

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



«ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

**Μικροβιακή αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων τσιπούρας
σε συσκευασία skinpack**

(Microbiological spoilage and shelf-life of skinpack seabream fillets)

ΜΛΑΔΕΝΗ ΣΟΦΙΑ

ΒΟΛΟΣ, 2020

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή

1. **Ιωάννης Μποζιάρης**, Καθηγητής, ‘Υγιεινή και Συντήρησης Ιχθυηρών’, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**
2. **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Καθηγήτρια ‘Υδατοκαλλιέργεια’ Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**
3. **Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη**, διδάσκων ΠΔ 407/80, εκλεγμένη Επίκουρος Καθηγήτρια, ‘Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα αλιευτικών προϊόντων-Τροφίμων’, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής μελέτης, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Κ. Ιωάννη Μποζιάρη, Καθηγητή, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, τόσο για την ανάθεση της πτυχιακής μελέτης, όσο και για την επίβλεψη και τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά την συγγραφή της, στοιχεία απαραίτητα για την περαίωση της.

Επίσης, θερμά ευχαριστώ το δεύτερο μέλος την Κα Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, που δέχθηκε να συμμετάσχει στην εξεταστική επιτροπή και να αξιολογήσει την πτυχιακή μου μελέτη.

Θερμά ευχαριστώ και την Κα Παρλαπάνη Φωτεινή για τη συμβολή της στην επεξήγηση των πειραματικών μου αποτελεσμάτων. Τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω επίσης και στην Φαίδρα Συροπούλου και τον Στέφανο Κακάση υποψήφιους διδάκτορες του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» στην οικογένειά μου που αποδέχθηκαν όλες τις επιλογές μου και μου παρείχαν στήριξη όλο αυτό το διάστημα, χωρίς την οποία τίποτα από όσα έχω καταφέρει μέχρι σήμερα δε θα ήταν πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νωπά ψάρια χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα ευαλλοίωτα. Η αλλοίωση αυτή οφείλεται κυρίως στη μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Η δράση των ανωτέρω μικροοργανισμών συντελεί ώστε μεγάλος μέρος των αλιευμάτων να μετατρέπονται σε προϊόντα ακατάλληλα προς κατανάλωση λόγω της δυσάρεστης οσμής και γεύσης τους. Για την αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων αυτών και την προστασία τους από μικροβιακές αλλοιώσεις σήμερα χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι επεξεργασίας αλλά και συσκευασίας όπως η τροποποιημένη ατμόσφαιρα και η συσκευασία υπό κενό. Πιο συγκεκριμένα, όταν ένας ιχθύς αποθηκεύεται σε τέτοιου τύπου συσκευασίες σε συνδυασμό με αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία, τόσο οι ενζυμικές/ χημικές αντιδράσεις όσο και η μικροβιακή ανάπτυξη, επιβραδύνονται. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, το πεδίο έρευνας επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση των μεθόδων συντήρησης σε θερμοκρασίας συντήρησης 4°C, ως τεχνική συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας σε συνδυασμό με τη τεχνική της συσκευασίας υπό κενό. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η αξιολόγηση του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων τσιπούρας που διατηρήθηκαν σε συνθήκες κενού με συσκευασία skinpack υπό ψύξη και η ταυτοποίηση των επικρατέστερων πιθανόν αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με μοριακή ανάλυση. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε ο βαθμός επίδρασης των συνθηκών αποθήκευσης και συσκευασίας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων τσιπούρας καθώς και στο pH. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας που διατηρήθηκαν σε συνθήκες Skinpack υπό ψύξη και ο χρόνος ζωής ήταν 8 ημέρες στους 4°C.

Λέξεις κλειδιά: μικροβιολογική αλλοίωση, τσιπούρα, συσκευασία υπό κενό

ABSTRACT

Fresh fish are characterized as particularly vulnerable. This alteration is mainly due to the metabolic activity of allopathic microorganisms. The action of the above microorganisms contributes to a large part of the catches being converted into products unfit for consumption due to their unpleasant odor and taste. To increase the shelf life of these products and protect them from microbial alterations, various processing and packaging methods are used today, such as the modified atmosphere and vacuum packaging. More specifically, when a fish is stored in such packages in combination with low temperature storage, both enzymatic/ chemical reactions and microbial growth are slowed down. In the present dissertation, the field of research focused on the evaluation of preservation methods at normal maintenance temperature [4°C], as a technique for preserving sea bream fillets in combination with the vacuum packaging technique. The purpose of this master's thesis was to evaluate the commercial lifespan of sea bream fillets kept under refrigerated skinpack conditions and to identify the most likely potentially harmful microorganisms by molecular analysis. In addition, the degree of influence of storage and packaging conditions on the organoleptic characteristics of sea bream fillets as well as on the pH was examined. The results of the study showed that lactic acid bacteria were the predominant microorganisms during the preservation of sea bream fillets kept under refrigerated and skinpack conditions with a shelf life of 8 days at 4°C.

Keywords: microbiological spoilage, sea bream, vacuum packaging

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Αλλοίωση ιχθύων	10
1.2 Αρχική μικροχλωρίδα ιχθύων	11
1.2.1 Αλλοιωγόννοι μικροοργανισμοί	12
1.2.2 Η έννοια των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών	15
1.3 Χρόνος εμπορικής ζωής ιχθυρών	17
1.4 Συντήρηση ιχθύων	19
1.4.1 Συντήρηση σε συσκευασία MAP	19
1.4.2 Συσκευασία υπό κενό (Εισαγωγή)	20
1.4.3. Χαρακτηριστικά και φύση της συσκευασίας των ιχθυηρών υπό κενό αέρα.....	21
1.4.4 Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων αποθηκευμένων υπό χαμηλές θερμοκρασίες και συσκευασμένα υπό κενό αέρα.....	25
1.4.5 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών- PCR	30
1.5 Η σημασία της τσιπούρας για τις υδατοκαλλιέργειες	31
1.6 Σκοπός παρούσας εργασίας	33
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	34
2.2Μικροβιολογική ανάλυση.....	34
2.2.1 Μικροβιολογικά υλικά	34
2.2.1.1 TSA, ολική μικροβιακή χλωρίδα	35
2.2.1.2 CFC, <i>Pseudomonas spp.</i>	35

2.2.1.3 VRBGA, Enterobacteriaceae	36
2.2.1.4 ΙΑ, βακτήρια που παράγουν υδρόθειο	37
2.2.1.5 MRS Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)	39
2.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	40
2.3 Τεχνική επίστρωσης τρυβλίων.....	41
2.3.1 Τεχνική της επιφανειακής Επίστρωσης (spread plate).....	41
2.3.2 Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plate technique)	41
2.3.3. Επόαση δειγμάτων	42
2.4 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με μοριακή ανάλυση.....	42
2.5 Μέτρηση pH	44
2.6 Οργανοληπτική ανάλυση	45
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
3.1 Μικροβιολογική αξιολόγηση.....	46
3.2 Οργανοληπτικές μεταβολές	48
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	58
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
Ελληνική Βιβλιογραφία	59
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	59
Ιστότοποι.....	65

Περιεχόμενα Γραφημάτων

<i>Γράφημα 1.1: Γενική περιγραφή της αλλοίωσης των ιχθυηρών (προσαρμογή από Dalgaard, 2003).</i>	15
<i>Εικόνα 1.2: Διάρθρωση της ευρωπαϊκής ιχθυοκαλλιέργειας (ΣΕΘ 2019).</i>	32
<i>Εικόνα 1.3: Η εξέλιξη της παραγωγής ανά χώρα από το 2000 έως σήμερα (ΣΕΘ, 2019).</i>	33
<i>Γράφημα 2.1: Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος.</i>	41
<i>Γράφημα 3.1: Χρονική μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού ανά θρεπτικό υπόστρωμα σε συνάρτηση με τη διάρκεια συντήρησης στους 4οC. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος 4 μετρήσεων και οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.</i>	46
<i>Γράφημα 3.2: Χρονική μεταβολή του pH σε συνάρτηση με τη διάρκεια συντήρησης στους 4οC. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος 4 μετρήσεων.</i>	47
<i>Γράφημα 3.3: Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της οσμής φιλέτων τσιπούρας κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (4οC). Το κάθε σημείο είναι η μέση εκτίμηση από 5 δοκιμαστές.</i>	48
<i>Γράφημα 3.4: Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της εμφάνισης φιλέτων τσιπούρας κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (4οC).</i>	49
<i>Γράφημα 3.5: Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της συνεκτικότητας φιλέτων τσιπούρας κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (4οC).</i>	50
<i>Γράφημα 3.6: Αφθονία (%) των επικρατέστερων οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από θρεπτικό υλικό υπόστρωμα MRS με pH 6.4 (α) και pH 8 (β) κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτων τσιπούρας σε συσκευασία skinpack/vacuum στους 4οC με την ανάλυση γονιδίου 16S...</i>	51

Περιεχόμενα Πινάκων

<i>Πίνακας 1.1 : Ειδικοί αλλοιωγόνιοι μικροοργανισμοί σε ιχθύες και θαλασσινά αποθηκευμένοι σε διαφορετικές συνθήκες και η μέθοδος προσδιορισμού τους (προσαρμογή από Boziaris and Parlapani 2017).</i>	13
<i>Πίνακας 1.2: Διάρκεια ζωής ιχθυηρών αλμυρού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία (Gram et al. 1987).</i>	17
<i>Πίνακας 1.3: Διάρκεια ζωής ιχθυηρών γλυκού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία (Gram et al. 1987).</i>	18
<i>Πίνακας 1.4: Εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθυηρών συσκευασμένων υπό κενό, MAP (Mohan et al. 2016).</i>	23
<i>Πίνακας 2.1: :Η Πενταβάθμια κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε.</i>	45

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αλλοίωση ιχθύων

Τα θαλασσινά είναι πιο ευπαθή σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το βοδινό και χοιρινό κρέας, το κοτόπουλο, κλπ. Η αλλοίωση των αλιευμάτων μπορεί να οριστεί ως οι αλλαγές στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (οπτικές, γεύση, οσμή και υφή) που τα καθιστούν ακατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Gram and Huss 1996). Η αλλοίωση των αλιευμάτων μπορεί να προκληθεί από ένζυμα, αφυδάτωση, οξείδωση, μικροοργανισμούς και φυσική βλάβη (Harbell, 1988). Ωστόσο, η κύρια αιτία της αλλοίωσής για τα νωπά και ελαφρώς επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα είναι η μικροβιακή ανάπτυξη και η μεταβολική δραστηριότητα των επικρατέστερων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αμινών, σουλφιδίων, αλκοολών, αλδεϋδών, κετόνων και οργανικών οξέων τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση δυσάρεστης οσμής και γεύσης. Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί επίσης να ανιχνευθεί από αποχρωματισμό του προϊόντος ή από τη δημιουργία βλέννας, ή ακόμη και από την εμφάνιση αποικιών. Το 25% του συνόλου των τροφίμων που παράγονται παγκοσμίως κάθε χρόνο, χάνεται μετά τη συγκομιδή λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Baigd-Parker, 2000).

Τα περισσότερα αλιευτικά εμπορικά είδη που εκφορτώνονται στους λιμένες βρίσκονται μακριά από την περιοχή αλίευσής τους. Έτσι, ενδεχόμενες κακές πρακτικές και λάθος χειρισμοί κατά την αλίευση και την προσωρινή αποθήκευσή τους στο σκάφος, αλλά και τη μετέπειτα συντήρησή του, μπορεί να προκαλέσουν φθορά και υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευμάτων πριν αυτά φτάσουν στο σημείο πώλησης (Ashie et al. 1996). Επιπλέον, οι ιχθύες που προέρχονται είτε από αλιεία ή από υδατοκαλλιέργεια, είναι δυνατό να επιμολυνθούν με μικροοργανισμούς κατά την επεξεργασία τους όπως

κατά την φιλετοποίηση, απεντέρωση, κτλ. Οι μικροοργανισμοί που λαμβάνουν μέρος στην αλλοίωση προέρχονται από την αρχική μικροβιακή σύνθεση και από επιμόλυνση.

1.2 Αρχική μικροχλωρίδα ιχθύων

Τα ζωντανά και υγιή ψάρια δεν περιέχουν μικροοργανισμούς στη σάρκα τους. Οι μικροοργανισμοί δύναται να βρεθούν μόνο στο δέρμα, στα βράγχια και στο πεπτικό σύστημα (Liston 1980). Μόνο μετά το θάνατο των ψαριών οι μικροοργανισμοί αποικίζουν τη σάρκα. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο της σάρκας των ψαριών χαρακτηρίζεται από τη χαμηλή αφθονία και την υψηλή ποικιλομορφία του. Πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι συνολικοί μικροοργανισμοί στα ιχθυηρά κυμαίνονται συνήθως στο εύρος των 3-4 log cfu / g, ενώ η ποικιλομορφία του είναι αρκετά υψηλή. Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, οι νωποί ιχθύες συνήθως απαρτίζονται από τα εξής γένη:

- κατά Gram-αρνητικά βακτήρια: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Photobacterium* και *Aeromonas*,
- κατά Gram-θετικά βακτήρια: οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Vagococcus*, *Bacillus* και *Clostridium* (Gram et al. 1990, Gram and Huss 1996, Gennari et al. 1999, Gram 2009, Svanevik and Lunestad 2011, Parlapani et al. 2015b). Τα γένη στην οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών, οι σταφυλόκοκκοι, η *Listeria* καθώς και άλλοι μικροοργανισμοί έχουν επίσης ανιχνευθεί στον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό των ιχθυηρών κυρίως ως αποτέλεσμα της μικροβιακής μόλυνσης (Huss et al. 2000). Η σύνθεση του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού στα ιχθυηρά επηρεάζεται σημαντικά από τη

γεωγραφική προέλευση (εύκρατα ή τροπικά) και τα νερά στα οποία διαβιούν οι υδρόβιοι οργανισμοί (γλυκά νερά, θαλασσινά νερά) (Gram and Huss 1996, Gram 2009, Parlapani et al. 2018).

1.2.1 Αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί

Παρόλο που οι μικροοργανισμοί στα ιχθυηρά αρχικά αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα γενών βακτηρίων, οι εφαρμοζόμενες συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης, καθώς και άλλοι έμμεσοι παράγοντες, μεταβάλλουν το μικροβιακό φορτίο στη σάρκα των ιχθυηρών με αποτέλεσμα να κυριαρχούν άλλα είδη βακτηρίων συγκριτικά με τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό. Ως εκ τούτου, η τελική μικροβιακή σύνθεση των ιχθυηρών επηρεάζεται από την αρχική μικροβιακή σύνθεση (η οποία συνδέεται κυρίως με την προέλευση των ιχθυηρών-περιβάλλον διαβίωσης) και από άλλους παράγοντες όπως οι συνθήκες επεξεργασίας, συνθήκες αποθήκευσης όπως η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα καθώς και από τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις.

Στα ιχθυηρά που διατηρούνται σε συνθήκες ψύξης υπό αερόβιο περιβάλλον, η αλλοιωγόνος μικροχλωρίδα αποτελείται από γένη βακτηρίων που είναι ικανά να αναπτυχθούν γρήγορα σε αερόβιο περιβάλλον και σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως το *Pseudomonas* και *Shewanella* (Πίνακας 1). Αντιθέτως, υπό συνθήκες μειωμένης περιεκτικότητας σε οξυγόνο και υψηλής διοξειδίου του άνθρακα (τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασία-MAP), επικρατούν συνήθως τα γένη *Photobacterium*, LAB και *Brochothrix thermosphacta* (Πίνακας 1). Από τους μικροοργανισμούς αυτούς, το *Photobacterium* δεν έχει βρεθεί να κυριαρχεί στα αλιεύματα της Μεσογείου σε αντίθεση με τα αλιεύματα της Β. Ευρώπης. Υπό συνθήκες κενού αέρος τα δεδομένα του Πίνακα 1

υποδεικνύουν ότι τα γένη *Photobacterium* κυρίως το *P. phosphoreum*, LAB, και είναι τα επικρατέστερα γένη βακτηρίων.

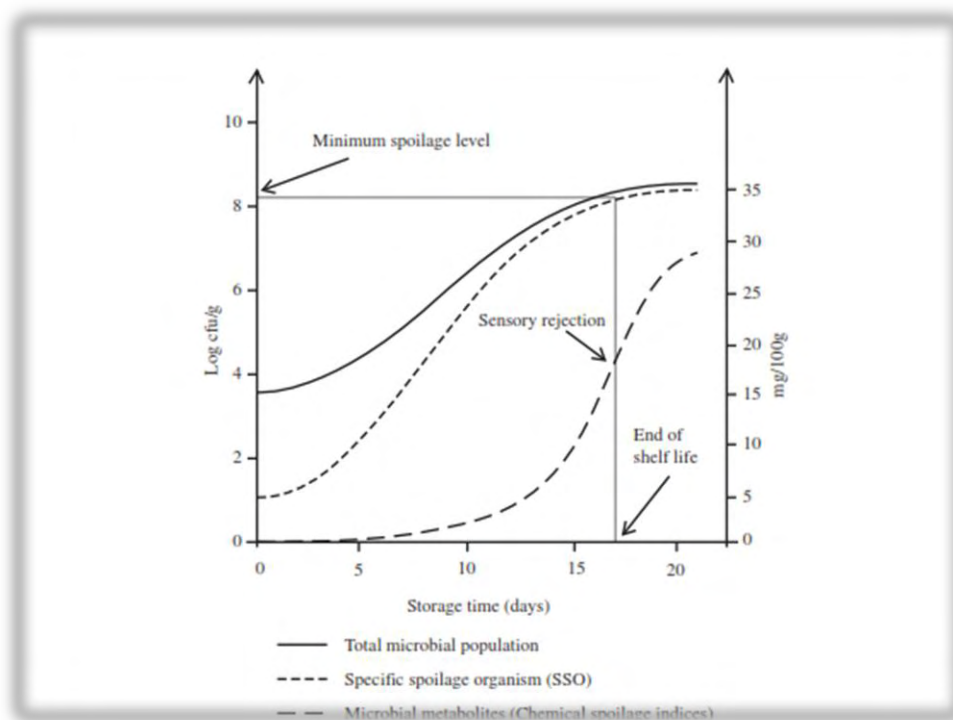
Πίνακας 1.1 : Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί σε ιχθύες και θαλασσινά αποθηκευμένοι σε διαφορετικές συνθήκες και η μέθοδος προσδιορισμού τους (προσαρμογή από Boziaris and Parlapani 2017).

SSO/Dominants	Fish/Seafood	Origination	Storage Conditions	Method of Determination
<i>P.phosphoreum</i>	Cod filltets(<i>G.morhua</i>)	North sea (Denmark)	0°C/ MAP(various CO ₂ levels),vaccum	Plates/phenotypic analysis
<i>P.phosphoreum</i>	Atlantic salmon(<i>Salmo salar</i>)	North sea (Norway)	2°C/MAP:CO ₂ /N ₂ (60/40)	Plates/classical
<i>P.phosphoreum</i>	Coalfish fillets	North sea	1°C&5°C/MAP: CO ₂ /N ₂ (60/40)	Plates & tissues/ T-RLFP, cloning & sequencing
<i>C.divergens</i> , <i>C.pisciola</i> , <i>B.thermosphacta</i>	Salmon fillets	North sea	1°C&5°C/MAP: CO ₂ /N ₂ (60/40)	Plates & tissues/ T-RLFP, cloning & sequencing
<i>H25-producing bacteria</i>	Atlantic salmon(<i>Salmo salar</i>)	North sea (Iceland)	Ice/AIR	Plates/classical
<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Photobacterium spp.</i>	Cold smoked salmon	North sea (Sweden)	7°C/vacuum	Plates & tissues/16S r-RNA gene analysis(cloning & sequencing)
<i>B.thermosphacta</i> <i>P.phosphoreum</i>	Halibut(<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	North sea (Norway)	4°C/MAP: CO ₂ /N ₂ &CO ₂ /O ₂ (50/50)	Plates & tissues/DGCE
<i>Pseudomanas spp.</i> , <i>P.phosphoreum</i>	Atlantic cod (<i>G.morhua</i>)	North sea (Norway)	0°C/MAP: CO ₂ /N ₂ &CO ₂ /O ₂ (50/50)	Plates & tissues/DGCE
<i>P.phosphoreum</i>	Norway lobster (<i>N. norvegicus</i>)	Scotland, UK	0°C,4 °C,8 °C,10 °C,12 °C,16 °C/AIR	Plates/16S r-RNA gene analysis
<i>Yersinia intermedia</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>C.maltaromaticum</i> , <i>S.baltica</i>	Atlantic horse mackerel(<i>Trachurus Trachurus</i>)	North Atlantic		Plates/16S r-RNA gene analysis
<i>Psychrobacter</i> <i>Pseudoalteromonas</i>	Brown shrimp (<i>Crangon crangon</i>)	North sea	Ice & 7.5°C/AIR	Plates & tissues/DGCE
<i>Psychrobacter sp.</i> , <i>Pseudoamonas sp.</i>	Norway lobster (<i>N. norvegicus</i>)	North sea	Ice/AIR	Plates (bulk cells) & tissues/DGCE
<i>Proteolytic strains</i>	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	North Atlantic ocean (Spain)	Ice/AIR	Plates/classical

<i>Pseudoamonas</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>S. putrefaciens</i>	Sea bass(<i>D. labrax</i>)	Atlantic ocean	Ice/AIR	Plates/phenotypic analysis
<i>P. phosphoreum</i> <i>Lactococcus piscium</i>	Salmon (<i>Salmo salar</i>) steak	France	3 days at 2°C and transferred to 8°C for 7 days/vacuum	Plates & tissues/TTGE
<i>P. fragi</i> , <i>S. putrefaciens</i>	Sardines(<i>Sardina pilchardus</i>)	Italy	Ice/AIR	Plates/phenotypic analysis
<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Pseudoamonas</i> sp.	Squid(<i>Todaropsis eblanae</i>)	Spain	Ice/AIR	Plates/phenotypic analysis G + C mol% and r-RNA gene analysis
<i>SPseudoamonas</i> sp.	Mediterranean Boque(<i>Boops boops</i>)	Greece	0°C,3 °C,7 °C, 10 °C/AIR	Plates/classical
<i>Pseudoamonas</i> sp.	Gilt-head sea bream (<i>S. aurata</i>)	Greece	0°C,5 °C,10 °C, 15°C/AIR	Plates/classical
<i>Pseudoamonas</i> sp.	Sea bass (<i>D. labrax</i>)	Greece	0°C,5 °C,10 °C, 15°C/AIR	Plates/classical
<i>Pseudoamonas</i> sp.	Sea bass (<i>D. labrax</i>)	Greece	Ice/AIR	Plates/classical
<i>Pseudoamonas</i> sp.	Norway lobster (<i>N. norvegicus</i>)	Greece	0°C,5°C,20°C,/AIR	Plates/classical
<i>Pseudoamonas</i> sp.	Sea bass (<i>D. labrax</i>)	Greece	2°C,/AIR	Plates/classical
<i>Pseudoamonas ludencis</i>	Gilt-head sea bream (<i>S. aurata</i>)	Greece	0°C,10°C,20°C,/AIR	Plates/phenotypic analysis

1.2.2 Η έννοια των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών

Μεταξύ των μικροοργανισμών που κυριαρχούν στην κατηγορία των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών μόνο εκείνοι που έχουν την ικανότητα να παράγουν μεταβολίτες (δυναμικό αλλοίωσης) σε επαρκείς ποσότητες (δραστηριότητα αλλοίωσης) για να προκαλέσουν οργανοληπτική απόρριψη του ιχθυηρού μπορούν να θεωρηθούν ως η κύρια αιτία αλλοίωσης και αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι οι αποκαλούμενοι SSO (Gram and Huss 1996, Gram and Dalgaard 2002). Ο όρος «ειδικοί αλλοιωγόνοι οργανισμοί» (specific spoilage organisms-SSO) έχει υιοθετηθεί για τον χαρακτηρισμό του κλάσματος της συνολικής μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση (Gram and Huss 1996). Μια γραφική απεικόνιση της έννοιας της μικροβιακής αλλοίωσης παρουσιάζεται στο Γράφημα 1.1.



Γράφημα 1.1: Γενική περιγραφή της αλλοίωσης των ιχθυηρών (προσαρμογή από Dalgaard, 2003).

Οι SSOs είναι ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης των ιχθυηρών που αναπτύσσεται γρήγορα υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης, φτάνει σε υψηλούς αριθμούς, καθιστά το κυρίαρχο κλάσμα του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού, και παράγει μεταβολίτες (χημικοί δείκτες αλλοίωσης-CSI) που προκαλούν την απόρριψη του προϊόντος λόγω αλλοίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος (Dalgaard 2003). Ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της ελάχιστης αλλοίωσης των ιχθυηρών από τους SSO όταν συμπίπτει με τη συγκέντρωση των μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν την οργανοληπτική απόρριψη τους, καθορίζει τη διάρκεια ζωής των ιχθυηρών (Εικόνα 1). Έτσι, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι SSOs και οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης είναι συμβατικά συνώνυμα.

Είναι γενικώς παραδεκτό, ότι έστω και μικρές αλλαγές στην επεξεργασία ή την συσκευασία των προϊόντων αλιείας είναι ικανές να προκαλέσουν δραματική μεταβολή της μικροβιακής σύνθεσης και ανάπτυξης των SSO και κατά συνέπεια μια τελείως διαφορετική διαδικασία αλλοίωσης. Ακόμα και σε ίδιου τύπου προϊόντα, η αλλοίωση μπορεί να αναπτυχθεί διαφορετικά ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση του προϊόντος και άλλους άγνωστους παράγοντες που μπορεί να επιδρούν στην ανάπτυξη και μεταβολική δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Gram and Dalgaard 2002, Parlapani et al. 2018).

1.3 Χρόνος εμπορικής ζωής ιχθυρών

Η παρακολούθηση της ποιότητας των ιχθυρών κατά τη συντήρησή τους και ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής τους αποτελεί ένα από τα κυριότερα πεδία έρευνας και απασχολεί όλους όσους εμπλέκονται στην ψυκτική αλυσίδα των προϊόντων αλιείας. Ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων έχει πραγματοποιηθεί σχετικά με τις οργανοληπτικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της συντήρησης των ιχθυρών σε θερμοκρασίες ψύξης και όπως φαίνεται στους Πίνακες 2 και 3, η διάρκεια ζωής τους παρουσιάζει σημαντική διακύμανση ανάλογα με το είδος τους και την προέλευσή τους.

Πίνακας 1.2: Διάρκεια ζωής ιχθυρών αλμυρού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία (Gram et al. 1987).

Είδος	Διάρκεια ζωής (ημέρες)
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (Chinook salmon)	10
<i>Mallotus villosus</i> (capelin)	8-12
<i>Ghadus merlangus</i> (whiting)	9-12
<i>Ghadus morhua</i> (cod)	9-15
<i>Melanoframmus aeglefinus</i> (haddock)	12-15
<i>Micromesistius poutassou</i> (blue whiting)	7-9
<i>Thelagra chalcogramma</i> (walley pollock)	6
<i>Merluccius bilinaris</i> (Pacific hake)	7
<i>Merluccius merluccius</i> (hake)	8-15
<i>Coryphaenoides acrolepis</i> (Pacific rattail fish)	20
<i>Coryphaenoides rupestris</i> (roundnose grenadier)	18
<i>Macroorurus berglax</i> (roughhead grenadier)	13-14
<i>Sebastes marinus</i> (ocean perch)	10-14
<i>Sebastes spp.</i> (redfish)	13-15
<i>Trachurus scad</i> (scad)	7
<i>Scomber scombrus</i> (mackerel)	4-19
<i>Scomberomorus cavalla</i> (king mackerel)	12

<i>Scomberomorus maculatus</i> (Spanish mackerel)	10
<i>Glyptocephalus cynoglossus</i> (witch flounder)	18
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (halibut)	19-24
<i>Limanda limanda</i> (dab)	10-12
<i>Pleuronectes platessa</i> (plaice)	13-18
<i>Pseudopleuronectes americanus</i> (winter flounder)	7-11

Πίνακας 1.3: Διάρκεια ζωής ιχθυερών γλυκού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία (Gram et al. 1987).

Είδος	Διάρκεια ζωής (ημέρες)
<i>Core gams dupeaformis</i> (whitefish)	14-18
<i>Salmo irideus</i> (trout)	9-11
<i>Ictalurus punctatus</i> (channel catfish)	12-13
<i>Perea flavescens</i> (yellow perch)	8-13
<i>Perea fluciatilis</i> (perch)	15-17
<i>Slizosiedion vitreum</i> (yellow walley)	20

Η αναζήτηση μιας μέσης διάρκειας ζωής των ιχθυερών αλμυρού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη δεν θα είχε κανένα νόημα αφού όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 αυτή κυμαίνεται από 6 έως 24 ημέρες. Η διακύμανση αυτή δείχνει καθαρά την επίδραση της ενδογενούς μικροχλωρίδας, καθώς και άλλων παραγόντων που συζητήθηκαν προηγουμένως, στη ποιότητα των ιχθυερών και τονίζει ταυτόχρονα τονίζει την πολυπλοκότητα της διαδικασίας της αλλοίωσης. Ωστόσο, τα δεδομένα του Πίνακα 5 μπορούν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι το σύνολο των δειγμάτων αλλοιώνεται μέσα

σε ένα χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων και μόνο λίγα είδη παρουσιάζουν διάρκεια ζωής κοντά στις 3 εβδομάδες.

1.4 Συντήρηση ιχθύων

Τα τελευταία χρόνια, η τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασία (MAP) και συσκευασία σε κενό αέρα, έχουν λάβει αυξημένη προσοχή στο τομέα της συντήρησης των ευπαθών προϊόντων. Αναλυτικά δεδομένα για τις δυο τεχνικές συσκευασίας παρουσιάζονται παρακάτω.

1.4.1 Συντήρηση σε συσκευασία MAP

Παράλληλα με την αποθήκευση των ιχθύων σε χαμηλές θερμοκρασίες, έχουν αναπτυχθεί άλλες τεχνολογίες με σκοπό την διατήρηση της ποιότητας και την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των τροφίμων. Μεταξύ αυτών των τεχνολογιών, η συσκευασία σε MAP έχει υιοθετηθεί από ένα μεγάλο αριθμό Βιομηχανιών Τροφίμων στην Ευρώπη (Davies 1995), καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους συντήρησης των αλιευτικών προϊόντων, η οποία σε συνδυασμό με θερμοκρασίες ψύξης είναι ικανή να επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος. Τα αέρια που συνθέτουν την ατμόσφαιρα MAP είναι το CO₂, το O₂ και το N₂. Το CO₂ χρησιμοποιείται συνήθως σε υψηλή συγκέντρωση εξαιτίας της βακτηριοστατικής δράσης του. Η χρήση του CO₂ στις συσκευασίες MAP επιμηκύνει σημαντικά τη φάση προσαρμογής και μειώνει τον ειδικό ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών σε αντίθεση με τη συσκευασία αέρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Farber 1991, Nosedá et al. 2012).

Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η επιμήκυνση του εμπορικού χρόνου ζωής του προϊόντος. Ο εμπορικός χρόνος ζωής των αλιευτικών προϊόντων σε MAP είναι δυνατόν

να αυξηθεί από μερικές ημέρες έως και μία εβδομάδα ή/και περισσότερο (Pastoriza et al. 1998). Σύμφωνα με Davies (1997), η συσκευασία σε MAP αν και είναι δυνατόν να επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής ενός αλιευτικού προϊόντος, παράλληλα μπορεί να επιτρέψει την αύξηση παθογόνων μικροοργανισμών σε επίπεδα μεγαλύτερα από εκείνα που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να αναπτύξουν προσαρμοστικότητα σε αντίξοα περιβάλλοντα (Skandamis and Nychas 2002).

1.4.2 Συσκευασία υπό κενό (Εισαγωγή)

Η συσκευασία υπό κενό αέρα, αντιπροσωπεύει μια στατική μορφή υποβαρικής αποθήκευσης που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων εξαιτίας:

- της μεγάλης της αποτελεσματικότητας στη μείωση των οξειδωτικών αντιδράσεων στα τρόφιμα και
- του σχετικά χαμηλού κόστους της.

Βασικό χαρακτηριστικό της συσκευασίας υπό κενό αέρα είναι ότι το προϊόν είναι συσκευασμένο με κατάλληλο υλικό και πρακτικά “εγκλωβίζεται σε ένα περιβάλλον με λίγο ή καθόλου αέρα, ανάλογα με το ύψος του κενού (υπό πίεση) και τη διαπερατότητα της συσκευασίας σε οξυγόνο. Οι Rajesh et al. (2002) αναφέρουν ότι η τεχνική της συσκευασίας με κενό περιλαμβάνει την αφαίρεση του αέρα από τη συσκευασία, επεκτείνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής πολλών μαγειρεμένων τροφίμων. Σύμφωνα με τους ερευνητές η συσκευασία κενού πρέπει να χρησιμοποιείται υπό αυστηρές συνθήκες υγιεινής και ελέγχου για την επιπρόσθετη καθυστέρηση της μικροβιακής αλλοίωσης των ευπαθών τροφίμων.

Το προϊόν που συσκευάζεται σε συσκευασία κενού αέρα έχει καλές ιδιότητες «φραγμού» προς το οξυγόνο και το νερό. Ειδικότερα οι Kumar and Ganguly (2014), αναφέρουν ότι η συσκευασία των τροφίμων υπό κενό έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Δεν υπάρχει ή υπάρχει χαμηλός κίνδυνος μόλυνσης μετά την παστερίωση.
- Ευκολία χειρισμού του συσκευασμένου προϊόντος.
- Αναστολή ανάπτυξης των αναερόβιων μικροοργανισμών αλλοίωσης των τροφίμων.
- Αναστολή ή επιβράδυνση της επιβλαβούς οξειδωτικής αντίδρασης των τροφίμων κατά την αποθήκευσή τους λόγω της έλλειψης οξυγόνου.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης συσκευασίας για τη συσκευασία των φρέσκων ψαριών υπό κενό, οι Kumar and Ganguly (2013) αναφέρουν τα εξής:

- Αρκετή αντοχή του φρέσκου ψαριού στη θραύση κατά τη διάρκεια συσκευασίας του.
- Αποφυγή εισόδου οξυγόνου στο εσωτερικό της συσκευασίας.
- Αποφυγή υδρατμών.
- Μη μεταβολή της θερμοκρασίας στο συσκευασμένο ψάρι.
- Αντοχή στα έλαια.
- Διαφάνεια στο συσκευασμένο ψάρι.
- Ανθεκτικότητα στη χημική αλλοίωση (Srinivasa Gopal et al. 1999).

1.4.3. Χαρακτηριστικά και φύση της συσκευασίας των ιχθυηρών υπό κενό αέρα

Η συσκευασία υπό κενό αέρα (vacuum), είναι μια τεχνική συντήρησης των τροφίμων που εφαρμόζεται ευρέως στον κλάδο αυτό εξαιτίας της αποτελεσματικότητας της στη μείωση της οξειδωτικής αλλοίωσης του τροφίμου σε σχετικά χαμηλό κόστος

(Srinivasa Gopal et al. 1999). Ο Huss (1972), διαπίστωσε πως η συσκευασία ιχθυρών υπό κενό συγκριτικά με την αντίστοιχη αερόβια συσκευασία είχε ως αποτέλεσμα, τη μικρότερη ανάπτυξη βακτηρίων και την υψηλότερη βαθμολογία ποιότητας και την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθυρών κατά έξι ημέρες. Ο Hansen (1972), διαπίστωσε ότι η ρέγγα του Ατλαντικού και η πέστροφα που αποθηκεύτηκαν απευθείας σε πάγο παρουσίασαν χαρακτηριστικά οξείδωσης των λιπών τους σε 6 ημέρες.

Αντιθέτως, τα ψάρια που συσκεύασε με σακούλες πολυαμιδίου πολυαιθυλενίου υπό κενό αέρα, δεν παρουσίασαν φαινόμενα οξείδωσης των λιπών τους κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους για 20 ημερών αποθήκευσης. Ωστόσο τα ψάρια ανέπτυξαν μια δυσάρεστη οσμή και γεύση λόγω της ανάπτυξης αλλοιωγόνων βακτηρίων. Για αυτό το λόγο μελέτησαν μετέπειτα την προεπεξεργασία των ιχθυρών πριν από τη συσκευασία τους υπό κενό για τη δυνητική βελτίωση της διάρκειας ζωής των φρέσκων ιχθυρών.

Οι Özrolat et al. (2014) επίσης αναφέρουν ότι η συσκευασία των φιλέτων ιχθύων υπό συνθήκες κενού αέρα συμβάλλει στη επιμήκυνση του εμπορικού χρόνου ζωής του προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα οι Özrolat et al. (2014), συνέκριναν το εμπορικό χρόνο ζωής των φιλέτων *Carpoeta umbla* συσκευασμένων υπό κενό αέρος σε $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ και συσκευασμένων υπό αερόβιες συνθήκες. Η μελέτη έδειξε ότι στην πρώτη περίπτωση η διάρκεια ζωής ήταν 56 ημέρες, ενώ στη δεύτερη μόνο 4 ημέρες. Οι Dondero et al. (2004), αξιολογώντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων σολομού συσκευασμένων υπό κενό αέρα σε χαμηλή θερμοκρασία διαπίστωσαν πως η διάρκεια ζωής των φιλέτων ήταν :

- 26 ημέρες στους 0°C ,
- 21 ημέρες στους 2°C ,
- 20 ημέρες στους 4°C ,

- 10 ημέρες στους 6°C,
- 7 ημέρες στους 8°C.

Οι Shalini et al. (2000), επισημαίνουν πως η συσκευασία υπό κενό αέρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική τεχνική συντήρησης των ιχθυηρών σε συνδυασμό με την αποθήκευση του σε υπερψύξη ή σε ψύξη για την επιβράδυνση της αλλοίωσης και την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των αλιευτικών προϊόντων. Οι Lyhs et al. (2001) αξιολόγησαν το μικροβιακό φορτίο και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων της ιριδίζουσας πέστροφας συσκευασμένες υπό κενό αέρος και βρήκαν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής ήταν 20 ημέρες και 18 ημέρες στους 3°C και 8°C αντίστοιχα.

Κατά τον Day (2003), η συσκευασία υπό κενό αέρα είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος συσκευασίας των αλιευτικών προϊόντων. Το ανώτερο ενισχύεται και από τα ευρήματα των Anelich et al. (2001), Taheri et al. (2012), Kocatepe et al. (2015), Rashidi et al. (2014), οι οποίοι αναφέρουν ότι η συσκευασία κενού για τα αλιευτικά προϊόντα είναι μια κατάλληλη μέθοδος για την παράταση του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθυηρών εξαιτίας της καθυστέρησης της οξειδωσης των λιπιδίων. Συγκεντρωτικά στοιχεία σχετικά με τον εμπορικό χρόνο ζωής των ιχθυηρών συσκευασμένων υπό κενό και MAP παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 (Mohan et al. 2016).

Πίνακας 1.4: Εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθυηρών συσκευασμένων υπό κενό, MAP (Mohan et al. 2016).

Type of fish	Storage temp(°C)	Atmosphere CO ₂ :N ₂ :O ₂	Shelf life (Days)
Catfish fillets	4	Air	13
	4	75:25:0	38-40
	4	Vacuum	20-24
Cod fillets (<i>G.morhua</i>)	1	Air	9
	1	60:40:	12

Cod fillets (<i>G.morhua</i>)	2	40:60:0	11
	2	40:40:20	13
	4	Air	20-24
Cod fillets	4	75:25:0	55-60
	4	Vacuum	24-27
Cod fillets	0	40:30:30	12.5
	0	Vacuum	9
	2	100:0:0	10
	2	60:40:0	10
Cod whole(<i>G.morhua</i>)	2	40:60:0	9-10
	2	Vacuum	8-9
	2	Air	~7
Cod whole/fillets (<i>G.morhua</i>)	0	Air	12-13
	0	25:75:0	20
Cod fillets (<i>G.morhua</i>)	4	100:0:0	40-53
	3	100:0:0	49
Cod blue (<i>Araperciscolias</i>)	3	Vacuum	14
	3	Air	14
Haddock whole (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	0	40:30:30	10
	0	Air	8
Haddock fillets (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	0	60:20:20	14
	0	Air	10
	0	60:40:0	14

1.4.4 Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων αποθηκευμένων υπό χαμηλές θερμοκρασίες και συσκευασμένα υπό κενό αέρα

Η μικροβιακή χλωρίδα των φρέσκων ιχθυηρών εξαρτάται περισσότερο από το περιβάλλον και λιγότερο από το είδος τους (Huss 1995). Η ενδογενής μικροχλωρίδα των ιχθυηρών που προέρχονται από ψυχρά και εύκρατα νερά έχει μελετηθεί για πολλά χρόνια με αποτέλεσμα να έχουν προκύψει γενικά συμπεράσματα αν και η ταξινομική κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί έχει υποστεί σημαντικές αλλαγές μέχρι σήμερα. Υπό κανονικές συνθήκες, η ενδογενής χλωρίδα των ιχθυηρών από εύκρατα κλίματα κυριαρχείται από Gram αρνητικούς βακίλους που κατά κανόνα ανήκουν στα γένη:

- *Moraxella*,
- *Pseudomonas*,
- *Shewanella putrefaciens*,
- *Flavobacterium*
- *Vibrio* και *Aeromonas*. Gram θετικοί οργανισμοί όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Coryneforms* και *Clostridium* έχουν επίσης βρεθεί σε διάφορες αναλογίες. Η αναλογία των Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων ποικίλει αλλά γενικά τα κατά Gram θετικά βακτήρια κυμαίνονται από 0-30% της συνολικής χλωρίδας (Huss 1995). Ο συνολικός αριθμός των οργανισμών παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις. Ο Liston (1980), ανέφερε ότι ο αριθμός των Gram θετικών βακτηρίων μπορεί να κυμαίνεται από 10^2 - 10^7 cfu/g.

Ο συνολικός πληθυσμός ιχθυηρών από εύκρατα κλίματα στο τέλος της διάρκειας ζωής τους και όταν αυτά συντηρούνται σε πάγο κυμαίνεται από 10^7 - 10^9 cfu/g. Η μεγαλύτερη αύξηση υπό αερόβιες συνθήκες παρατηρείται στα βακτήρια που ανήκουν

στα γένη *Pseudomonas* και *Shewanella putrefaciens*, τα οποία αποτελούν το 80-100 % της συνολικής χλωρίδας των αλλοιωμένων ιχθυηρών (Huss 1995).

Κατά την αερόβια συντήρηση των ιχθυηρών αυτών, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν αναγνωριστεί ως οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (Koutsoumanis and Nychas 2000, Parlapani et al. 2013, Parlapani et al. 2015a, Parlapani and Boziaris, 2016).

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το μικροβιακό πληθυσμό αλλοίωσης φιλέτων ιχθυηρών σε συσκευασία κενού αέρα αντιτίθεται μεταξύ τους. Ο Knøchel (1983), βρήκε ότι στη μικροχλωρίδα των φιλέτων καπνιστού σολομού συσκευασμένων υπό κενό κυρίαρχα βακτήρια ήταν τα βακτήρια LAB μετά από 2 εβδομάδες αποθήκευσης στους 4°C. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Leisner et al. (1994), μετά από 18 ημέρες αποθήκευσης στους 5°C. Επικράτηση των LAB βακτήρια διαπίστωσαν και οι Jeppesen and Huss (1993), ανέφερε επίσης τα LAB ως κυρίαρχα βακτήρια αλλοίωσης σε φιλέτα σολομού «gravad», και σκουμπρί συσκευασμένο υπό κενό, αποθηκευμένα για 2–4 εβδομάδες στις 5°C.

Οι Lys et al. (2001), εξέτασαν τα μικροβιακό φορτίο και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό αέρα σε συνθήκες ψύξης 3- 8°C. Υπό αυτές τις συνθήκες ο πληθυσμός των μεσόφιλων και των ψυχρόφιλων μικροοργανισμών κυμαίνονταν από 10^6 – 10^7 cfu/g σε 3°C και 10^7 – 10^8 cfu/g 8°C. Τα βακτήρια που παράγουν H₂S αντιπροσώπευαν υψηλό ποσοστό των ψυχρόφιλων βακτηρίων ενώ τα κατά Gram θετικά LAB βακτήρια αντιπροσώπευαν μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με τα άλλα είδη βακτηρίων. Οι Jørgensen et al. (1988) αναφέρουν ότι η παραγωγή των H₂S βακτηρίων ευνοείται υπό συνθήκες χαμηλών επιπέδων οξυγόνου αλλά σε περιβάλλον με αυξημένη περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα η

ανάπτυξη τους παρεμποδίζεται (Jørgensen et al. 1988). Όταν η συσκευασία υπό κενό αέρα χρησιμοποιείται τότε εξαιτίας του βακτηριακού μεταβολισμού τα επίπεδα του διοξειδίου άνθρακα αυξάνονται σταδιακά εντός της συσκευασίας με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ανάπτυξη των H₂S βακτηρίων.

Οι Paludan-Muller et al. (1998) αναφέρουν ότι σε φιλέτα καπνιστού σολομού η μικροχλωρίδα αλλοίωσης απαρτιζόταν από LAB βακτήρια και Gram-αρνητικά βακτήρια. Οι Stamatis and Arkoudelos (2007), επίσης παρατήρησαν αύξηση του πληθυσμού των LAB σε φιλέτο σκουμπρί συσκευασμένο υπό κενό αέρα και MAP. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η ανάπτυξη του πληθυσμού των LAB ήταν ταυτόχρονη με την αύξηση της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος και βακτηριοσίνη του, που είναι φυσικό αντιμικροβιακές ουσίες. Ο σχηματισμός του γαλακτικού οξέος αναστέλλει την ανάπτυξη και άλλων βακτηρίων σε ιχθυηρά. Γενικά, υπό συσκευασία vacuum και MAP η χλωρίδα αλλοίωσης μεταβάλλεται, σε μεγάλο βαθμό, πιθανώς από την επικράτηση μ/ο ανθεκτικών σε CO₂ οργανισμοί, π.χ. LAB και *Brochothrix thermosphacta* (Asensio et al. 1988).

Οι Arashisar et al. (2004), Stamatis and Arkoudelos (2007), Mastromatteo et al. (2010) συνέκριναν το μικροβιακό φορτίο υπό δυο διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας σε ιχθυηρά. Τα προϊόντα που συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες χαρακτηρίζονται από αυξημένη παρουσία αερόβιων μικροοργανισμών, ιδιαίτερα *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* και Enterobacteriaceae σε σύγκριση με τη συσκευασία των ιχθυηρών υπό κενό αέρα (Arashisar et al. 2004, Mastromatteo et al. 2010). Μικρότερο πληθυσμό των ψυχρόφιλων βακτηρίων σε φιλέτα *Rutilus frisii kutum* συσκευασμένα υπό κενό παρατήρησαν οι Etemadian et al. (2012). Σε συνδυασμό με τη μείωση του μικροβιακού φορτίου οι Arkoudelos et al. (2007) επισημαίνουν πως η συσκευασία κενού

μπορεί να αποτρέψει την οξειδωτική τάγγιση και να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ιχθυηρών παρόλο που η συσκευασία MAP και κενού θα μπορούσε να αποτρέψει τις μικροβιακές και χημικές μεταβολές των θαλασσινών, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και των αλιευτικών προϊόντων.

Κατά τη συντήρηση ιχθυηρών από τη Μεσόγειο σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες η σύσταση της χλωρίδας μεταβάλλεται σημαντικά. Σε προγενέστερη μελέτη οι Parlapani et al. (2014), εξετάζοντας τον μικροβιακό πληθυσμό σε φιλέτα τσιπούρας συντηρούμενες υπό διάφορες συνθήκες, διαπίστωσαν πως σε όλες τις περιπτώσεις τα είδη *Pseudomonas* spp. ήταν οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί αλλοίωσης του προϊόντος. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλα προϊόντα αλιείας που προέρχονται από θερμότερα κλίματα. Ωστόσο, σε συνθήκες συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας των φιλέτων τσιπούρας, οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ήταν σημαντικότερη η ανάπτυξη του *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) υπό MAP (Parlapani et al. 2014).

Σε σχετική μελέτη με φιλέτα λαυρακίου συντηρημένα σε θερμοκρασία 2°C καθώς και σε συνθήκες MAP (CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%), οι Parlapani et al. (2015) διαπίστωσαν ότι τα είδη *Pseudomonas* καθώς και τα υδροθειούχα βακτήρια ήταν οι σπουδαιότεροι οργανισμοί μικροβιακής αλλοίωσης. Η ανάπτυξη των *Pseudomonas* παρεμποδίζεται και η κυρίαρχη χλωρίδα στο τέλος της διάρκειας ζωής αποτελείται κυρίως από κατά Gram θετικά βακτήρια όπως τα *Lactic acid bacteria* και *Brochothrix thermosphacta*. Η ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε διάφορα είδη Ελληνικών ιχθυηρών συσκευασμένα υπό ατμόσφαιρα CO₂ έχει διαπιστωθεί ότι συσχετίζεται άμεσα με την αλλοίωση (Koutsoumanis et al. 1999).

Οι Nosedá et al. (2012) διερεύνησε την ταυτότητα, την ανάπτυξη και την παραγωγή μεταβολιτών μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση των φιλέτων *Pangasius hypophthalmus* συσκευασμένα σε αέρα, κενό και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) (MAP 1: 50% CO₂–50% N₂ και MAP 2: 50% CO₂ – 50% O₂) κατά την αποθήκευση στους 4°C). Στα φιλέτα συσκευασμένα στον αέρα και υπό κενό η κυρίαρχη χλωρίδα συνίσταται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια που ανήκουν κυρίως στα γένη *Serratia* και *Pseudomonas*. Αντίθετα, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Carnobacterium maltaromaticum* και *Carnobacterium divergens*) και *Brochothrix thermosphacta* ταυτοποιήθηκαν ως η κυρίαρχη χλωρίδα αλλοίωσης στα δείγματα που συσκευάστηκαν υπό MAP.

Οι Dalgaard et al. (1993) αξιολόγησαν τη μικροβιακή ανάπτυξη, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και χημικές αλλαγές σε φιλέτα μπακαλιάρου η σύνθεση σε συσκευασία κενού (VP) και τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) αποθηκευμένα στους 0°C. Υπό τις συνθήκες αυτές βρήκαν ότι οι κοκοκοβακίλλοι και τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι οι κύριοι οργανισμοί αλλοίωσης. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι το *Photobacterium phosphoreum*, που προσδίδει σύντομη παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων ψαριών υπό VP (vaccum) και MAP. Επίσης, τα βακτήρια αυτά ενδέχεται να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλοίωσης ψαριών που παράγουν H₂S, αφού στα δείγματα της μελέτης τους τα επίπεδα τους ήταν χαμηλά.

Οι Korkeala et al. (1989) υποστηρίζουν ότι τα γαλακτικά οξέα βακτήρια είναι τα επικρατέστερα βακτήρια σε ιχθυηρά συσκευασμένα υπό κενό αέρος. Οι Kostaki et al. (2009), Li et al. (2012), υποστηρίζουν ότι τα επικρατέστερα βακτήρια σε ιχθυηρά συσκευασμένα υπό MAP και κενό αέρα είναι τα βακτήρια που παράγουν H₂S (συμπεριλαμβανομένου των *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium*

phosphoreum), *Pseudomonas sp.*, *lactic acid bacteria*, Enterobacteriaceae καθώς και το *Brochothrix thermosphacta* (Kakouri et al. 1997). Επίσης, οι Rutherford et al. (2007) παρατήρησαν πως υπό συνθήκες τροποποιημένης συγκέντρωσης σε CO₂ (100% CO₂) μειώθηκε η ανάπτυξη των *L. monocytogenes* σε γαρίδες αποθηκευμένες στους 3°C συγκριτικά με τις συσκευασμένες γαρίδες υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες υπό κενό.

1.4.5 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών- PCR

Η αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου είναι σήμερα η πιο κοινή προσέγγιση για την ανάλυση της μικροβιακής σύνθεσης λόγω της φυλογενετικής πληροφορίας που παρέχει το γονίδιο αυτό. Η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βακτηρίων καθώς και για τον εντοπισμό των άγνωστων βακτηρίων σε επίπεδο γένους ή είδους (Sacchi et al. 2002). Επομένως, η πληροφορία που λαμβάνεται είναι μακράν ακριβέστερη σε σχέση με αυτή που λαμβάνεται με τις φαινοτυπικές δοκιμές. Ωστόσο, τα θρεπτικά υλικά παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα. Επιπλέον, αρκετοί σημαντικοί μικροοργανισμοί αδυνατούν να αναπτυχθούν σε ορισμένα θρεπτικά υλικά γενικής χρήσης (Broekaert et al. 2011).

Σήμερα, οι μοριακές τεχνικές, ιδιαίτερα όταν το γονίδιο στόχος είναι το 16S rRNA, αποτελούν σημαντικό εργαλείο για μελλοντική χρήση στην τεκμηρίωση της διασφάλισης της ποιότητας και της ασφάλειας ενός τροφίμου (Martinez et al. 2011). Τα τελευταία χρόνια, λίγες σχετικά μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα. Η ύπαρξη και άλλων μικροοργανισμών που

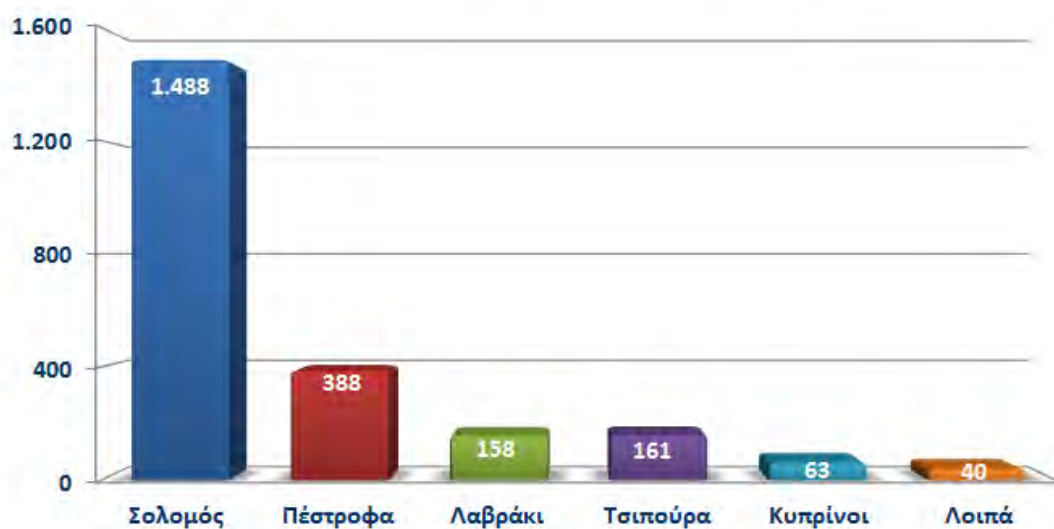
δύναται να συνεισφέρουν στην αλλοίωση αποτελεί σημαντικό πεδίο για μελέτη στις μέρες μας.

1.5 Η σημασία της τσιπούρας για τις υδατοκαλλιέργειες

Η τσιπούρα αποτελεί ένα σημαντικό εμπορικό είδος για τη διατροφή του ανθρώπου και ένα από τα κυριότερα είδη ψαριών που εκτρέφονται στις περιοχές της Μεσογείου (Parlapani et al. 2013) (Γράφημα 1.2). Η τσιπούρα αποτελεί κατάλληλο είδος για εκτατική υδατοκαλλιέργεια στη Μεσόγειο, λόγω της υψηλής της εμπορικής αξίας, του υψηλού ποσοστού επιβίωσης και των διατροφικών της συνηθειών, που περιλαμβάνουν προϊόντα που βρίσκονται σχετικά χαμηλά στην τροφική αλυσίδα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της μελέτης του ΣΕΘ (2019) οι κυριότερες χώρες παραγωγής τσιπούρας είναι η Ελλάδα, η Τουρκία και η Ισπανία (το 80% της παγκόσμιας παραγωγής). Το υπόλοιπο 20% παράγεται στην Ιταλία, Γαλλία, Πορτογαλία, Κροατία, Κύπρο αλλά και χώρες της Β. Αφρικής και Μέσης Ανατολής. Η εξέλιξη της παραγωγής ανά χώρα από το 2000 έως σήμερα απεικονίζεται στο Γράφημα 1.3.

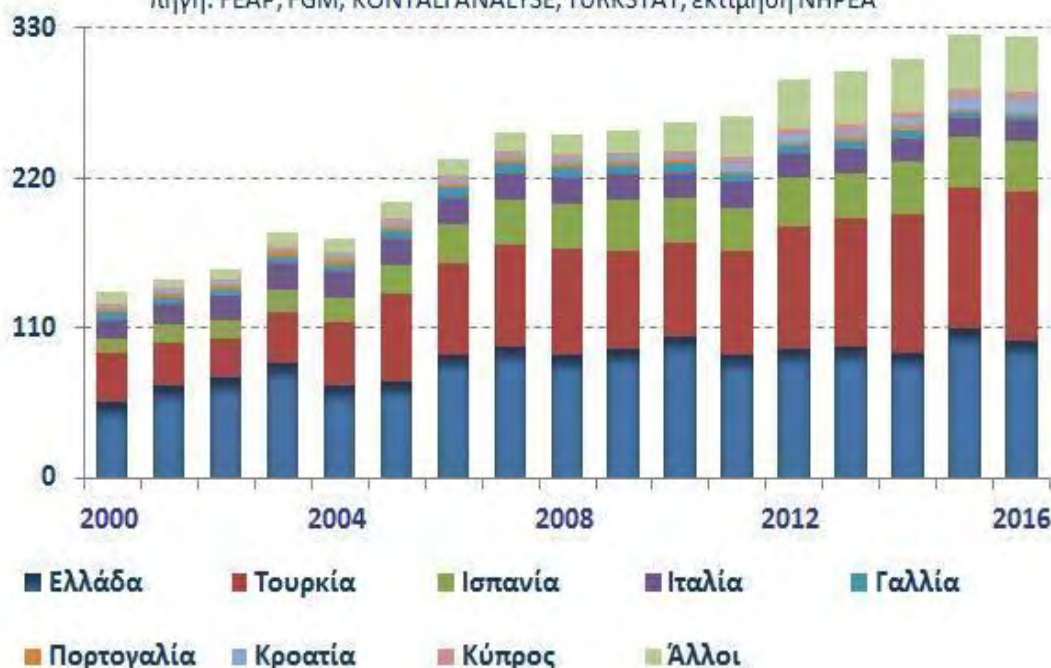
FEAP - Ευρωπαϊκή παραγωγή ιχθυοκαλλιέργειας 2016 (ΧΤ)



Γράφημα 1.2: Διάρθρωση της ευρωπαϊκής ιχθυοκαλλιέργειας (ΣΕΘ 2019).

Εξέλιξη παγκόσμιας παραγωγής τσιπούρας & λαβρακιού 2000-2016 (χιλ. τόνοι)

πηγή: FEAP, FGM, KONTALI ANALYSE, TURKSTAT, εκτίμηση ΝΗΡΕΑ



Γράφημα 1.3: Η εξέλιξη της παραγωγής ανά χώρα από το 2000 έως σήμερα (ΣΕΘ, 2019).

1.6 Σκοπός παρούσας εργασίας

Βασικός σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η αξιολόγηση του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων τσιπούρας που διατηρήθηκαν συσκευασμένες σε Skinpack για 12 μέρες υπό ψύξη και η ταυτοποίηση των επικρατέστερων πιθανόν αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με μοριακή ανάλυση. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε ο βαθμός επίδρασης των συνθηκών αποθήκευσης και συσκευασίας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων τσιπούρας καθώς και στο pH. Τέλος, σημειώνεται πως έγινε και ταυτοποίηση μικροοργανισμών- PCR.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Φιλέτα τσιπούρας σε συσκευασία κενού αέρος/skinpack χωρισμένα σε 16 συσκευασίες σε δυο παρτίδες προερχόμενα από εταιρεία μεταποίησης νωπών αλιευμάτων μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο Υγιεινής και Τεχνολογίας Αλιευτικών προϊόντων και τροφίμων του εργαστηρίου Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος 48 ώρες μετά την εξαλίευσή τους.

Οι ιχθύες συσκευάστηκαν στις 5/12/2019 και στις 5/02/2020 και αποθηκεύτηκαν στους 4°C (ψύξη). Πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των μικροβιολογικών και οργανοληπτικών μεταβολών, ώστε να προσδιοριστεί ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας σε ψύξη 4°C, καθώς επίσης και η μέτρηση του pH των δειγμάτων. Καταμετρήθηκαν ανά 2 ημέρες, η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) και οι πληθυσμοί των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως τα *Pseudomonas* spp., υδροθειούχα βακτήρια (H₂S), οξυγαλακτικά (LAB σε MRS με pH 6.4 και pH 8) και Enterobacteriaceae. Επίσης, παρατηρήθηκαν οι οργανοληπτικές μεταβολές σε οσμή, εμφάνιση και συνεκτικότητα σάρκας και έγινε ταυτοποίηση μικροοργανισμών- PCR.

2.2Μικροβιολογική ανάλυση

2.2.1 Μικροβιολογικά υλικά

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK). Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2.1.1 TSA, ολική μικροβιακή γλωρίδα

Το TSA (LAB011) είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται παρακάτω:

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Για την παρασκευή του, σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.1.2 CFC, *Pseudomonas* spp.

Το θρεπτικό μέσο (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine) παρέχει όλα εκείνα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού κάνει το θρεπτικό εκλεκτικό για *Pseudomonas* spp. Η πεπτόνη ζελατίνης και η καζεΐνη από ενζυματική

πέψη παρέχουν το άζωτο, το θείο και τις βιταμίνες που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί. Το χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂) και το θειϊκό κάλιο (K₂SO₄) παράγουν χρωστική. Η γλυκερόλη συμπληρώνεται ως πηγή άνθρακα (C). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες Sodium Nalidixate, Fucidin και Cephaloridine είναι εκλεκτικά υλικά και χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν Gram⁺ και ορισμένα Gram⁻ βακτήρια.

Συστατικά: g/1000 ml

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

Για την παρασκευή του, σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.1.3 VRBGA, Enterobacteriaceae

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA). Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στην δράση των χολικών (biles) αλάτων και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτηρίδια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ζελατίνη από ενζυματική πέψη παρέχει άζωτο (N), αμινοξέα και άνθρακα (C). Το εκχύλισμα ζύμης προσφέρει τις απαραίτητες βιταμίνες για

την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες (H/C). Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο παρουσία του δείκτη pH (Ουδέτερο κόκκινο, Neutral red).

Συστατικά: g/1000 ml

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

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

2.2.1.4 IA, βακτήρια που παράγουν υδρόθειο

Το Iron Agar χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H₂S). Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη, καθώς και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και βιταμίνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), τη δεξτρόζη, τη λακτόζη και την σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες

(H/C) αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$) ανάγεται προς υδρόθειο (H_2S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου Fe και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες.

Συστατικά: g/1000 ml

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

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

2.2.1.5 MRS Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα de Man - Rogosa - Sharpe agar (MRS, LAB093). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) καθώς και το βασικό pH καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ενζυματική πέψη ζωικού ιστού καθώς και το εκχύλισμα βοδινού και ζύμης είναι οι πηγές άνθρακα (C), αζώτου (N) και βιταμινών. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμούμενος υδατάνθρακας (H/C). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) είναι ανασταλτικός παράγοντας, ενώ μαζί με το κιτρικό αμμώνιο ($C_6H_{17}N_3O_7$) δρουν ως εκλεκτικοί παράγοντες. Το φωσφορικό κάλιο (K_3PO_4) δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας, ενώ το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το θειικό μαγγάνιο ($MnSO_4$) παρέχουν θετικά ιόντα για τον μεταβολισμό. Το πολυσορβικό (Polysorbate, Tween ® 80) είναι επιφανειοδραστικό, διευκολύνοντας την πρόσληψη των θρεπτικών από τους μικροοργανισμούς. Το άγαρ χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής, ενώ το τελικό pH είναι 6.5 ± 0.2 στους $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Συστατικά: g/1000 ml

Mixed Peptones	10.0
Yeast Extract	5.0
Beef Extract	10.0
Glucose	20.0
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Triammonium Citrate	2.0
Magnesium Sulphate	0.2
Manganese sulphate	0.05

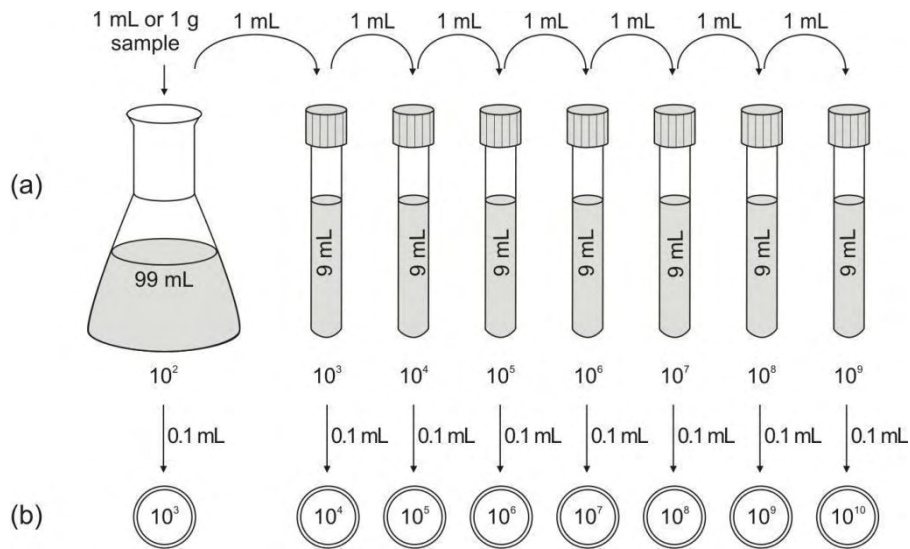
Tween ® 80	1.08
Agar	15.0

Διαδικασία παρασκευής:

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

2.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Λαμβάνονταν ασηπτικά, σε κάθε δειγματοληψία 10 g σάρκας ιχθύος εις διπλούν ($n = 2$) και μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 90 ml αραιωτικού διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v peptone) και η σακούλα οδηγούνταν σε συσκευή ομογενοποίησης (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK), όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου (Εικόνα 4).



Γράφημα 2.1: Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος

2.3 Τεχνική επίστρωσης τρυβλίων

2.3.1 Τεχνική της επιφανειακής Επίστρωσης (spread plate)

Η τεχνική αυτή αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0.1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια ειδικού διανομέα. Εφαρμόζεται γενικά στους αερόβιους μικροοργανισμούς και στα θρεπτικά TSA, CFC, MRS.

2.3.2 Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plate technique)

Αρχικά γίνεται ενοφθαλμισμός γνωστού όγκου (1 ml) από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος σε θρεπτικό υλικό και στην συνέχεια γίνεται μετάγγιση τηγμένου θρεπτικού υλικού, θερμοκρασίας 45°C περίπου. Στη συνέχεια, και αφού το θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay).

Εφαρμόζεται, γενικά στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς και στα θρεπτικά Iron Agar και VRBGA.

2.3.3. Επώαση δειγμάτων

Ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα τα τρυβλία με τις καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανάλογες συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του επιθυμητού μικροοργανισμού. Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν:

α) Ολικός Μεσόφιλος Πληθυσμός σε TSA μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 έως 72 h,

β) βακτήρια που παράγουν H₂S σε IA, με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 72 h,

γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37 C για 24 h,

δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar pH 6.4 και pH 8, με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 72 h,

ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48 h.

2.4 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με μοριακή ανάλυση

Οι μικροοργανισμοί (αποικίες) που καταμετρήθηκαν στα δύο διαφορετικά MRS Agar με pH 6.4 και pH 8, απομονώθηκαν και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση γονιδίου 16S. Μετά την ολοκλήρωση των κλασσικών δοκιμών, κάθε απομονωμένη

καλλιέργεια υποβλήθει σε ανάλυση γονιδίου 16S rRNA και απευθείας αλληλούχιση. Η ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στις απομονωμένες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές S-DBact-0341-b-S-17 (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and S-DBact-0785-a-A-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν περίπου 400 ζ.β. Το μείγμα της PCR, τελικού όγκου 25 μl, περιείχε 1 X PCR buffer B (Kapa), 0.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM από κάθε εκκινητή, 1U/ml KAPA Taq DNA polymerase (Invitrogen, UK) and 20 ng genomic DNA.

Η εκχύλιση του DNA από τα βακτήρια πραγματοποιούνταν κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας της PCR (αρχική αποδιάταξη, pre-PCR) στους 95°C για 5 min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ήταν: αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation) στους 95°C για 5 min (1^ο βήμα), αποδιάταξη στους 95°C for 30 s (2^ο βήμα), υβριδισμός (annealing) των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο στους 53°C for 30 s (3^ο βήμα), σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών (elongation) με τη βοήθεια του ενζύμου Taq πολυμεράσης στους 72°C for 20 s (4^ο βήμα) και ακολουθούσε ένα επιπλέον στάδιο τελικής επιμήκυνσης του DNA για 10 min (post-PCR) στους 72°C (5^ο βήμα). Τα βήματα 2 - 4 του θερμοκρασιακού προγράμματος της PCR επαναλήφθηκαν για 32 κύκλους. Τα προϊόντα της PCR (5 μl ανά αντίδραση) υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση (90 Volts για 30 min) σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel electrophoresis) 1 % σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/Acetate/EDTA (1xTAE), προκειμένου να επαληθευτεί ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής περιοχής DNA.

Ο έλεγχος του μήκους του προϊόντος DNA που βρίσκονταν στο πήκτωμα σε σχέση με το μήκος του DNA που πολλαπλασιάστηκε μέσω της PCR (μήκος περιοχής ανάμεσα στους 2 εκκινητές) πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια ενός μάρτυρα. Στο τέλος της

ηλεκτροφόρησης το DNA γίνονταν ορατό σε πήκτωμα αγαρόζης μέσω της εμβάπτισης αυτού σε διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής - βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύονταν στο DNA, απορροφούσε αόρατη υπεριώδη (UV) ακτινοβολία και σηματοδοτούσε με ορατή ακτινοβολία το DNA. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η ποσοτικοποίηση του DNA με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop ND-1000. Τα δείγματα DNA στέλνονταν απευθείας για αλληλούχιση (ABI Prism 3730 XL capillary sequencer by CeMIA SA, Larissa, Greece).

Ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang et al. 2000) ο οποίος έχει αναπτυχθεί από το NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση κάθε αλληλουχίας που προέκυψε από τη μελέτη, με διαθέσιμες αλληλουχίες από τις βάσεις δεδομένων του NCBI, έτσι ώστε να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς (ομοιότητα > 98%).

2.5 Μέτρηση pH

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

2.6 Οργανοληπτική ανάλυση

Σε κάθε δειγματοληψία και πριν την έναρξη των αναλύσεων πραγματοποιούνταν οργανοληπτική αξιολόγηση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πενταβάθμια κλίμακα κριτηρίων νωπότητας και αρεσκείας και αξιολογήθηκε η εμφάνιση, η οσμή και η συνεκτικότητα της σάρκας, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2406/96/ΕΚ που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

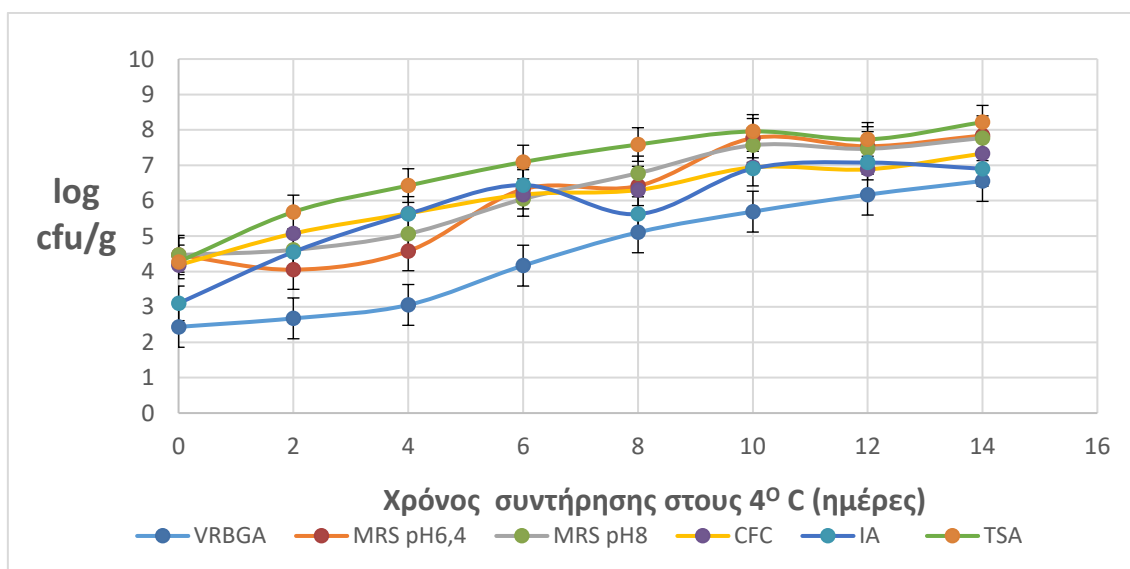
Πίνακας 2.1: :Η Πενταβάθμια κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε.

ΒΑΘΜΟΣ	ΕΜΦΑΝΙΣΗ	ΣΥΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΑΡΚΑΣ	ΟΣΜΗ	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
5	Ημιδιαφανές, γυαλιστερό	Σφικτή	Έντονα θαλασσινή	Άριστο
4	Ελαφριά έλλειψη λαμπρότητας	Λιγότερο σφικτή	Ελαφρά θαλασσινή	Καλό
3	Αισθητή απώλεια λαμπρότητας	Ελαφριά μαλακή	Ούτε θαλασσινή, ούτε δυσάρεστη	Υποβαθμισμένο, αλλά αποδεκτό
2	Θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο	Αρκετά μαλακή	Δυσάρεστη	Υποβαθμισμένο, μη αποδεκτό
1	Εξαιρετικά θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο	Πολύ μαλακή, διαλύεται	Πολύ δυσάρεστη	αλλοιωμένο

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μικροβιολογική αξιολόγηση

Οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermostata*, υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια, Enterobacteriaceae και οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS (pH 6.4), MRS (pH 8) των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αναερόβιες συνθήκες ψύξης (4 ± 1°C), παρουσιάζονται στο Γράφημα 3.1.



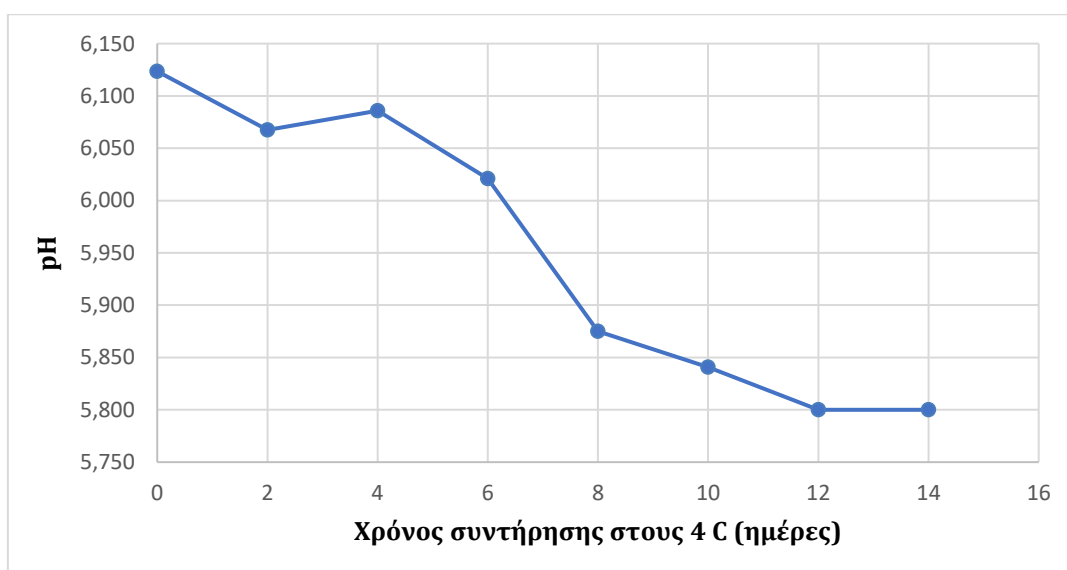
Γράφημα 3.1: Χρονική μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού ανά θρεπτικό υπόστρωμα σε συνάρτηση με τη διάρκεια συντήρησης στους 4°C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος 4 μετρήσεων και οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

Σύμφωνα με τα ανώτερο διάγραμμα την ημέρα d0, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ήταν τα επικρατέστερα βακτηρία. Πιο συγκεκριμένα, την ημέρα d0, οι πληθυσμοί των MRS (pH 6.4) και των MRS (pH 8) ήταν 4.47 log cfu/g. Τα VRBGA βακτήρια είχαν πληθυσμό 2.44 log cfu/g σχεδόν υποδιπλάσιο με τον αντίστοιχο των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Την 8η ημέρα της συντήρησης, η οποία αποτέλεσε το χρόνο απόρριψης των

φιλέτων με το κίτρινο, τα MRS(pH 8) αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό με πληθυσμό 6.78 log cfu/g. Τα MRS(pH 8) ακολουθούνταν από τα MRS (pH 6.4), τα *Pseudomonas* spp., τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα Enterobacteriaceae και με πληθυσμούς 6.42, 6.30, 5.62 και 5.11 log cfu/g αντίστοιχα. Στο πέρας της συντήρησης, τα βακτήρια MRS (pH 6.4) και των MRS (pH 8) αποτέλεσαν τους κυρίαρχους πληθυσμούς στα φιλέτα με πληθυσμούς 7.85 και 7.77 log cfu/g αντίστοιχα.

Μεταβολές του pH

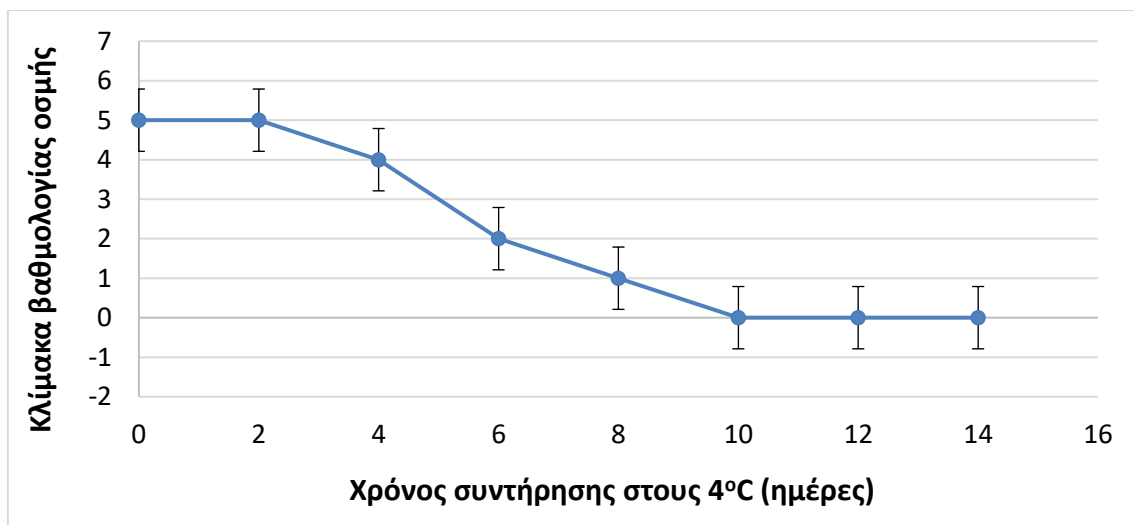
Σύμφωνα με τα αναλυτικά δεδομένα του Γραφήματος 3.2, με τη σταδιακή αύξηση του χρόνου συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας παρατηρείται σταδιακή μείωση της οξύτητας.



Γράφημα 3.2: Χρονική μεταβολή του pH σε συνάρτηση με τη διάρκεια συντήρησης στους 4oC. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος 4 μετρήσεων.

3.2 Οργανοληπτικές μεταβολές

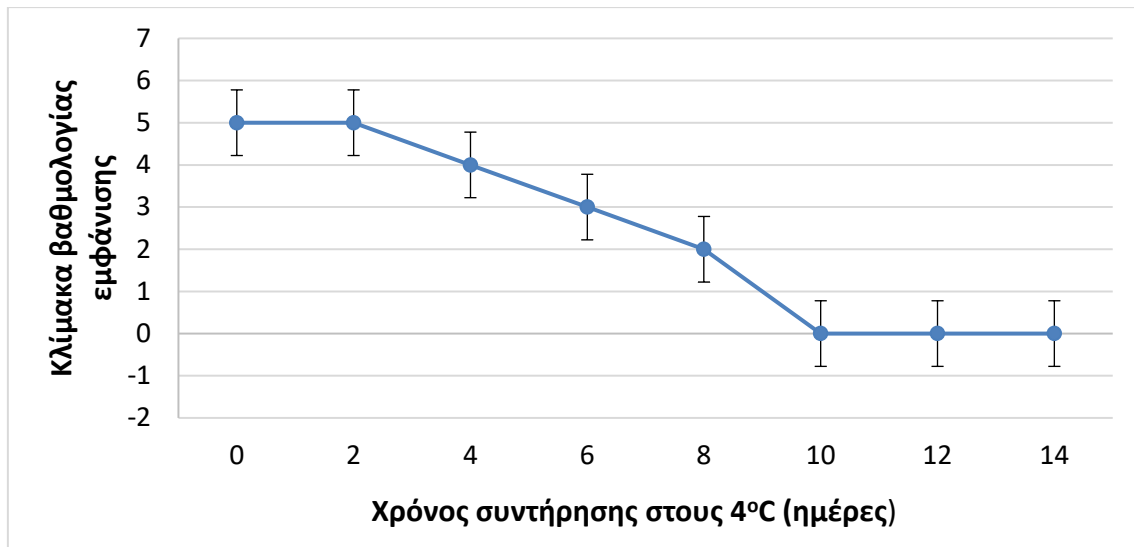
Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή, εμφάνιση, συνεκτικότητα) των φιλέτων τσιπούρας υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και σε συσκευασία υπό κενό. Τη 2^η ημέρα τα φιλέτα τσιπούρας αξιολογήθηκαν ως “Άριστα”, με βαθμό 5 σχετικά με την παράμετρο οσμή (έντονα θαλασσινή οσμή). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης άρχισε να λαμβάνει χώρα υποβάθμιση, με αποτέλεσμα την 4^η (ελαφρά θαλασσινή οσμή) χαρακτηρίζονται ως “Καλοί” με βαθμό 4. Την 6^η ως “Υποβαθμισμένο, αλλά αποδεκτό” με βαθμό 2 (ούτε θαλασσινή, ούτε δυσάρεστη οσμή). Τέλος, την 8^η (μέρα απόρριψης) οι ιχθύες είχαν πολύ δυσάρεστη οσμή που χαρακτηρίζονται “Αλλοιωμένοι” με βαθμό 1. (Γράφημα 3.3).



Γράφημα 3.3: Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της οσμής φιλέτων τσιπούρας κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (4°C). Το κάθε σημείο είναι η μέση εκτίμηση από 5 δοκιμαστές.

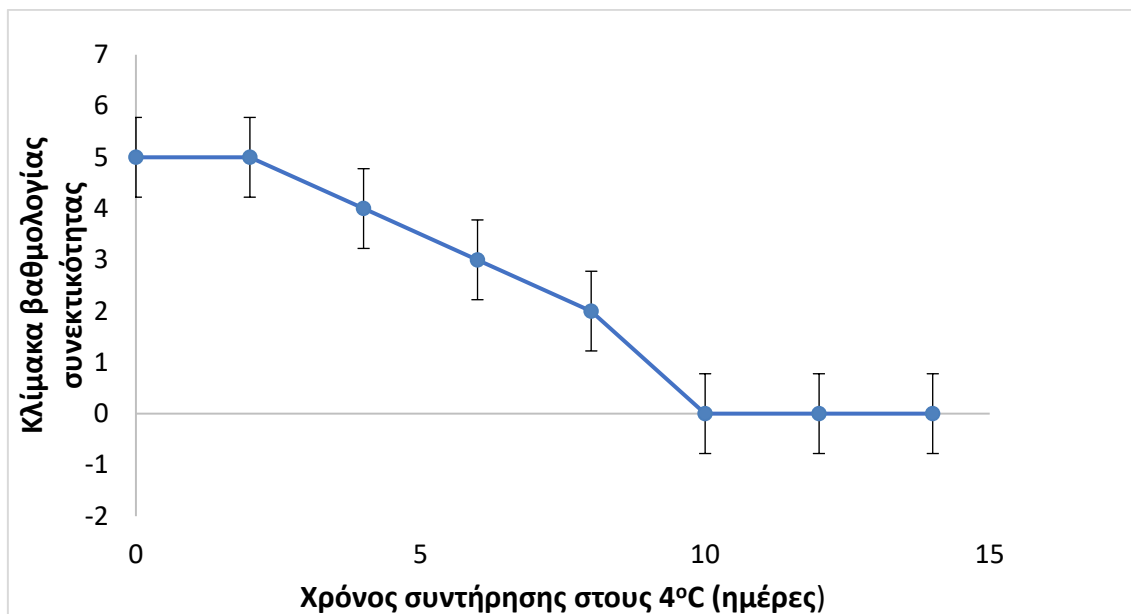
Σχετικά με την οργανοληπτική παράμετρο “εμφάνιση”, διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα διατήρησαν καλή εμφάνιση για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, περίπου 7

ημερών (Γράφημα 3.4). Από την 8^η ημέρα (ημέρα απόρριψης) και μετέπειτα η αλλοίωση έγινε σημαντικά αισθητή (θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο).



Γράφημα 3.4: Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της εμφάνισης φιλέτων τσιπούρας κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (4°C).

Τέλος, η συνεκτικότητα της σάρκας των ιχθύων ήταν πολύ καλή για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, περίπου 7 ημερών. Από την 8^η ημέρα (ημέρα απόρριψης) τα φιλέτα είχαν αρκετά μαλακή συνεκτικότητα σάρκα. (Γράφημα 3.5).



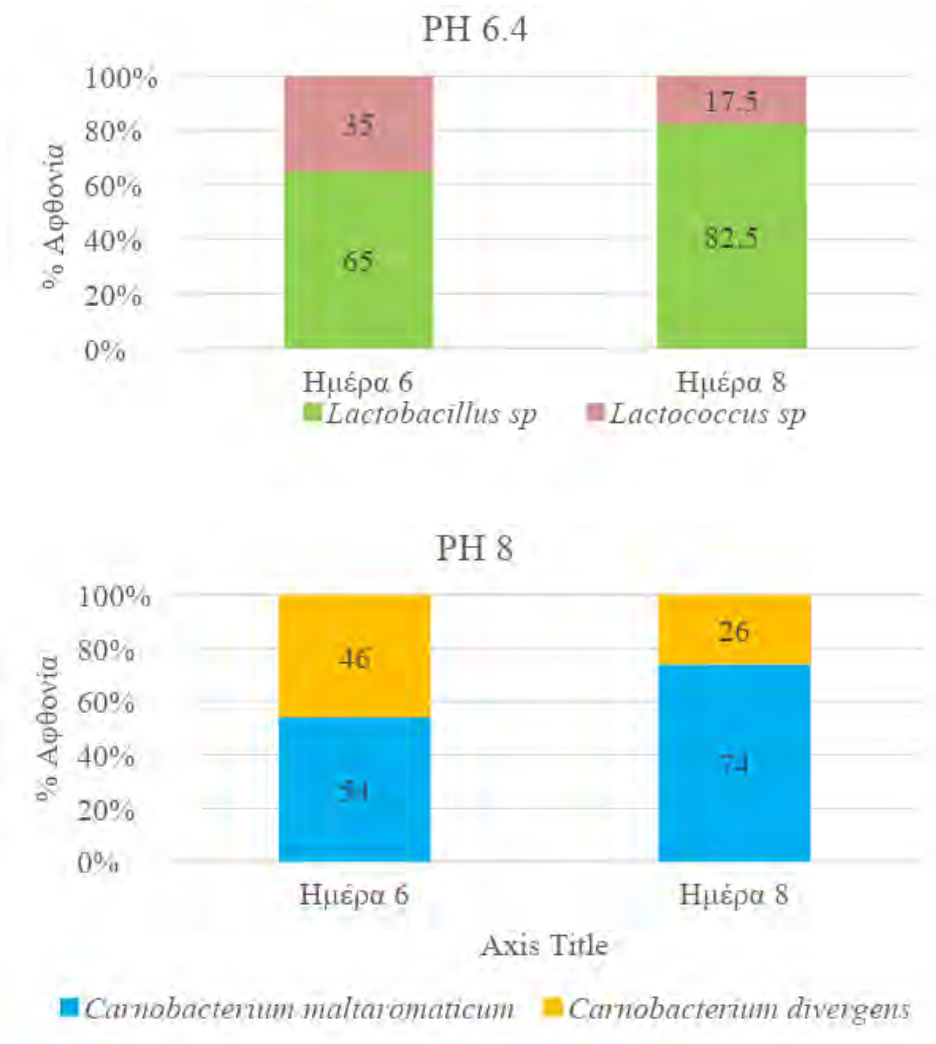
Γράφημα 3.5: Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της συνεκτικότητας φιλέτων τσιπούρας κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (4°C).

Επικρατέστεροι μικροοργανισμοί κατά τη διάρκεια της συντήρησης

Στο Γράφημα 3.6 παρουσιάζεται η αφθονία (%) των επικρατέστερων οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από θρεπτικό υλικό υπόστρωμα MRS με pH 6.4 (α) και pH 8 (β) κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτων τσιπούρας σε συσκευασία skinpack/vacuum στους 4°C με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA κατά την 6^η και 8^η ημέρα συντήρησης των φιλέτων. Από τα δεδομένα του κάτωθι σχήματος διαπιστώνεται ότι στο pH 6.4 επικρατούν γαλακτοβάκιλλοι, ενώ στο pH 8 επικρατούν τα γένη *Carnobacterium*. Ειδικότερα στο (pH 6.4) παρατηρείται διαφοροποίηση των ποσοστών των γενών στην αφθονία. Δηλαδή, την 6^η ημέρα το ποσοστό των *Lactococcus* sp. στην αφθονία είναι 35%, ενώ στην 8^η ημέρα είναι 17,5%. Την 8^η ημέρα συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας το ποσοστό των *Lactobacillus* sp είναι 82,5 % και 65% την 6^η ημέρα.

Στο pH 8 επικρατούν οι *Carnobacterium maltraromaticum* και οι *Carnobacterium divergens* σε ποσοστά 54% και 46% αντίστοιχα την 6^η ημέρα. Την 8^η

ημερά συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας το ποσοστό των *Carnobacterium .maltraromaticum* αυξάνεται κατά 20% και μειώνεται αντίστοιχα του *Carnobacterium divergens* στην αφθονία.



Γράφημα 3.6: Αφθονία (%) των επικρατέστερων οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από θρεπτικό υλικό υπόστρωμα MRS με pH 6.4 (α) και pH 8 (β) κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτων τσιπούρας σε συσκευασία *skinpack/vacuum* στους 4oC με την ανάλυση γονιδίου 16S.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο βασικός σκοπός των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων είναι η παρεμπόδιση ή εξάλειψη των παραγόντων που αλλοιώνουν και υποβαθμίζουν την ποιότητα των τροφίμων και ιδιαίτερα των ευαλλοίωτων όπως είναι τα ιχθυηρά (Ghaly et al, 2010). Ο στόχος είναι να παρεμποδισθούν οι ανεπιθύμητες μεταβολές που επιδρούν στη διατροφική αξία, στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στην υγιεινή κατάσταση των προϊόντων τα οποία τα καθιστούν ακατάλληλα για κατανάλωση.

Για την αύξηση της διατηρησιμότητας των ευαλλοίωτων τροφίμων εφαρμόζονται σήμερα φυσικές μέθοδοι επεξεργασίας που στηρίζονται στην αξιοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων όπως η αποθήκευση σε συσκευασία κενού σε συνδυασμό με χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης (ψύξη). Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, πραγματοποιήθηκε μελέτη ποιοτικών χαρακτηριστικών και μικροβιολογικών, όπως οι πληθυσμοί των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως τα *Pseudomonas* spp., υδροθειούχα βακτήρια (H_2S), οξυγαλακτικά (LAB σε MRS Agar pH 6.4 και pH 8) και Enterobacteriaceae σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας υπό κενό και συντήρηση σε συνθήκες ψύξης ($4 \pm 1^\circ C$).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκαν να αποτελούν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό στο υπό μελέτη προϊόν στην αρχή και στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναγνωριστεί ως αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των αλιευμάτων υπό συνθήκες μειωμένου ή καθόλου οξυγόνου λόγω της ζύμωσης της γλυκόζης προς σχηματισμό γαλακτικού οξέος, βλέννας, διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και αυξάνοντας τελικά το pH (Παρλαπάνη 2013). Σύμφωνα με Knøchel (1983), η μικροχλωρίδα των φιλέτων καπνιστού σολομού συσκευασμένων υπό κενό αποτελούνταν κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια μετά από 2 εβδομάδες αποθήκευσης στους $4^\circ C$.

Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Leisner et al. (1994), μετά από 18 ημέρες αποθήκευσης στους 5°C. Επικράτηση των LAB βακτήρια διαπίστωσαν και οι Leroi et al. (1998) υπό συνθήκες κενού σε ιχθύες που έχουν υποστεί κάπνιση κατά το τέλος της περιόδου αποθήκευσης. Επίσης, οι Jeppesen and Huss (1993), παρατήρησαν ότι τα LAB ήταν τα κυρίαρχα βακτήρια αλλοίωσης σε φιλέτα σολομού «gravad», και σκουμπρί συσκευασμένα υπό κενό, αποθηκευμένα για 2–4 εβδομάδες στις 5°C. Ως ειδικά αλλοιωγόνα βακτήρια των ιχθυηρών αναφέρουν και οι Arkoudelos et al. (2007) και οι Nosedo et al. (2012), τα βακτήρια LAB υπό συνθήκες κενού.

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp* ενώ ήταν τα δεύτερα επικρατέστερα μετά τα οξυγαλακτικά βακτήρια την ημέρα 0 (4,18 log cfu/g), φαίνεται πως η μεταβολή του πληθυσμού τους ήταν μικρότερη σε σχέση με τα οξυγαλακτικά και TSA βακτήρια μετά από 8 ημέρες συντήρησης (6,3 log cfu/g). Σύμφωνα με την πλειοψηφία των ερευνητών, τα *Pseudomonas spp.* αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς και κατ' επέκταση τους ΕΑΜ σε ιχθύες υπό αερόβιες συνθήκες συντήρησης (Tryfinopoulou et al. 2007). Οι Parlapani et al. (2013) και Parlapani et al. (2014) υποστηρίζουν ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί απαντώνται σε ιχθύες που αναπτύσσονται σε εύκρατα ύδατα οι οποίοι συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Επιπλέον, σύμφωνα με Dainty (1996) οι ουσίες που δίνουν τις χαρακτηριστικές οσμές σε ψάρια ευρείας κατανάλωσης όπως η τσιπούρα που αποθηκεύεται υπό αερόβιες συνθήκες, είναι προϊόντα μεταβολισμού των *Pseudomonas spp*. Τα χαμηλά επίπεδα των *Pseudomonas* στα εξεταζόμενα δείγματα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Nosedo et al. (2012) και των Devlieghere and Debevere (2000) οι οποίοι αποδίδουν το γεγονός στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των *Pseudomonas spp.* εξαιτίας του CO₂.

Τα υδροθειούχα (H₂S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), είχαν πληθυσμούς την αρχική ημέρα συντήρησης των ιχθύων κάτω από το όριο απαρίθμησης του log cfu/g, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης έφτασαν τους 5.6 log cfu/g. Σε σύγκριση με τους άλλους τους μικροοργανισμούς, οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών αυτών (IA) πιθανόν παρουσίασαν μικρότερο ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης υπό συνθήκες κενού. Οι Jørgensen et al. (1988) αναφέρουν ότι η παραγωγή των H₂S βακτηρίων ευνοείται υπό συνθήκες χαμηλών επιπέδων οξυγόνου αλλά σε περιβάλλον με αυξημένη περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα η ανάπτυξη τους παρεμποδίζεται (Jørgensen et al. 1988). Όταν η συσκευασία υπό κενό αέρα χρησιμοποιείται τότε εξαιτίας του βακτηριακού μεταβολισμού τα επίπεδα του διοξειδίου άνθρακα αυξάνονται σταδιακά εντός της συσκευασίας με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ανάπτυξη των H₂S βακτηρίων.

Αντιθέτως, οι Jørgensen and Huss (1998), αναφέρουν ότι τα υδροθειούχα βακτήρια αποτελούν τους ΕΑΜ στους ιχθύες που προέρχονται από Βόρειες Θάλασσες (π.χ. γάδος) και συντηρούνται σε αερόβιο περιβάλλον στους 0°C. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια με καινοτόμες μοριακές μεθόδους π.χ. 16 Next Generation Sequencing (Parlapani et al. 2018, Zotta et al. 2019), οι μικροοργανισμοί αυτοί απαντώνται σε πολύ μικρές αφθονίες στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων τόσο της Μεσογείου αλλά και της Βόρειας Ευρώπης, ειδικά σε προϊόντα αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae είναι συνδεδεμένα με πιθανή μόλυνση από κόπρανα ή ανεπαρκή επεξεργασία και μη επαρκή εφαρμογή των συνθηκών ορθής υγιεινής πρακτικής στην παραγωγική αλυσίδα των αλιευτικών προϊόντων. Σύμφωνα με τον Huss (1995), οι ιχθύες που προέρχονται από μολυσμένα ύδατα φέρουν μεγάλο αριθμό

βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae. Επομένως, η παρουσία των βακτηρίων αυτών στα υπό εξέταση δείγματα υποδεικνύουν ότι τα φιλέτα τσιπούρας είναι ποιοτικά υποβαθμισμένα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι πιθανό να αυξηθούν κατά τη διάρκεια της συντήρησης αλλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες αποθήκευσης.

Όσον αφορά την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, η αρχική τιμή της για τους φιλέτα ιχθύες τσιπούρας που αποθηκεύτηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες ψύξης ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) στην παρούσα μελέτη, την ημέρα 1^η (24 h), ήταν $4,27 \log \text{ cfu/g}$ υποδηλώνοντας, σύμφωνα με τους Papadopoulos et al. (2003), καλή ποιότητα σάρκας για τους φρέσκους ιχθύες που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες. Στην παρούσα μελέτη, η OMX υπερέβη τους $7.00 \log \text{ cfu/g}$ (το οποίο είναι το ανώτερο όριο αποδοχής για τους νωπούς ιχθύες) μετά την ημέρα 7.

Σε πρόσφατη μελέτη σχετικά με συντηρούμενα φιλέτα τσιπούρας υπό διάφορες συνθήκες οι Parlapani et al. (2017) διαπίστωσαν ότι η OMX υπερέβη τα $7.00 \log_{10} \text{ cfu/g}$ μετά σχεδόν από 9 ημέρες, υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging - MAP) στους 0°C . Γενικότερα, η OMX μπορεί να κυμαίνεται από 7 έως $9 \log_{10} \text{ cfu/g}$ στο σημείο οργανοληπτικής απόρριψης (Gram and Huss 1996). Οι Özrolat et al. (2014) εξέτασαν τον εμπορικό χρόνο ζωής σε λουκάνικα ψαριών από το είδος *Caroeta umbla* και διαπίστωσαν ότι το εξεταζόμενο προϊόν είχε συνολική οργανοληπτική βαθμολογία 3 μέχρι τις 21 μέρες αποθήκευσης υπό κενό αέρος, ενώ υπό αερόβιες συνθήκες είχε την ίδια βαθμολογία στις 5 μέρες αντίστοιχα υπό αερόβιες. Στα υπό εξέταση δείγματα ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας ήταν 8 ημέρες και επειδή είχαν συσκευαστεί δυο μέρες νωρίτερα, ο τελικός εμπορικός χρόνος ζωής είναι 10 μέρες. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται από τα αντίστοιχα των Anelich et al. (2001), Taheri et al. (2012), Rashidi et al. (2014), οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η

συσκευασία υπό κενό είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την καθυστέρηση της οξείδωσης των λιπιδίων λόγω έλλειψης οξυγόνου.

Ενώ η απουσία οξυγόνου έχει κριθεί από πολλούς ερευνητές ότι είναι αποτελεσματική στην επιβράδυνση της ανάπτυξης των τυπικών βακτηρίων αλλοίωσης, υπάρχει πιθανότητα το προϊόν να γίνει τοξικό αν η θερμοκρασία αποθήκευσης του δεν είναι κατάλληλη (Wilhelm, 1982). Ερευνητικές μελέτες σχετικά με τη συσκευασία νωπών ιχθυερών υπό κενό αέρα έχουν δείξει ότι στα ιχθυερά δεν ανιχνεύεται το βακτήριο *Clostridium botulinum toxin* και ως εκ τούτου οι καταναλωτές δεν κινδυνεύουν από αλλαντίαση (Bannar 1979).

Όσον αφορά τη μεταβολή του pH, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μια μείωση των τιμών του καθιστώντας την αντίδραση των συσκευασμένων φιλέτων τσιπούρας πιο όξινη. Μείωση των τιμών του pH παρατήρησαν και οι Rai et al. (2016) σε φιλέτα κυπρίνου συσκευασμένα υπό κενό αέρα σε υπερψύξη για 35 μέρες καθώς και οι Wan Norhana et al. (2010) σε τηγανισμένες μπάλες ψαριών συσκευασμένες υπό κενό. Σύμφωνα με τους Mahmoudzadeh et al. (2010) και Taheri et al. (2012) η μείωση των τιμών του pH ή και σταθεροποίηση του κατά τη συντήρηση ιχθύων υπό κενός αέρα οφείλεται στη δράση του CO₂. Οι Suvanich et al. (2000) αναφέρουν ότι η μείωση των τιμών του pH του δείγματος δύναται να οφείλεται στην μετουσίωση της μυοϊνδικής πρωτεΐνης, στην οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων, στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, ιδίως βακτηρίων γαλακτικού οξέος και στην αυξημένη ποσότητα γαλακτικού οξέος ως αποτέλεσμα της γλυκόλυσης.

Πράγματι, στην παρούσα μελέτη οι μικροοργανισμοί που επικράτησαν και πιθανώς αλλοίωσαν το προϊόν μέσω του μεταβολισμού τους ήταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (τα οποία παράγουν κυρίως οργανικά οξέα και έτσι παρατηρείται πτώση του

pH). Τα οξυγαλακτικά βακτηρία είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που αναπτύσσονται σε 5,5 - 5,8. (Casas and Dobrogosz 2000). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τα υψηλά ποσοστά αφθονίας των βακτηρίων αυτών (*Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*) σε pH (Σχήμα 8). Αντιθέτως, σε υψηλά pH επικρατούν τα είδη *Carnobacterium maltraromaticum* και οι *Carnobacterium divergens*, τα οποία αναπτύσσονται σε αλκαλικό περιβάλλον και για αυτό δεν ανιχνεύθηκαν στις όξινες συνθήκες.

Η παρούσα μελέτη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα βήμα προς τη βελτίωση των συνθηκών μετακίνησης, αποθήκευσης και γενικότερα συντήρησης της τσιπούρας με σκοπό την αύξηση του εμπορικού χρόνου ζωής του, και συνεπώς την μεγαλύτερη εξάπλωση του εμπορίου τσιπούρας στο οποίο η χώρα μας διαθέτει μια σημαντική θέση εντός και εκτός Ε.Ε. άλλα και της βιομηχανίας της συντήρησης. Τελικώς, το θέμα της συσκευασίας των ιχθυηρών σε χαμηλή θερμοκρασία και υπό κενό αέρα χρήζει περαιτέρω έρευνας και μελέτης, αφού η εφαρμογή του μπορεί να επεκταθεί και στα υπόλοιπα ψάρια εμπορικού ενδιαφέροντος.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τις μικροβιακές απαριθμήσεις και την οργανοληπτική αξιολόγηση, ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας που αποθηκεύτηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες ψύξης (4 ± 1 °C) είναι 8 ημέρες. Οι κύριοι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί στο προϊόν αυτό είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Συγκεκριμένα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια που καταμετρήθηκαν σε pH 6.4 βρέθηκαν σε υψηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους πιθανούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς αλλά και από τα οξυγαλακτικά που καταμετρήθηκαν σε pH 8. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η συσκευασία φιλέτων τσιπούρας υπό κενό αέρα σε χαμηλή θερμοκρασία δύναται να παρατείνει τον εμπορικό χρόνο ζωής τους.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Παρλαπάνη Φ. (2013). Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα. Διδακτορική διατριβή. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Anelich, L.E., Hoffman, L.C. and Swanpoel, M.J. (2001). The influence of packaging methodology on the microbiological and fatty acid pro African catfish fillets. *Journal of Applied Microbiology*.91: 22-28.
- Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M. and Yanik, T. (2004). Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*. 97, 209-214.
- Arkoudelos, J., Stamatis, N. and Samaras, F. (2007). Quality attributes of farmed eel (*Anguilla anguilla*) stored under air, vacuum and modified atmosphere packaging at 0°C. *Food Microbiology*. 24, 728-735.
- Asensio, M. A., J. A. Ordoñez, and B. Sanz. (1988). Effect of carbon dioxide and oxygen-enriched atmospheres on the shelf life of refrigerated pork packed in plastic bags. *J. Food Prot.* 51:356–360
- Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36. 87-121.
- Baird-Parker, T.C. (2000). The production of microbiologically safe and stable foods. In: Lund, B.M., T.C. Baird-Parker and G.W. Gould (eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Foods*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, USA. pp.3-18.
- Broekaert K., Heyndrickx M., Herman L., Devlieghere F., Vlaemynck G. (2011). Seafood quality analysis: molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiology*, 28: 1162-1169.
- Bozaris, I. and Parlapani, F. (2017). Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. 10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6
- Casas, Ivan A.; Dobrogosz, Walter J. (2000). Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* Confers Broad-spectrum Protection against Disease in Humans and Animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 12:247-285
- Dainty R.H. (1996) Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 19-33.

- Dalgaard, P., Gram, L. and H.H. Huss. (1993) Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283-294.
- Davies A.R. (1995) Fate of food-borne pathogens on MAP meat and fish. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 36: 407-410.
- Davies A.R. (1997) Modified-atmosphere packaging of fish and fish products. In: Hall, G.M. (ed.) *Fish processing technology*. 2nd edition, Blackie Academic & Professional, London, pp 200-223.
- Day V.K. (2003). *Seafood Packaging and Presentation Undergo a Transformation*. INFOFISH International, 33-36.
- Devlieghere, Frank & Debevere, Johan. (2000). Influence of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Spoilage Bacteria. *LWT - Food Science and Technology*. 33. 531-537.
- Dondero, M., Cisternas, F., Carvajal, L., and Simpson, R. (2004). Changes in quality of vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chem.* 87: 543–550
- Etemadian, Y., Shabanpour, B., Sadeghi Mahouk, A. R., Shabani, A., & Dordai, M. (2012). The effect of vacuum packaging on the chemical, microbial and sensory properties of *Rutilus frisii kutum* fillets, stored in ice. *Iranian Journal of Food Science and Technology Researches*, 7(4), 298–304
- FAO (2020).
- Farber J.M. (1991) Microbiological aspects of modified atmosphere packaging
- FEAP, (2020).
- Gennari, M., Tomaselli, S., Cotrona, V., (1999). The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. *Food Microbiol.* 16, 1528.
- Ghaly, A.E. & Vasudevan Ramakrishnan, Vegneshwaran & Brooks, M.S. & Budge, S.M. & Dave, Deepika. (2010). Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 5. 107-129. 10.4172/1948-5948.1000110.
- Gram and Dalgaard (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13. 262-266.
- Gram, L. and Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33. 121-137.
- Gram, L., (2009). Microbiological spoilage of fish and seafood products. In: Spenser, W.H., Doyle, M.P. (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Food and Beverages*. Springer Science, New York, NY, pp. 871-19.
- Gram, L., Trolle, G. and Huss, H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4:65-72.
- Hansen, P. (1972). Storage life of prepackaged wet fish at 0°C. *Trout and Herring*. *Journal of Food Microbiology*, 7 : 21-26.
- Harbell, S., (1988). Controlling seafood spoilage. In: *Seafood Retailing Series*, Washington Sea Grant, Seattle, pp. 1–7.

- Huss HH, Jørgensen LV and Vogel BF. (2000) Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology* 62: 267-274.
- Huss, H.H. (1972). Storage life of prepacked wet fish at 0°C. Plaice and Haddock, *Journal of Food Microbiology* 7 : 13-19.
- Huss, H.H. (1995). Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO Fisheries Series, Technical Paper, No. 348. 195 p. Rome, Italy: FAO
- Jeppesen, V.T., Huss, H.H., (1993). Characteristic and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 18, 305–320.
- Jeppesen, V.T., Huss, H.H., (1993). Characteristic and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. *International Journal of Food Microbiology* 18, 305- 320
- Jørgensen, B. R. and Huss, H. H. (1989). Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology* 9. 51-62. Jørgensen, B. R., Gibson, D. M., Huss, H. H. (1988). Microbiological quality and shelf-life prediction of chilled fish. *International Journal of Food Microbiology* 6. 295-307.
- Jørgensen, B. R., Gibson, D. M., Huss, H. H. (1988). Microbiological quality and shelf-life prediction of chilled fish. *International Journal of Food Microbiology* 6. 295-307.
- Kakouri, A., Drosinos, E.H. and Nychas, G.J.E. (1997). Storage of Mediterranean Fresh Fish (*Boops boops* and *Sparus aurata*) under Modified Atmospheres or Vacuum at 3 and 10°C. In *Seafood from Produce to Consumer, Integrated Approach to Quality; Proceedings*. Amsterdam: Elsevier Science
- Knochel, S., (1983). Fermented fish products in Scandinavia. *Korea Journal of Applied Microbiology and Bioengineering* . 11, 347–35
- Knøchel, S.,(1983). Fermented fish products in Scandinavia. *Kor. Applied Microbiology and Bioengineering*:11, 347-351.
- Korkeala H., Alanko T., Makela P., Lindroth S. (1989). Shelf-life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 9, 237-247.
- Kostaki M., Giatrakou V., Savvaidis I. N., Kontominas M.G. (2009) Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, 26: 475–482.
- Koutsoumanis K., and Nychas, G-J.E. (1999). Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0,3,7 and 10°C. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 698-706
- Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. (1999). Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10 degrees. *Applied and environmental microbiology*, 65, 698–706.
- Kumar P and Ganguly S .(2014). Role of vacuum packaging in increasing shelf-life in fish processing technology. *Asian Journal of Biological Sciences* 9(1), 109-112.

- Leisner, J.J., Millan, J.C., Huss, H.H., Larsen, C.M.,(1994). Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged sugarsalted fish. *Journal of Applied Bacteriology*. 76, 417-423.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology* 39. 111-121.
- Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X., Li, X., Zhao, J. (2012). Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chemistry* 135. 140-145.
- Liston, J. (1980). Microbiological in fishery science. In :*Advance in fish science and technology*, Connell J.J. (Ed.), p: 138-157. Fishing newsbooks Ltd., England.
- Liston, J., (1980). Microbiology in fishery science. In: Connell, J.J., Staff of Torry Research Station (Eds.), *Advances in Fish Science and Technology*. Fishing News Books, Farnham, Surrey, pp. 138-157.
- Lyhs, U., Lahtinen, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Hyytia-Trees, E., Elfing, K., & Korkeala, H. (2001). Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout stored at 3 and 8 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 221-230.
- Mahmoudzadeh, M., Motallebi A.A., Hosseini, H., Haratian, P., Ahmadi, H., Mohammadi, M. and Khaksar R., (2010). Quality assessment of fish burgers from deep flounder (*Pseudorhombus elevatus*) and brushtooth lizardfish (*Saurida undosquamis*) during storage at - 18°C. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(1), 111-126
- Martinez N., Martin M.C., Herrero A., Fernandez M., Alvarez M.A., Ladero V. (2011).qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Review. Food Science and Technology*, 22: 367-376.
- Mohan CO, Ravishankar CN, Srinivasa GTK. Packaging interventions in low temperature preservation of fish-a review. *MOJ Food Process Technol*. 2016;2(1):13-25.
- Nosedá B. Md. Tariqul Islam, Markus Eriksson , Marc Heyndrickx , Koen De Reu ,Herman Van Langenhove, Frank Devlieghere (2012). Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese Pangasius hypophthalmus filets. *Food Microbiology* 30,408-419
- Özpolat E. Patır B. ; Guran H. Ş. ; and Gul M. R. (2014). Effect of vacuum-packing method on the shelf – life of Capoeta umbla sausages. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 13,178-184
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology* 20. 411-420.
- Parlapani F.F., Haroutounian S.A., Nychas G-J.E & I.S. Boziaris (2015b). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass
- Parlapani F.F., Kormas K.Ar. & I.S. Boziaris (2015a). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. 'Journal of the Science of Food and Agriculture' DOI 10.1002/jsfa.6957

- Parlapani F.F., Malouchos A., Haroutounian S.A. & I.S. Boziaris (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189, 153–163.
- Parlapani FF, and IS Boziaris (2016). Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT-Food Science and Technology*, [66](#), 553-55
- Parlapani, F. F., Kormas, K. Ar, and Boziaris, I. S. (2015a). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 2386—2394.
- Parlapani, F. F., Malouchos, A., Haroutounian, S. A., and Boziaris, I. S. (2014b). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 189: 153—163.
- Parlapani, F. F., Malouchos, A., Haroutounian, S. A., Boziaris, I. S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189. 153-163.
- Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, K. Ar., Boziaris, I. S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology* 33. 85-89.
- Parlapani, F. F., Michailidou, S., Anagnostopoulos, D. A., Koromilas, S., Kios, K., Pasentsis, K., et al. (2019). Bacterial communities and potential spoilage markers of whole blue crab (*Callinectes sapidus*) stored under commercial simulated conditions. *Food Microbiol.* 82, 325–333. doi: 10.1016/j.fm.2019.03.011
- Parlapani, F. F., Michailidou, S., Anagnostopoulos, D. A., Sakellariou, A. K., Pasentsis, K., Psomopoulos, F., et al. (2018). Microbial spoilage investigation of thawed common cuttlefish (*Sepia officinalis*) stored at 2°C using next generation sequencing and volatilome analysis. *Food Microbiol.* 76, 518–525. doi: 10.1016/j.fm.2018.08.004
- Parlapani, F.F. and I.S. Boziaris (2016). Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures LWT - Food Science and Technology. *66*: 553—559.
- Parlapani, F.F., A. Mallouchos, S.A. Haroutounian, and I.S. Boziaris (2017). Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria. *Food Science and Technology* , 78:54-62 .
- Pastoriza L., Sampedro G., Herrera J.J., Cabo M.L. (1998) Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slices of hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chemistry*, 61:23-28.
- Raj, Sonia & Gandotra, Roopma & Sharma, Monika & Kumari, Ritu. (2019). Studies on the effect of vacuum packaging on biochemical and microbial quality

- of frozen stored muscle of common carp, *Cyprinus carpio*. 10.13140/RG.2.2.30266.03529.
- Rajesh, R., Ravi Shankar, C.N., Srinivasa Gopal, T.K. and Varma, P.R.G. (2002). Effect of vacuum packaging and sodium acetate on the shelf life of seer fish during iced storage. *Packaging Technology Science*, 15: 241-245
 - Rashidi, Yunes & Javaheri Baboli, Mehran & Askary Sary, Abolfazl. (2014). Effect of vacuum packaging on quality changes of refrigerated *Jinga* shrimp *Metapenaeus affinis* muscle. *AAFL Bioflux*. 4. 311-319..
 - Rutherford, T.J., Marshall, D.L., Andrews, L.S., Coggins, P.C., Schilling, M.W. and Gerard, P. (2007). Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. *Food Microbiology*. 24, 703-710
 - Sacchi, Claudio & Whitney, Anne & Mayer, Leonard & Morey, Roger & Steigerwalt, Arnold & Boras, Arijana & Weyant, Robin & Popovic, Tanja. (2002). Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging infectious diseases*. 8. 1117-23.
 - Shalini R, Jasmine G I, Shanmugam S A and Ramkumar K (2000). Sodium Acetate and Vacuum Packaging to Improve Shelf Life of Refrigerated *Lethrinus lentjan* Fillets. *Fishery Technology* 37,8 – 14.
 - Skandamis P. N., Nychas G.-J. E. (2002) Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 35– 45.
 - Srinivasa Gopal, T.K., Joseph, J. and Balachandran, K.K. (1999). Development of fish products employing hurdle technology., In :*Preservation of food by Hurdle Technology*. P, 93-103., DFRL, Mysore(KARNATAKA) INDIA.
 - Stamatis, N., & Arkoudelos, J. (2007). Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food Control*, 18, 292-300
 - Suvanich, V., Jahncke, M. and Marshall, D., (2000). Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage. *Journal of Food Science*, 65, 24- 29.
 - Svanevik, C.M., Lunestad, B.T., (2011). Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *International Journal of Food Microbiology*, 151, 164-170.
 - Taheri, S. and Motallebi, A.A. (2012). Influence of vacuum packaging and long term storage on some quality parameters of *Cobia* (*Rachycentron canadum*) fillets during frozen storage. *American-Eurasian J.Agric. & Environ. Sci.*, 12(4): 541-547.
 - technology-a review. *Journal of Food Protection*, 54: 58-70.
 - Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Vancanneyt M., Hoste B., Swings J., Nychas G.- J. E. (2007). Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 711-721.
 - Wan Norhana M.N. , Susan E. Poole , Hilton C. Deeth , Gary A. Dykes (2010). Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review, *Food Control* 21, 343–361 Wilhelm, K. A. (1982). Extended fresh storage of fishery products with modified atmospheres: a survey. *Marine Fish Review*. 44, 17-20.

- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7:203–214.
- Zotta T., Eugenio Parente, Rocco Gerardo Ianniello, Francesca De Filippis, Annamaria Ricciardi, (2019). Dynamics of bacterial communities and interaction networks in thawed fish fillets during chilled storage in air. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 102-113.

Ιστότοποι

- Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιέργειών (ΣΕΘ) :Η Ελληνική υδατοκαλλιέργεια 2019 (https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM_19_GR_WEB_Spreads%283%29.pdf.)