Κατά τη μελέτη της επίδρασης στις βιοχημικές αλλαγές, από την εμπότιση ολόκληρων ιχθύων σκουμπριού με ένα εμπορικό διάλυμα φυτικού εκχυλίσματος, οι Lugasi *et al.*, (2003) παρατήρησαν σταδιακή αύξηση των τιμών FFA, ενώ οι αρχικές τιμές στους νωπούς ιχθύες ήταν παρόμοιες με εκείνες των λιπαρών ειδών όπως ο τόνος και η σαρδέλα (Aubourg *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1995), αλλά χαμηλότερες από εκείνες των μη λιπαρών, όπως προσφυγάκι και μπακαλιάριος (Aubourg, 1999; Aubourg and Medina, 1999). Οι τιμές FFA των δειγμάτων της γόπας, ως μη λιπαρός ιχθύς, αν και υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων της σαρδέλας, κατά τις τέσσερις πρώτες ημέρες της παρούσας έρευνας, δεν μεταβλήθηκαν όπως στη σαρδέλα. Στην παρούσα μελέτη, το

περιεχόμενο FFA δεν εκφράστηκε ως g ελαϊκού οξέος/100g λιπιδίων, όπως συνηθίζεται στις περισσότερες μελέτες, αλλά ως βαθμός οξύτητας (ml NaOH 0.1N/100g λιπιδίων), όπου στην ουσία η βασική αρχή της μεθόδου προσδιορισμού είναι ίδια.

#### **3.4.4. Λιπιδική Οξείδωση**

Η αξιολόγηση της οξειδωτικής κατάστασης των λιπιδίων παραμένει ένα δύσκολο έργο, καθώς η διαδικασία είναι πολύπλοκη και σχηματίζονται διαφορετικές ενώσεις ανάλογα με το χρόνο, την έκταση της οξείδωσης και τον εμπλεκόμενο μηχανισμό. Όπως αναφέρεται από τους Eymard *et al.*, (2009) όχι μόνο η φύση και η σύνθεση των λιπιδίων ως υπόστρωμα της αντίδρασης έχουν αντίκτυπο στη διαδικασία οξείδωσης, αλλά και ο τύπος και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, των αντιοξειδωτικών και των προ-οξειδωτικών που υπάρχουν στο τροφικό σύμπλεγμα, καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Επομένως, η επιλογή μίας μόνο παραμέτρου για την ανάλυση της οξειδωτικής κατάστασης είναι μάλλον δύσκολη και συχνά είναι πιο βολικό να συνδυαστούν διαφορετικές μέθοδοι. Από την άλλη πλευρά, κάθε μέθοδος επιτρέπει μια σειρά διαφορετικών πειραματικών συνθηκών και μαζί με την έλλειψη ομοιομορφίας μεταξύ των εργαστηρίων, οδηγεί σε (επί του παρόντος αναπόφευκτα) ανόμοια αποτελέσματα. Τέλος, οι περισσότερες ενώσεις οξείδωσης είναι επιρρεπείς να υποβαθμιστούν περαιτέρω, γεγονός που προσδίδει μια πρόσθετη πηγή απόκλισης.

Ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων είναι η παραδοσιακή και πλέον χρησιμοποιούμενη παράμετρος για τη μέτρηση των πρωτογενών προϊόντων της οξειδωτικής τάγγισης. Από αυτόν τον αριθμό, παρακολουθηθείται το στάδιο διάδοσης

στην αλυσίδα του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών και η συσσώρευση των υδροϋπεροξειδίων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υπεροξειδίου σε λίπη και έλαια χρησιμοποιούν την αντιδραστικότητα του δεσμευμένου οξυγόνου με άλλες ενώσεις, όπως ιωδιούχο κάλιο ή  $Fe^{2+}$ . Αυτές οι μέθοδοι είναι γνωστές ως στατικές, επειδή περιγράφουν την κατάσταση των λιπιδίων στο παρόν στάδιο. Η πρότυπη μέθοδος που περιγράφηκε αρχικά από τους Lea (1931) και Wheeler (1932), βασίζεται στην αρχή της απελευθέρωσης ιωδίου από ιωδιούχο κάλιο, σε όξινο περιβάλλον. Παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, προερχόμενα κυρίως από την υψηλή ευαισθησία του ιωδίου στην οξείδωση παρουσία μοριακού οξυγόνου, η οποία επιταχύνεται από την έκθεση στο φως. Στο διάστημα πολλών ετών αναπτύχθηκαν διαφορετικές αναλυτικές διαδικασίες, οι οποίες αποδείχθηκαν ασύμφωνες και τα αποτελέσματά τους αναξιόπιστα. Πολλοί ερευνητές (Taffel and Revis, Olcott and Mattill κ.α.), μελετώντας τους παράγοντες που ελέγχουν την αντίδραση, μέχρι τώρα έχουν προτείνει αρκετές τροποποιήσεις για τη βελτίωση της ακρίβειας και της αξιοπιστίας των μεθόδων. Η έκταση της αντίδρασης εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες, την ποσότητα του δείγματος της λιπαρής ύλης, τη συγκέντρωση των υπεροξειδίων, το χρόνο αντίδρασης, τις δευτερογενείς αντιδράσεις κ.λπ. Οι Lowen *et al.*, (1937) έδειξαν ότι οι τιμές που του ΑΥ εξαρτώνται από την ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιείται. Στις έρευνές του, ο Seher (1958) παρατήρησε ότι ενώ η ποσότητα του δείγματος, η θερμοκρασία και ο χρόνος αντίδρασης δεν πρέπει να έχουν καμία επίδραση όταν οι μέθοδοι είναι τυποποιημένες, οι παράγοντες αυτοί είναι συχνά υπεύθυνοι για τις διαφορές στη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους. Αντί της ποσότητας του δείγματος, κρίσιμο παράγοντα αποτελεί η διαλυτότητα της λιπαρής ύλης. Αρκετά χρόνια αργότερα (2003), ο Hans-Jochen Fiebig σε σχετικό άρθρο του αναφέρεται στο πρόβλημα των

διαφόρων ποσοτήτων των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται κατά τις διάφορες τυποποιημένες μεθόδους, που πιθανόν είναι και ο λόγος των κακών ορίων αναπαραγωγικότητας στις διεργαστηριακές δοκιμές. Σύμφωνα με τον Stansby (1941) η ακρίβεια της μεθόδου στα ιχθυέλαια είναι συχνά φτωχή, τα τελικά σημεία είναι ασαφή και ο συσχετισμός μεταξύ του ΑΥ και της οργανοληπτικής τάγγισης είναι αβέβαιος. Οι υπεροξειδικές ενώσεις, μπορούν να είναι ανάλογες της τάγγισης μόνο εφόσον σχηματίζονται από τη νωπή λιπαρή ύλη με μεγαλύτερο ρυθμό από ό, τι αποσυντίθενται στην πλέον οξειδωμένη. Αν η λιπαρή ύλη έχει ήδη υποστεί βλάβη από την οξείδωση και έχουν ήδη σχηματιστεί υψηλότερα επίπεδα προϊόντων αποικοδόμησης, ο ρυθμός αποσύνθεσης των υδροϋπεροξειδίων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς χαμηλά επίπεδα αυτών των ενώσεων. Έτσι, εφ' όσον ο ρυθμός σχηματισμού τους υπερβαίνει σε ταχύτητα το ρυθμό αποσύνθεσής τους, ο ΑΥ αυξάνεται με την αύξηση της τάγγισης. Αντίστροφα, εάν ο ρυθμός αποσύνθεσης υπερβαίνει αυτόν του σχηματισμού, τότε ο ΑΥ μειώνεται με την αύξηση της τάγγισης. Συνεπώς, οι παράγοντες που επηρεάζουν αυτούς τους δύο ρυθμούς είναι σημαντικοί για τον προσδιορισμό του ΑΥ ως μέτρου εκτίμησης της τάγγισης και ένας τέτοιος παράγοντας είναι η θερμοκρασία συντήρησης αυτής της ύλης. Λόγω αυτού του χαρακτηριστικού, οι συνθήκες θερμοκρασίας κατά την ανάλυση πρέπει να ελέγχονται για να αποφευχθεί η αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίου, που σε αυτή την περίπτωση, ο ΑΥ δεν αποτελεί δείκτη για την πραγματική ποιότητα των δειγμάτων. Προκειμένου να αποφευχθεί η παρερμηνεία των αποτελεσμάτων, είναι απαραίτητη η γνώση του ιστορικού τους. Ωστόσο, ο ΑΥ είναι μια κατάλληλη παράμετρος για τη μέτρηση της υποβάθμισης της ποιότητας με την πάροδο του χρόνου. Μετά την περίοδο επαγωγής (Induction Period), κατά την οποία ο ΑΥ αυξάνεται αργά, μια απότομη αύξηση δείχνει ότι το λίπος έχει πάει άσχημα.

Στην παρούσα μελέτη για τον ΑΥ στα δείγματα της σαρδέλας, αποτυπώνεται η απότομη αύξηση (15.4-82.4meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων), χωρίς να μεσολαβεί η περίοδος επαγωγής, πράγμα που πιθανόν δείχνει ότι έχει ήδη ξεκινήσει η λιπιδική οξείδωση. Από την άλλη μεριά, για τα δείγματα της γόπας ο ΑΥ ξεκινά από συγκριτικά χαμηλό επίπεδο (2.4meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων) και συνεχίζει να ελαττώνεται σε ακόμη χαμηλότερο επίπεδο (0.1meq O<sub>2</sub>/Kg λιπιδίων), πράγμα που σημαίνει ότι ο ρυθμός αποσύνθεσης των υπεροξειδίων είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό σχηματισμού τους. Δυστυχώς, δεν κατέσται συνατή η συλλογή αρκετών πληροφοριών για τα επιλεχθέντα δείγματα ιχθύων, σχετικά με ακριβείς ημερομηνίες αλίευσης κ.λπ., ώστε να μπορούν να αξιολογηθούν τα συγκριτικά αποτελέσματα των μετρήσεων.

Μία περίπτωση αποτυχίας της συσχέτιση του ΑΥ με την τάγγιση δείχνει το αποτέλεσμα που λαμβάνεται για το λίπος στους παστούς ιχθύες. Αυτοί κανονικά αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες δωματίου και το λίπος τους μετά από αποθήκευση αρκετών μηνών καθίσταται εξαιρετικά ταγγισμένο. Ωστόσο, οι τιμές του αριθμού υπεροξειδίων δεν δείχνουν κανένα μέτρο τέτοιας τάγγισης. Εμφανίζουν μια μικρή αύξηση που ακολουθείται από μια πτώση στο μηδέν. Η εξ ολοκλήρου εμπειρική αυτή μέθοδος εξαρτάται έντονα από το σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και την τεχνική κατάρτηση του επιστημονικού προσωπικού, επειδή μπορεί να εμφανιστεί αυθόρμητος σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων, που οδηγεί σε υπερεκτίμηση ή μπορεί επίσης να υπάρξει απορρόφηση ιωδίου από ακόρεστα λιπαρά οξέα, που οδηγεί σε υποεκτίμηση (Robards *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 2011). Υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη σφαλμάτων για κάποιο χρονικό διάστημα, που οφείλονται σε λανθασμένη διαδικασία, σε ορισμένες περιπτώσεις λάθη που περιλαμβάνουν ασαφή τελικά σημεία ογκομέτρησης, ή/και κακό έλεγχο διπλών δειγμάτων. Για να βελτιωθεί η ευαισθησία της μεθόδου, είναι

δυνατόν να προσδιοριστεί το τελικό σημείο της ογκομέτρησης χρωματομετρικά ή ηλεκτροχημικά. Συνεπώς, για να επιτευχθούν συγκρίσιμα και αξιόπιστα αποτελέσματα, συνιστάται ιδιαίτερα να διατηρούνται με μεγάλη ακρίβεια οι συνθήκες της μεθόδου.

Υπάρχουν και άλλοι τρόποι μέτρησης του αριθμού υδροϋπεροξειδίων, εκτός από την τυποποιημένη ιωδιομετρική μέθοδο. Μία αρκετά ευαίσθητη μέθοδος είναι των Lips *et al.*, (1943) η οποία προσδιορίζει χρωματομετρικά τα υδροϋπεροξειδία ως θειοκυανικό σίδηρο μετά την οξείδωση του  $Fe^{2+}$  σε  $Fe^{3+}$ . Καθώς η μέθοδος είναι πολύ πιο ευαίσθητη από την τυπική ιωδιομετρική, είναι δυνατόν να μετρηθούν αρκετά μικρές ποσότητες ( $<10^{-2}$  mmol). Οι τιμές του ΑΥ είναι 1.5 έως 2 φορές υψηλότερες από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με την πρότυπη μέθοδο επειδή, σύμφωνα με τους Grosch και Barthel (1972), ένα mol υπεροξειδίων οξειδώνει τέσσερα moles  $Fe^{2+}$ , σε αντίθεση με δύο mol ιωδίου, στην περίπτωση της ιωδιομετρικής μεθόδου. Στη μελέτη τους οι Losada *et al.*, (2007) προσδιόρισαν τον ΑΥ στις σαρδέλες, σύμφωνα με τη μέθοδο των Chapman and McKay (1949). Εν συντομία, το ροζ-πορφυρού χρώματος άλας του θειοκυανικού σιδήρου μετρήθηκε με ανάγνωση της απορρόφησης του UV στα 500nm. Ένας προοδευτικός σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα, κατά τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης σε κατάψυξη. Επίσης, με την ίδια μέθοδο προσδιορίστηκε ο ΑΥ στον συντηρημένο σε ψύξη ασημένιο σολομό, από τους Aubourg *et al.*, (2003). Η ανάπτυξη της τάγγισης που παρατηρήθηκε ήταν βραδεία, οι τιμές που προσδιορίστηκαν δεν ξεπέρασαν τα 4.0meq  $O_2/Kg$  λιπιδίων, ενώ ήταν χαμηλότερες σε σύγκριση με άλλα είδη ψαριών, όπως η σαρδέλα (Nunes *et al.*, 1992), το προσφυγάκι (Aubourg *et al.*, 1998) και το καστανόψαρο (θαλασσομπράμα) του Ατλαντικού (Pérez-Alonso *et al.*, 2003), στις ίδιες συνθήκες συντήρησης. Οι Ochrem *et al.*, (2015) επίσης χρησιμοποίησαν τη φασματοφωτομετρική αυτή μέθοδο για να προσδιορίσουν την

οξειδωση των λιπιδίων σε φιλέτα, καθώς και σε αλεσμένο κρέας κυπρίνου κατά τη συντήρηση στους 4°C. Όπως αναφέρεται στη μελέτη τους, σύμφωνα και με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών (Aubourg and Medina, 1999; Pérez-Alonso *et al.*, 2003; Pezeshk *et al.*, 2011; Ježek and Buchtova, 2012) σε διαφορετικά είδη ιχθύων, διαπιστώθηκε σταδιακή αύξηση του ΑΥ, η οποία ακολουθήθηκε από αντίστοιχη μείωση κατά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Ο ρυθμός σχηματισμού των υδροϋπεροξειδίων είναι υψηλότερος από τον ρυθμό αποσύνθεσης, συνεπώς, η συσσώρευση στους ιστούς έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη τιμή ΑΥ. Όταν η συγκέντρωση είναι υψηλή, μετά την αποδόμηση σε μικρότερα μόρια, ο ΑΥ μειώνεται (Aubourg, 1999). Έχει αναφερθεί από τους Erkan and Özden, (2008) ότι στα λιπαρά ψάρια όπως η σαρδέλα, ο εκσπλαχνισμός αυξάνει τον ΑΥ κατά την συντήρηση στους 4°C. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, ο εκσπλαχνισμός εκθέτει το κρέας των ιχθύων σε περισσότερο οξυγόνο και επιταχύνει την οξειδωση. Ομοίως, οι Aranda *et al.*, (2006) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα φιλέτα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην οξειδωση. Ίσως ως αποτέλεσμα της άλεσης, το κρέας φαίνεται να χάνει τα φυσικά αντιοξειδωτικά, που ενδεχομένως εξηγεί το γιατί ο ΑΥ του αλεσμένου κρέατος ήταν υψηλότερος από αυτόν των φιλέτων, την πρώτη ημέρα συντήρησης. Σύμφωνα με τους Viji *et al.*, (2015) ο εκσπλαχνισμός μείωσε σημαντικά την παραγωγή πτητικών βάσεων και ελεύθερου αμινικού αζώτου, αντίθετως ενίσχυσε την ανάπτυξη των υπεροξειδίων κατά τη διάρκεια της συντήρησης του ταουκιού στους 4±2°C.

Σύμφωνα με τους Hornero-Méndez *et al.*, (2001) οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι με βάση την απορρόφηση ή την εκπομπή ακτινοβολίας στο υπεριώδες-ορατό, μαζί με άλλες που χρησιμοποιούν την ανίχνευση στην υπέρυθη περιοχή, εκτοπίζουν τις κλασικές ογκομετρικές μεθόδους όπως η ιωδιομετρική. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, με το

σηματισμό των υδροϋπεροξειδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα γενικά σταθεροποιείται η ριζική κατάσταση, από την αναδιάταξη των διπλών δεσμών, που προκαλεί συζευγμένα διένια. Οι σχετικά σταθερές αυτές ενώσεις απορροφούν στο UV(235nm) και αυτή η απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρικές τεχνικές, για την αξιολόγηση του επιπέδου οξειδωσης των λιπιδίων. Οι Aubourg *et al.*, (1997) με τη χρήση φασματοφωτόμετρου φθορισμού μέτρησαν την συγκέντρωση των φθοριζουσών ουσιών (συζευγμένα διένια), για την αξιολόγηση της οξειδωτικής ποιότητας των λιπιδίων σε σαρδέλες, κατά τη συντήρησή τους στους -18°C και στους -10°C. Τα συζευγμένα διένια έδειξαν κάποιες σημαντικές αλλαγές, αν και δεν κατέστη δυνατό να παρατηρηθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο κατά την συντήρηση στις δύο χαμηλές θερμοκρασίες. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το περιεχόμενο των συζευγμένων διενίων δεν ήταν κατάλληλο ως ποιοτικός δείκτης, επειδή αυτές οι ενώσεις είναι σχετικά ασταθείς και ικανές να αλληλεπιδράσουν με άλλα συστατικά. Έτσι, χρησιμοποίησαν έναν άλλο δείκτη, όπως είναι ο λόγος φθορισμού μεταξύ δύο μεγίστων διέγερσης/εκπομπής (393/463nm και 327/415nm), σε υδατικά και οργανικά εκχυλίσματα των λευκών μυών. Αργότερα, ο Aubourg, (2001) μελέτησε με τον ίδιο τρόπο φθορισμού την επίδραση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) στην οξειδωτική σταθερότητα των λιπιδίων σε αλιεύματα.

Η χρωματογραφία είναι μία από τις πιο ισχυρές τεχνικές που είναι διαθέσιμες για τον διαχωρισμό των μειγμάτων. Πρόκειται για ομάδα τεχνικών με βάση την αρχή του διαχωρισμού των συστατικών ενός μείγματος, ανάλογα με τη συγγένεια των διαλυμένων ουσιών, μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων. Περιλαμβάνει μια διαφορετική αλλά συναφή ομάδα μεθόδων που επιτρέπουν τον διαχωρισμό, την απομόνωση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών σε ένα δείγμα. Πρόσφατα,



η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των υδροϋπεροξειδίων. Αυτή η μεθοδολογία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και αρκετά ευέλικτη, λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιότητες της στήλης και του ανιχνευτή, ώστε να επιτρέπει την ανάλυση ενώσεων με διαφορετικά χαρακτηριστικά πτητικότητας, μοριακού βάρους ή πολικότητας. Επίσης, στο διαχωρισμό της HPLC έχουν προσαρμοσθεί μέθοδοι προσδιορισμού με τη μεσολάβηση της οξειδωσης του σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Μία άλλη ευαίσθητη μέθοδος, με το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης στον προσδιορισμό των υδροϋπεροξειδίων βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Είναι αυτή, όπου τα υδροϋπεροξειδία αντιδρούν με την λουμινόλη παρουσία του κυτοχρώματος C, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό φωτός (Matthäus *et al.*, 1994), που μετράται με φωτοπολλαπλασιαστή. Η μέθοδος είναι πολύ γρήγορη και εύκολη στο χειρισμό και μετά τη βαθμονόμηση, το ολοκλήρωμα της καμπύλης συσχετίζεται καλά με την πρότυπη ιωδιομετρική μέθοδο. Μία άμεση μέτρηση των υδροϋπεροξειδίων είναι δυνατή με πολαρογραφική ανάλυση (Lewis and Quackenbush, 1949; Willits *et al.*, 1953). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων σε ηλεκτρόδιο υδραργύρου, όπου η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων προκαλεί τη διάσπαση του δεσμού -O-O- και τον σχηματισμό ομάδας υδροξυλίου (Swern and Silbert, 1963). Τόσο η αυτοοξειδωση όσο και η φωτοοξειδωση δημιουργούν ταυτόσημα ή παρόμοια υδροϋπεροξειδία, που διαφέρουν μερικές φορές μόνο στη θέση και στη στερεοϊσομερεια. Αυτά, συχνά καταγράφονται ως συνολική παράμετρος χωρίς διαχωρισμό των διαφορετικών θέσεων ή ισομερών cis/trans, αλλά οι Tokita and Morita (1985), Kruse (1992) και Koskas *et al.*, (1983) περιγράφουν μεθόδους για τον προσδιορισμό μεμονωμένων υδροϋπεροξειδίων.

Ωστόσο, δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί μόνο ο αριθμός υπεροξειδίων για να κριθεί η κατάσταση των λιπιδίων, διότι ο προσδιορισμός του δεν δίνει ένα πραγματικό

μέτρο της οξειδωτικής αποικοδόμησης, αφού τα υδροϋπεροξειδία συνήθως υποβαθμίζονται περαιτέρω όταν εκτίθενται σε εκτεταμένες συνθήκες, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δευτερογενών προϊόντων. Η χημική σύνθεση και η ποσότητα των σχηματισμένων ενώσεων εξαρτάται πρωταρχικά από τη σύνθεση της λιπαρής ύλης αλλά και από τις πρακτικές επεξεργασίας, τις συνθήκες συντήρησης, τον τύπο και τη συγκέντρωση πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών/προ-οξειδωτικών που υπάρχουν στα τρόφιμα, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, άλλα υπάρχοντα συστατικά, κ.λπ. (Gray, 1978; Ladikos and Lougouois, 1990; Jacobsen, 1999). Οι περισσότερες από αυτές παράγουν ανεπιθύμητα οργανοληπτικά και βιολογικά αποτελέσματα, τα οποία προκαλούν τις αλλαγές στις ιδιότητες των τροφίμων. Ως εκτούτου, ο έλεγχός τους έχει μεγάλη σημασία. Μια μεγάλη ποικιλία μεθοδολογιών έχει αναπτυχθεί και εφαρμοστεί μέχρι τώρα, για το προσδιορισμό των προϊόντων δευτερογενούς οξείδωσης. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι αυτή του 2-θειοβαρβιτουρικού οξέως (TBA). Η παραδοσιακή φασματοφωτομετρική μέθοδος παρά τους περιορισμούς, όπως το υψηλό κόστος, τις παρεμβολές και τις τεχνικές της πειραματικής διαδικασίας που μπορεί να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση ή υποτίμηση των αποτελεσμάτων αντιστοίχως, χρησιμοποιείται ευρέως ως η πλέον ακριβής και ευαίσθητη παράμετρος στην αξιολόγηση της οξειδωτικής αλλοίωσης των λιπιδίων. Πολλοί ερευνητές, προκειμένου να μελετήσουν την εξέλιξη και τον έλεγχο της οξείδωσης των λιπιδίων σε διάφορα είδη ιχθύων, εφάρμοσαν τον προσδιορισμό των αλδεϋδικών προϊόντων (TBA), σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό άλλων παραμέτρων. Οι Aubourg *et al.*, (1997) οι Köse and Erdem (2003), οι Kilinc and Cakli (2004), οι Bogdanović *et al.*, (2011) οι Banani and Suchanda (2015) καθώς και πολλοί άλλοι, χρησιμοποίησαν ως δείκτες οξείδωσης τους FFA, PV, CD, TMA, TVB-N κ.λπ, κατά περίπτωση, οι οποίοι βρέθηκαν να είναι ακριβείς και με καλές

τιμές συσχέτισης μεταξύ τους. Επίσης παρατηρήθηκαν υψηλοί συσχετισμοί αυτών των δεικτών με το χρόνο συντήρησης και την οργανοληπτική αξιολόγηση. Σύμφωνα με τους Karaçam and Boran (1996), οι τιμές TBA μεγαλύτερες από 3-4mg MA/Kg υποδηλώνουν υποβάθμιση της ποιότητας, ενώ σύμφωνα με τους Nunes *et al.* (1992) τα επίπεδα του TBA μεταξύ 5 και 8 mg MA/Kg θεωρούνται γενικά το όριο της οργανοληπτικής αποδοχής των ιχθύων. Σύμφωνα με τον Connell (1990), το όριο αποδοχής του TBARS είναι 2mg MA/kg, πέρα από το οποίο οι ιχθύες αναπτύσσουν γενικά δυσάρεστη οσμή και γεύση.

#### **3.4.5. Μεταβολή του pH**

Η γνώση του pH μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την κατάσταση των ιχθύων. Το αρχικό μεταθανάτιο pH ποικίλλει ανάλογα με το είδος, τον τόπο και την εποχή αλίευσής τους (Huss, 1988). Το τυπικό pH σε μύες ζώντων ιχθύων είναι  $\approx 7.0$ , ενώ αμέσως μετά την αλίευση το γλυκογόνο στους μύες μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ και τότε αυτό μειώνεται περίπου σε 6.0-6.5. Οι ιχθύες είναι αποδεκτοί μέχρι το pH 6.8, ενώ το pH των αλλοιωμένων ιχθύων ανέρχεται πάνω από 7.0. Ωστόσο, ορισμένα είδη έχουν αλκαλική σάρκα λίγο μετά την αλίευση, κι επομένως τιμή του pH δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως ο μόνος δείκτης για τη φρεσκότητά τους (İnal, 1992).

Οι Köse and Erdem, το 2001 σε δείγματα ταουκιού και το 2004 σε δείγματα γαύρου βρήκαν ασυμφωνία στα αποτελέσματα των μετρήσεων των τιμών του pH, σε συσχέτιση με την οργανοληπτική αξιολόγηση. Οι Bogdanović *et al.*, (2011) παρατήρησαν διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών του pH και του ρυθμού άυξησής του σε

διαφορετικά δείγματα γόπας, που μπορεί να επηρεάστηκαν τόσο από το μέγεθος των ιχθύων, αφού οι μύες των μεγαλύτερων ατόμων τείνουν να εξισορροπήσουν σε χαμηλότερο μεταθανάτιο pH, όσο και από τη διαφορετική διατροφική κατάσταση αλλά και τη ρυθμιστική ικανότητα των μυϊκών συστατικών (γαλακτικό οξύ, φωσφορικές και αζωτούχες ενώσεις). Προηγούμενη μελέτη της γόπας, κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες αερόβιας συντήρησης, έδειξε την αύξηση των τιμών του pH λόγω της μείωσης του γαλακτικού οξέος και της αποαμίνωσης των αμινοξέων (Koutsoumanis and Nychas, 1999). Η αποσύνθεση των αζωτούχων ενώσεων είναι γνωστό ότι αυξάνει το pH της σάρκας των ιχθύων, που αποδίδεται στη συσσώρευση πτητικών βάσεων. Οι Viji *et al.*, (2015) δεν παρατήρησαν σημαντική διαφορά στη μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της συντήρησης του γατόψαρου σε πάγο. Η αρχική μείωσή του, η οποία παρατηρήθηκε την 5<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, μπορεί να οφείλεται στη συσσώρευση γαλακτικού οξέος από την αναερόβια γλυκόλυση και στην απελευθέρωση ανόργανων φωσφορικών από την αποικοδόμηση της ATP. Η μείωση του pH υποδηλώνει το στρες που αντιμετωπίζουν οι ιχθύες στη συγκομιδή τους. Όσο περισσότερο αντιδρούν, τόσο περισσότερο γαλακτικό οξύ παράγεται μεταθανάτια με αποτέλεσμα τη μείωση του pH. Η μετέπειτα αύξησή του κατά τη συντήρηση μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή αμινών και άλλων πτητικών βάσεων από την αυτολυτική και μικροβιακή δράση στις πρωτεΐνες και σε άλλες ενώσεις. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της μελέτης τους έδειξαν ότι το pH ήταν ένας κακός δείκτης αξιολόγησης της ποιότητας.

Στην παρούσα μελέτη, οι αρχικές τιμές του pH είναι ίδιες για τη σαρδέλα και τη γόπα αντιστοίχως (6.41, 6.44). Στα δείγματα της σαρδέλας, κατά τη δεύτερη μέτρηση παρατηρήθηκε μείωση του pH (6.34), η οποία στη συνέχεια ακολουθήθηκε από απότομη αύξηση. Αυτό, πιθανόν αποδίδεται σύμφωνα με την προηγούμενη παρατήρηση της

αρχικής συσσώρευσης και μετέπειτα μείωσης του γαλακτικού οξέως. Αντιθέτως, στα δείγματα της γόπας δεν παρατηρήθηκαν οι αντίστοιχες μεταβολές, παρά μία ελαφρά μείωση στην τελευταία μέτρηση του pH της τάξης του 0.04. Και τα δύο υπό εξέταση είδη κατέληξαν σχεδόν στην ίδια τιμή pH (7.03 και 7.00) αντιστοίχως. Αν και μέχρι το τέλος της περιόδου συντήρησης στους 2°C τα δείγματα δεν ξεπέρασαν την οριακή περιοχή της τιμής του 7.0, ενώ η απόκριση των τιμών του pH συνέβει, σύμφωνα με την αναμενόμενη καμπύλη μεταβολής, ωστόσο, ο δείκτης του pH κρίθηκε ακατάλληλος για την αξιολόγηση της ποιοτικής κατάστασης των ιχθύων.

Από την άλλη μεριά, το αντικείμενο της βιβλιογραφικής μελέτης των Abbas *et al.*, (2008) υπήρξε η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας με επίκεντρο το pH ως ένας απλός και αξιόπιστος δείκτης φρεσκότητας για τα συντηρημένα σε ψυχρές συνθήκες δείγματα ιχθύων. Βάσει αυτής της μελέτης, τα ευρήματα πολλών ερευνητών αποκαλύπτουν μία αξιοσημείωτη συσχέτιση μεταξύ του pH και της φρεσκότητας των ιχθύων, που πρότειναν ότι αυτότο φυσικό χαρακτηριστικό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλο εργαλείο για την ανάλυση και την αξιολόγηση της ποιοτικής κατάστασής τους αντί της μεθόδου της οργανοληπτικής αξιολόγησης, η οποία εμπεριέχει πολλές αβεβαιότητες.

#### **3.4.6. Οργανοληπτικά αποτελέσματα και χρόνος ζωής**

Οι ενώσεις που παράγονται κατά τη διαδικασία της αλλοίωσης των ιχθύων σχετίζονται με βιολογικές και φυσικοχημικές μεταβολές, αλλά κυρίως με ανεπιθύμητες οργανοληπτικές επιδράσεις. Η ανάπτυξη των δυσάρεστων οσμών είναι ένα από τα σημαντικότερα αποτελέσματα της οξειδωσης λιπιδίων (Flick, Hong, & Knobl, 1992). Η

συσχέτιση μεταξύ της οργανοληπτικής αξιολόγησης και ενός μόνο βιοχημικού δείκτη, καθιστά δύσκολη την εκτίμηση της ποιοτικής κατάστασης των ιχθύων.

Οι Fagan *et al.*, (2003) αναφέρουν ότι τα επίπεδα των τιμών FFA και PV στους ιχθύες που εξέτασαν, βρέθηκαν χαμηλά σε σημείο που η επίδρασή τους στα δείγματα ήταν αδύνατη να γίνει αντιληπτή αισθητηριακά. Αυτό, επιβεβαιώθηκε από την αποτύπωση των αποτελεσμάτων του πάνελ αξιολόγησης, όπου δεν αναφέρθηκαν ποτέ ξεχωριστά η οσμή ή/και η γεύση τάγγισης. Οι Scott *et al.*, (1992) παρατήρησαν ότι εξαιτίας της χαμηλής λιποπεριεκτικότητας του χριστόψαρου ή σανπιέρου (*Pseudocyttus maculatus*), οι τιμές του TBA δεν άλλαξαν κατά τη διάρκεια των 18 ημερών συντήρησής του σε πάγο. Διαπίστωσαν δε, ότι οι οσμές ή οι γεύσεις τάγγισης παρατηρήθηκαν από <10% του οργανοληπτικού πάνελ, μετά από 15 ημέρες συντήρησης σε πάγο.

Στην παρούσα μελέτη, η οργανοληπτική αξιολόγηση υποστήριξε τις ευρεθείσες τιμές στις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές παραμέτρους και για τα δύο εξεταζόμενα είδη και ως εκ τούτου συμφώνησε με την παρατήρηση ότι η αερόβια συντήρηση σε θερμοκρασία 2°C καθιστά τους ιχθύες πιο επιρρεπείς στην προοδευτική αλλοίωση, η οποία έγινε εμφανής με την ανάπτυξη κακοσμίας και γλοιώδους μαλακής σάρκας. Σύμφωνα με το τελευταίο, τα δείγματα και των δύο ιχθύων ήταν αποδεκτά για τέσσερις (4) ημέρες.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το συνολικό μικροβιακό φορτίο στα δείγματα της σαρδέλας, αναπτύχθηκε ταχύτερα από ότι στα δείγματα της γόπας. Αν και καταμετρήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα με την έναρξη του πειράματος, κατέληξε στα ίδια επίπεδα με αυτά της γόπας, με τη λήξη του. Και για τη σαρδέλα αλλά και για τη γόπα φαίνεται ότι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί είναι τα θειοαναγωγικά βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*) και οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*), από τους οποίους επικρατέστεροι είναι οι πρώτοι. Τα καθαρά ύδατα αλίευσης αυτών των ειδών ή ακόμη και οι σωστές πρακτικές χειρισμού τους μέχρι την κατανάλωση, φαίνονται από τα χαμηλά έως και μηδενικά επίπεδα μόλυνσης από τα *Enterobacteriaceae*.

Η σαρδέλα ανήκει στους ιχθύες με υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο, του οποίου οι τιμές κυμάνθηκαν στα πλαίσια που δικαίως την κατατάσσουν ως λιπαρό είδος (4.71% έως 11.52%), ενώ η γόπα ανήκει στους ιχθύες με χαμηλό λιπιδικό περιεχόμενο, που οι αντίστοιχες τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 1.45% και 3.98%, δηλαδή κατατάσσεται στα μη λιπαρά είδη ιχθύων. Από τη μία μεριά, για τα δείγματα της σαρδέλας, σχετικά με την υδρόλυση και την οξείδωση των λιπιδίων, φαίνεται η αποτύπωση των θεωρητικών μοντέλων της τάγισής τους. Από το περιεχόμενο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, κατά τον προσδιορισμό του βαθμού οξύτητας, διακρίνεται η φάσης σταθερότητας από τη φάση

οξειδωσης, όπως εξελίσσεται μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Όσο για την οξείδωση στα εν λόγω δείγματα, αυτή αποτυπώνεται με ραγδαία αύξηση του αριθμού υπεροξειδίων, χωρίς να μεσολαβεί η περίοδος επαγωγής. Από την άλλη μεριά, για τα δείγματα της γόπας διαπιστώνεται ήπια και συγκριτικά μικρή μεταβολή στο περιεχόμενο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ αν και σχετικά χαμηλός ο αριθμός υπεροξειδίων εμφανίζει διαρκή μείωση. Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι ο ρυθμός σχηματισμού των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης είναι μεγαλύτερος για τα δείγματα της σαρδέλας, όταν ο ρυθμός αποσύνθεσής τους είναι μεγαλύτερος για τα δείγματα της γόπας, στις συνθήκες συντήρησης στους 2°C. Με αυτόν τον τρόπο πιθανό να επαληθεύεται ο ενδεικτικός κανόνας, κατά τον οποίο η οξείδωση που συμβαίνει σε έναν λιπαρό ιχθύ να είναι εντονότερη από ότι σε έναν λιγότερο ή μη λιπαρό όπως η γόπα.

Τέλος, όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνονται με τον οργανοληπτικό έλεγχο, όπου ήδη μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα διαπιστώνονται οι υψηλότερες τιμές των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών παραμέτρων και επέρχεται η απόρριψη των ιχθύων λόγω προχωρημένης αλλοίωσης των ποιοτικών χαρακτηριστικών τους.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

**Abbas K.A., Mohamed A., Jamilah B., Ebrahimian M.,** A Review on Correlations between Fish Freshness and pH during Cold Storage, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4 (4): 416-421, (2008)

**Ababouch L.H., Souibri L., Rhaliby K., Ouahdi O., Battal M., Busta F.F.,** Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature, (1996)

**Ackman R.G.,** Nutritional composition of fats in seafoods *Progress in food & nutrition science* 13 (3-4): 161-289, (1989)

**Ashie I.N.A., Smith J.P., Simpson B.K., Haard Norman F.,** Spoilage and Shelf-Life Extension of Fresh Fish and Shellfish, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (1&2): 87-121 (1996)

**Aubourg S.P.,** Fluorescence study of the prooxidant activity of free fatty acids on marine lipids, *J.S. of Food and Agriculture* 81: 385-390, (2001)

**Aubourg S.P., Sotelo C.G., Pérez-Martín R.,** Assessment of Quality Changes in Frozen Sardine (*Sardina pilchardus*) by Fluorescence Detection, (1997)

**Aubourg S.P., Vinagre J., Rodríguez A., Losada V., Larraín M.A., Quitral V., Gómez J., Maier L., Wittig E.,** Rancidity development during the chilled storage of farmed Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*), 2003

**Azarbad M.H., Jelen H.H.,** Determination of Hexanal - An Indicator of Lipid Oxidation by Static Headspace Gas Chromatography (SHS-GC) in Fat-Rich Food Matrices, *Food Analytical Methods* 8 (7), (2015)

- Banani De, Suchanda Chatterjee**, Impact of assorted spices on lipid quality alteration of refrigerated, *International Food Research Journal* 22 (1): 304-310, (2015)
- Bahar Tokur, Koray Korkmaz, Deniz Ayas**, Comparison of 2-Thiobarbituric Acid (TBA) Method for Monitoring Lipid Oxidation in Fish, (2006)
- Bandarra N.M., Batista I., Nunes M.L., Empis J.M., Christie W.W.**, Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*), (1997)
- Blanca Barriuso B., Astiasarán I., Ansorena D.**, Measuring lipid oxidation status in foods: A challenging task
- Barthel G., Grosch W.**, Peroxide value determination - Comparison of some methods *Journal of the American Oil Chemists Society* 51 (12): 540-544, (1974)
- Bogdanović T., Šimat V., Frka-Roić A. and Marković K.**, Development and Application of Quality Index Method Scheme in a Shelf-Life Study of Wild and Fish Farm Affected Bogue (*Boops boops, L.*), (2011)
- Chapman R., McKay J.**, The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method, *J Am Oil Chem Soc.* 26: 360-363, (1949)
- Choe E., Min D.**, Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods, *Crit. Rev. Food Sci Nutr* 46 (1): 1-22, (2006)
- Chytiri S., Chouliara I., Savvaidis I.N., Kontominas M.G.**, Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout, (2003)
- Dalgaard P., Gram L., Huss H.H.**, Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 283-294, (1993)
- De Leonardis A., Macciola V.**, A study on the lipid fraction of Adriatic sardine filets (*Sardina pilchardus*), 48 (3): 209-12, (2004)
- El Otmani F., Assobhei O., Revol-Junelles AM., Millière JB.**, Microflora of fresh and ice-stored sardines (*Sardina pilchardus*) from the Moroccan Atlantic coast, (2004)
- Erkan N., Özden Ö.**, Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice, *International Journal of Food Science and Technology* 43 (2007): 1549-1559
- Eymard S., Baron C.P., Jacobsen C.**, Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chem* 114 (1): 57-65, (2009)

- Fagan J.D., Gormley T.R., Mhuirheartaigh M.U.**, Effect of freeze-chilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions, (2002)
- FAO, WHO** (Codex Alimentarius Commission), Standard for Fish Oils CXS 329-2017
- Fiebig H.J.**, Peroxide value determination, Vol. 14 (10): 651, (2003)
- Ghaly A.E., Dave D., Budge S., Brooks M.S.**, Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques, (2010)
- Gill C.O., Newton K.G.**, The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures, J. Appl. Bacteriol. 43: 189-195, (1977)
- Gill C.O., Penney N.**, Penetration of bacteria into meat. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1284-1286, (1977)
- Gram L., Webell-Neergaard C., Huss H.**, Bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates nilotocus*), I. J. Food Microbiol. 10: 303-316, (1990)
- Gram L., Melchiorson J.**, Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas sp.* and *S. putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue, J. Appl. Bacteriol. 80: 89-95, (1996)
- Guzmán-Chozas M., Vicario-Romero I.M., Guillén-Sans Remedios**, 2-thiobarbituric acid test for lipid oxidation in food: Synthesis and spectroscopic study of 2-thiobarbituric acid-malonaldehyde adduct, (1998)
- Hermes-Lima Marcelo**, Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals, Functional Metabolism: Regulation and Adaptation, (2004)
- Hornero-Méndez D., Pérez-Gálvez A., Mínguez-Mosquera M.I.**, A Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Peroxide Value in Food Lipids with High Carotenoid Content, (2001)
- Johnson D.**, Understanding the impact of oxygen concentration and active packaging on controlling lipid oxidation in oil-in-water emulsions, (2017)
- Karaçam H., Boran M.**, Quality changes in frozen whole and gutted anchovies during storage at -18°C, International Journal of Food Science and Technology 31: 527-531, (1996)
- Kilinc B., Cakli S.**, The determination of the shelf-life of pasteurized and non-pasteurized sardine (*Sardina pilchardus*) marinades stored at 4°C, (2004)
- Köse S., Erdem M.E.**, Quality changes of Whiting (*Merlangius merlangus euxinus*, N. 1840) stored at ambient and refrigerated temperatures, (2001)

- Köse S., Erdem M.E.,** An investigation of quality changes in anchovy (*Engraulis encrasicolus*, L.1758) stored at different temperatures, (2004)
- Koutsoumanis K., Nychas E.G.J.,** Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean Bogue (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C, (1998)
- Kyranas V.R., Lougouios V.P.,** Sensory, chemical and microbiological assessment of farm raised European sea-bass (*Dicentrarchus Labrax*) stored in melting ice, *Int. J. Food Sci. Technol* 37: 319-328, (2002)
- Kyranas V.R., Lougouios V.P., Valsamis D.S.,** Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 32: 339-347, (1997)
- Lea C.H.,** Methods for determining peroxide in lipids, (1952)
- Lemon D.W.,** An improved TBA test for rancidity, *Fisheries and Oceans, New Series Circular Nr. 51: 1-4*, (1975)
- Lips A., Chapman R.A., McFarlane W.D.,** The application of the ferric thiocyanate method to the determination of incipient rancidity in fats and oils, *Volume 20, Issue 11, pp 240-243*, (1943)
- Losada V., Barros-Velázquez J., Aubourg S.P.,** Rancidity development in frozen pelagic fish: Influence of slurry ice as preliminary chilling treatment, (2007)
- Lugasi A., Losada V., Hóvári J., Lebovics V., Jakóczy I., Aubourg S.,** Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage
- Matthäus B., Wiezorek C., Eichner K.,** Eine schnelle Chemilumineszenzmethode zum Nachweis oxidiertes Lipide (A fast chemiluminescent method for detecting oxidized lipids), (1994)
- Matthäus B.,** Oxidation of edible oils in *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications: Management in Different Industry Sectors*, (2010)
- Min D., Boff J.,** Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods, *Comprehensive reviews in food science and food safety* 1(2):58-72, (2002)
- Mokrani D., Bendeddouche B., Oumouna M.,** Correlation between the sensory and chemical quality indicators used for assessing the freshness of the sardine (*Sardina pilchardus*), (2012)
- Nunes M.L., Cardinal M., Mendes R., Mor'ao-Campos R., Bandarra N.M., Lourenco H.,** Effect of season and storage on proteins and lipids of

sardine (*Sardine pilchardus*) Minces and Surimi, Quality assurance in the fish industry: 73–81, (1992)

**Nwaigwe U., Okpara M.,** Fish preservation and processing, (2017)

**Ochrem A.S., Żychlińska-Buczek J., Zapletal P.,** Carp (*Cyprinus carpio L.*) lipid oxidation during cold storage, 2015

**Özogul Y., Özogul F.,** Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas, (2005)

**Parlapani F.F., Haroutounian A.S., Nychas E.G.J., Boziaris S.I.,** 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, (2015)

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

**Ringø E., Stenberg E., Strøm A.R.,** Amino acids and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens*, Appl. Environ. Microbiol. 47:1084-1089, (1984)

**Salih A.M., Smith D.M., Price J.F., Dawson L.E.,** Modified Extraction 2-Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Oxidation in Poultry, (1987)

**Scott D.N., Fletcher G.C., Charles, J.C., Wong R.J.,** Spoilage changes in deep water fish, smooth oreo dory during storage in ice, International Journal of Food Science and Technology, 27 (5): 577-588, (1992)

**Scott J.H., Nealson K.H.,** A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*, J. Bacteriol. 176 (1994): 3408-3411

**Simeonidou S., Govaris A., Vareltzis K.,** Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and mediterranean hake (*Merluccius mediterraneus*), (1996)

**Stansby Maurice,** Determination of Peroxide Values for Rancidity in Fish Oils, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13 (9): 627–631, (1941)

**Sun Y., Wang W., Chen H., Li C.,** Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsion, Crit. Rev. Food Sci Nutr 51(5): 453-466, (2011)

**Viji P., Tanuja S., Ninan G., Lalitha K.V., Zynudheen A.A., Binsi P.K., Srinivasagopal T.K.,** Biochemical, textural, microbiological and sensory

attributes of gutted and ungutted sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) stored in ice, Journal of Food Science and Technology-Mysor, (2014)

**Yoshida H., Kondo I., Kajimoto G.**, Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating (Prooxidant activity by fatty acids in purified oil), JAOCS 69: 1136-1140, (1992)

## 5.2 Ελληνική βιβλιογραφία

**Βέρδος Γ.**, Μικροβιακή αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής, απεντερωμένων εκτρεφόμενων ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) κατά τη συντήρηση υπό ψύξη, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2014)

**Γιαβάσης Ι.**, Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Θεσσαλίας, Τμήμα Διατροφής-Διαιτολογίας, (2012)

**Ζουμπουλα Ν.**, Μικροβιολογικές και οργανοληπτικές μεταβολές και χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά την συντήρηση της νωπής τσιπούρας, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2010)

**Κακάσης Σ.**, Αξιολόγηση θρεπτικών υλικών για την καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών σε νωπούς ιχθύες, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2011)

**Καρακολτσίδης Παύλος**, Τεχνολογία Ψαριών ΙΙ, ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Τεχνολογίας Ψαριών

**Καρακολτσίδης Παύλος**, Εργαστηριακές Ασκήσεις Ψαριών ΙΙ, ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Τεχνολογίας Ψαριών

**Κουτσουμανής Κ.**, Μικροβιακή αλλοίωση των ιχθυηρών και πρόβλεψη της διάρκειας ζωής, Γ.Π.Α., Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & βιοτεχνολογίας τροφίμων, (2000)

**Μανούρας Α.**, Χημεία Τροφίμων, Ενότητα #4: Λίπη-Ελαια, ΤΕΙ Θεσσαλίας, Έκδοση: 1.0., (2014)

**Μλαδενη Σ.**, Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*, L.) κατά την αποθήκευσή τους σε υπερψύξη, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2017)

- Μπρατσιάκος Β.Δ.**, Προσδιορισμός της ποιότητας νωπών αλιευμάτων μέσω εργαστηριακών μεθόδων, ΤΕΙ Πελοποννήσου, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, (2016)
- Μορφής Γρηγόρης**, Αξιολόγηση των *in vitro* καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων της σαρδέλας (*Sardina pilchardus*) και επίδραση της θερμικής κατεργασίας, Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Χημείας, (2014)
- Μπεζιρτζόγλου Ε**, Η αλλοίωση των Τροφίμων και η μικροβιολογία τους, Μικροβιολογία των ψαριών και άλλων θαλασσινών, Δ.Π.Θράκης
- Μποζιάρης Ιωάννης**, Τεχνολογία Μεταποίησης Αλιευμάτων, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2017)
- Μπουρτζής Κ.**, Εργαστηριακές Ασκήσεις Μικροβιολογίας, Π. Πατρών, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
- Μυλωνάκη Μ.**, Κατανάλωση του ψαριού τα τελευταία 20 χρόνια στον Ελλαδικό χώρο και πώς αυτή σχετίζεται με το κόστος, τις διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων και με την υγεία μας, Χ.Π., Τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, (2007)
- Πιτσούλη Ε.**, Επίδραση του τρόπου θανάτωσης των ιχθύων στις φυσικοχημικές μεταβολές και στο μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης κατά τη συντήρησή τους υπό διάφορες συνθήκες, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2009)
- Πλαστήρας Μ.**, Μικροβιολογική ποιότητα και ασφάλεια καρκινοειδών (Microbiological quality and safety of crustaceans), Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2016)
- Πλέσσας Σ.**, Ανάλυση Λιπών & ελαίων σε τρόφιμα, Δ.Π. Θράκης, Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης, Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας & Υγιεινής
- Σακελλαρίου Α.**, Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*) κατά την αποθήκευσή τους σε υπέρψυξη, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2017)
- Σταματόπουλος Β.**, Η λιπιδική οξείδωση στα τρόφιμα, ΤΕΙ Αθήνας, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, (2015)
- Τσιγάρας Ε.**, Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά την διεργασία οξίνισης και συντήρησης μαρινάτου γαύρου, Π.Θ., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, (2012)

**Χατζηκυριακίδου Κ.**, Μελέτη της επίδρασης συνδυασμένων επεξεργασιών στην κινητική της υποβάθμισης της ποιότητας των αλιευμάτων, Α.Π.Θ., Γεωπονική Σχολή, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, (2010)

**ΦΕΚ Β'/475/27-3-2015** (ΥΑ1750/32219-19-3-2015) Συμπληρωματικά μέτρα εφαρμογής των Ενωσιακών διατάξεων της Κοινής Οργάνωσης Αγοράς (ΚΟΑ) των προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας και του Κοινοτικού Συστήματος Ελέγχου της αλιείας σχετικά με τη διακίνηση και την εμπορία των προϊόντων του τομέα.

**Ψανη Ε.**, Αξιολόγηση των οργανοληπτικών και των *in vitro* καρδιοπροστατευτικών χαρακτηριστικών της σαρδέλας (*Sardina pilchardus*): επίδραση του ψησίματος με grill και του παστώματος, Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Χημείας, (2012)

### 5.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

<https://eur-lex.europa.eu/>

<http://www.alieia.minagric.gr/>

<http://www.moa.gov.cy/vs>

[https://www.google.gr/search?biw=1280&bih=608&ei=OzFnXOWyMqyIrwTt9beICQ&q=sardina+pilchardus&oq=sardina+&gs\\_l=psy-ab.1.0.0j0i1017j0l2.70374.73606..75562...0.0..0.147.1076.0j8.....0....1..gws-wiz.....0i67.k7XxRasH474](https://www.google.gr/search?biw=1280&bih=608&ei=OzFnXOWyMqyIrwTt9beICQ&q=sardina+pilchardus&oq=sardina+&gs_l=psy-ab.1.0.0j0i1017j0l2.70374.73606..75562...0.0..0.147.1076.0j8.....0....1..gws-wiz.....0i67.k7XxRasH474)

[https://www.google.gr/search?q=boops+boops&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwj60pGj2b7gAhUtw4sKHaVdDBMQ\\_AUICSgA&biw=1280&bih=608&dpr=1.25](https://www.google.gr/search?q=boops+boops&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwj60pGj2b7gAhUtw4sKHaVdDBMQ_AUICSgA&biw=1280&bih=608&dpr=1.25)