

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ

ΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιολογικές και ιστολογικές μεταβολές σάρκας λαυρακιού μετά
από κατάψυξη και απόψυξη»**

Λαζάρου Βασιλική

ΒΟΛΟΣ 2020



**«Μικροβιολογικές και ιστολογικές μεταβολές σάρκας λαβρακιού μετά από κατάψυξη
και απόψυξη»**

(Microbiological and histological changes of gilt-head sea bass after freezing and thawing)



Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1. Ιωάννης Μποζιάρης**, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**
- 2. Παναγιώτης Βερίλλης**, Αν. Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**
- 3. Φωτεινή Παρλαπάνη**, Επικ. Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς τον κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την υποστήριξη, τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του στο στερεοσκόπιο και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καθώς και την κα. Φωτεινή Παρλαπάνη για την συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο τότε διδάκτορα κ. Σωτήρη Οικονόμου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία πεδίο έρευνας υπήρξαν αποψυγμένοι ιχθύες λαβρακιού. Φιλέτα από λαβράκι μελετήθηκαν νωπά και στην συνέχεια καταψύχθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα με σκοπό την σύγκριση τους. Η σύγκριση έγινε σε δύο στάδια, πρώτα με μικροβιολογική ανάλυση και στην συνέχεια ιστολογικά με την χρήση στερεοσκοπίου και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Σκοπός της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός αλλαγών, εφόσον υπάρχουν, στην σάρκα των ιχθύων ώστε να προσφέρουν μια γρήγορη μέθοδο για ανίχνευση εξαπάτησης πώλησης αποψυγμένου ψαριού ως νωπού.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στο μικροβιακό προφίλ των ιχθύων καθώς η ολική μικροχλωρίδα βρέθηκε σε επίπεδα 2,4-5,3 log cfu/gr. Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas sp.* βρέθηκαν σε πληθυσμούς της τάξεως των 2,6-5,2 log cfu/g, τα οξυγαλακτικά 2-5,3 log cfu/g ενώ τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae και τα βακτήρια που παράγουν H₂S βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης 1 log cfu/g. Αλλαγές στην σάρκα του λαβρακιού δεν ήταν εμφανής στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και οι μετρήσεις των αποστάσεων των μυομερών που λήφθηκαν από το στερεοσκόπιο δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

Λέξεις κλειδιά:

λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*, μικροβιακή αλλοίωση, στερεοσκόπιο, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κατάψυξη, απόψυξη



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1	Αλλοίωση Ιχθύων	7
1.1.1	Μικροβιακή Αλλοίωση Ιχθύων	8
1.1.2	Μη Μικροβιακή Αλλοίωση Ιχθύων	9
1.2	Κατάψυξη	10
1.3	Απόψυξη	11
1.4	Η Βιολογία του Λαυρακιού	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.5	Σκοπός της εργασίας.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
2.1	Διαδικασία Εξέτασης Δειγμάτων	14
2.2	Μικροβιολογική Ανάλυση	15
2.2.1	Μικροβιολογικά Υλικά	15
2.2.2	Απαρίθμηση Μικροβιακών Πληθυσμών	15
2.3	Στερεοσκόπιο	17
2.4	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	17
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	19
3.1	Μικροβιακοί Πληθυσμοί	19
3.1.1	Λαβράκι 1 (κατάψυξη 10 ημερών)	19
3.1.2	Λαβράκι 2 (κατάψυξη 36 ημερών)	21
3.1.3	Λαβράκι 3 (κατάψυξη 63 ημερών).....	24



3.2 Παρατήρηση του Μυϊκού Ιστού των Αποψυγμένων Φιλέτων με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.....	26
3.3 Παρατήρηση της Μεταβολής των Μυομερών του Μυϊκού Ιστού των Αποψυγμένων Φιλέτων.....	27
□ Λαβράκι 1 (κατάψυξη 10 ημερών)	28
□ Λαβράκι 2 (κατάψυξη 36 ημερών)	29
□ Λαβράκι 3 (κατάψυξη 63 ημερών)	30
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	31
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	34
Βιβλιογραφία	35
ABSTRACT	40
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	41



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ζήτηση για ψάρια και θαλασσινά έχει παρουσιάσει ραγδαία άνοδο τις τελευταίες δεκαετίες παγκοσμίως ως απόρροια της αύξησης του πληθυσμού της Γης, με αποτέλεσμα η αλιεία να μη μπορεί να ανταπεξέλθει σε ικανοποιητικό βαθμό. Η υδατοκαλλιέργεια είναι ένας από τους σημαντικότερους και συγχρόνως οικονομικότερους τρόπους παραγωγής τροφίμων για να προσφέρεται στην αγορά η απαιτούμενη ποσότητα ιχθύων με στόχο την κάλυψη της ζήτησής τους. Εντούτοις, η διαφορά στην τιμή πώλησης ενός νωπού με ένα κατεψυγμένο τρόφιμο οδηγεί πολλές φορές στην πώληση αποψυγμένων ιχθύων και θαλασσινών ως φρέσκα εξαπατώντας έτσι τους καταναλωτές.

Γενικότερα γνωρίζουμε πως η κατανάλωση αλιευμάτων είναι ωφέλιμη στον ανθρώπινο οργανισμό, όμως με την μαζική παραγωγή που υπάρχει τις τελευταίες δεκαετίες είναι πολύ πιθανό η ποιότητά τους να μην είναι η καλύτερη. Οι καταναλωτές προτιμούν φρέσκα ψάρια, οδηγώντας στην ανάγκη για μια ταχεία, μη καταστρεπτική και οικονομικά αποδοτική μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξασφαλιστεί η σωστή επισήμανση των κατεψυγμένων-αποψυγμένων ψαριών και θαλασσινών. Για την αποφυγή νοθείας στην πώληση των αλιευμάτων χρειάζονται οι ποιοτικοί έλεγχοι, καθώς και η εύρεση μεθοδολογιών ανίχνευσης της, ώστε ο καταναλωτής να είναι ενημερωμένος για το τρόφιμο που επιλέγει.

1.1 Αλλοίωση Ιχθύων

Τα νωπά αλιεύματα είναι εξαιρετικά ευαλλοιώτα τρόφιμα, επιρρεπή σε αλλοίωση κατά τη διαχείριση, επεξεργασία, μεταφορά, συσκευασία και αποθήκευση. Αλλοίωση ενός τροφίμου γενικότερα εννοούμε την υποβάθμιση της ποιότητας του όσον αφορά τα



οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (π.χ. αλλαγές στο χρώμα, στην οσμή και γεύση) με αποτέλεσμα να μην μπορεί να καταναλωθεί από τον άνθρωπο. Η αλλοίωση μπορεί να προέλθει από τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, τη δράση ενδογενών ένζυμων του τροφίμου (αυτόλυση, ενζυμική αμαύρωση των καρκινοειδών), χημικές αντιδράσεις, προσβολή από έντομα ή και τρωκτικά (Ashie et al., 1996; Gram and Huss, 1996; Huis in't Veld, 1996). Αμέσως μετά το θάνατο, η αυτόλυση που προκύπτει από τη δράση των ενδογενών ενζύμων, προκαλεί την αρχική απώλεια της χαρακτηριστικής οσμής και της γεύσης των ιχθύων και στην συνέχεια μαλακώνει την σάρκα (Huss, 1995; Ashie et al., 1996). Η χημική οξείδωση των λιπών, αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς αλλοίωσης, ιδιαίτερα στα λιπαρά ψάρια. Όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί αλλοίωσης δρουν σχεδόν ταυτόχρονα προκαλώντας την ποιοτική υποβάθμιση των αλιευμάτων. Ωστόσο, τα νωπά και ελαφρώς διατηρημένα θαλασσινά αλλοιώνονται κυρίως λόγω της δράσης των μικροοργανισμών. Για προϊόντα στα οποία η μικροβιακή ανάπτυξη καθυστερεί ή αναστέλλεται, οι μη-μικροβιακοί μηχανισμοί παίζουν πιο καθοριστικό ρόλο (Bozianis, 2014).

1.1.1 Μικροβιακή Αλλοίωση Ιχθύων

Η μικροβιολογική αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να πάρει ποικίλες μορφές, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών, η οποία τελικά γίνεται αντιληπτή μέσω των μεταβολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων (Gram and Huss 1996). Ωστόσο, μόνο ένα μέρος από τους μικροοργανισμούς αυτούς είναι ικανό να αναπτυχθεί στα τρόφιμα και να



φτάσει σε σχετικά μεγάλους πληθυσμούς. 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). Ο πληθυσμός των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης είναι συνήθως της τάξεως του 10^7 - 10^8 cfu/g (Dalgaard, 2003).

Διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες, θερμοκρασία θάλασσας, εποχιακές μεταβολές και επεξεργασία (φιλέτα, κ.λπ.) επηρεάζουν την αρχική μικροχλωρίδα (Gram & Huss, 1996), η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τους παρατηρούμενους ρυθμούς ανάπτυξης που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας επιλεκτικά μέσα. Η αρχική φυσική μικροχλωρίδα των νωπών αλιευμάτων που προέρχονται από εύκρατα νερά συνήθως αποτελείται από διάφορα ψυχρότροφα Gram-αρνητικά βακτήρια όπως *Pseudomonas*, *Shewenella*, *Acinetobacter* and *Flavobacterium*, ενώ η κυρίαρχη μικροχλωρίδα αλλοίωσης είναι οι *Pseudomonas* και *Shewenella*. (Gram and Dalgaard, 2002; Koutsoumanis and Nychas, 2000; Koutsoumanis et al., 1999; Leisner and Gram, 1999, Parlapani et. al., 2012). Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, αποτελούν τους πιο σημαντικούς μικροοργανισμούς κατά την αερόβια συντήρηση των ιχθυών. Οι *Pseudomonas* spp. έχουν αναγνωριστεί ως ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (Koutsoumanis and Nychas 2000, Parlapani et al. 2013, Parlapani et al., 2015a; Parlapani and Boziaris, 2016).

1.1.2 Μη Μικροβιακή Αλλοίωση Ιχθύων

Η ποιοτική υποβάθμιση των νωπών αλιευμάτων σε αρχική φάση οφείλεται κυρίως στις μεταθανάτιες μεταβολές και στη δράση των ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) των ιστών. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται διάσπαση των πρωτεϊνών και των λιπών της σάρκας από πρωτεάσες. Σημαντικότερες πρωτεάσες αποτελούν οι καθειψίνες, οι καλπαίνες και οι



κολλαγονάσες. Τα προϊόντα διάσπασης των πρωτεϊνών και του λίπους, που προκύπτουν από τις παραπάνω βιοχημικές επεξεργασίες, προσδίδουν στη σάρκα δυσάρεστη οσμή και γεύση. (Βαρελτζής, 2000). Στα κατεψυγμένα προϊόντα η υποβάθμιση οφείλεται κυρίως σε χημική και ενζυματική δραστηριότητα (Boziaris 2014). Μετέπειτα ο μικροβιακός πληθυσμός αυξάνεται με αποτέλεσμα να είναι η κύρια αιτία αλλοίωσης.

1.2 Κατάψυξη

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που αφορά την συντήρηση των αλιευμάτων είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης. Παρατηρείται ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνεται επιβράδυνση της ανάπτυξης της μικροβιακής χλωρίδας των ιχθύων, πράγμα το οποίο επηρεάζει κατά μεγάλο βαθμό την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων σε γενικό πλαίσιο. Πιο συγκεκριμένα, για την επίτευξη μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος διατήρησης των αλιευμάτων, καθώς και για την μεταφορά τους μεταξύ μεγάλων αποστάσεων καθίσταται απαραίτητη η άμεση ψύξη ή κατάψυξη τους. Η συντήρηση με κατάψυξη επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες από -18 έως -40° C. Η πολύ χαμηλή θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα την κρυστάλλωση του μυϊκού ιστού των αλιευμάτων με αποτέλεσμα οι ιχθύες να υπόκεινται κάποιες αλλοιώσεις. Το νερό στο μυϊκό ιστό βρίσκεται δεσμευμένο ή ελεύθερο. Η ποσότητα νερού, που περιέχει η σάρκα των ιχθύων, βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο μυϊκό ιστό. Αν η σάρκα υποστεί μια οποιαδήποτε επεξεργασία (κατάψυξη, θέρμανση, ξήρανση κτλ.), τότε η αναλογία μεταξύ των δύο ειδών νερού (δεσμευμένο- ελεύθερο) μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεταβολές στην υφή της (Βαρελτζής, 1999). Οι φυσικές αυτές μεταβολές οδηγούν στη δημιουργία παγοκρυστάλλων κατά την κατάψυξη προκαλώντας μηχανικές πιέσεις στα κύτταρα των



ιστών. Στις χαμηλές θερμοκρασίες, όπως επίσης και με αλλαγές θερμοκρασίας της κατάψυξης εμφανίζεται το φαινόμενο της επανακρυσταλλοποίησης καθώς παρατηρείται αλλαγή στο σχήμα και το μέγεθος των κρυστάλλων. Τέλος παρατηρείται μερική μετουσίωση των πρωτεϊνών μειώνοντας την ικανότητα της σάρκας να συγκρατήσει νερό με αποτέλεσμα την αποβολή οπού κατά την απόψυξη.

1.3 Απόψυξη

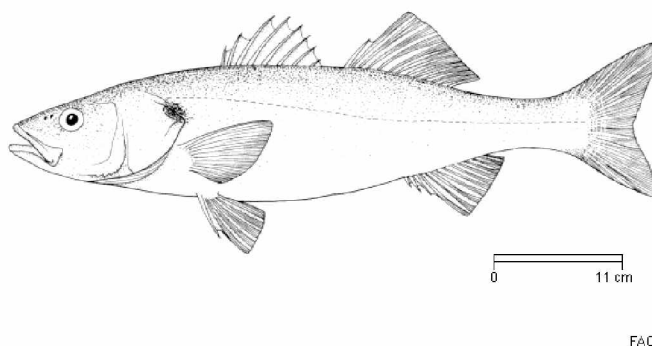
Η απόψυξη αποτελεί πρωταρχική και απαραίτητη διεργασία για ένα τρόφιμο προκειμένου να καταναλωθεί. Συνεπώς και για να παρατηρηθεί το κατεψυγμένο αλιεύμα, ώστε να διαπιστωθεί η σύστασή του, οι βιολογικές δομές του, η θρεπτική του αξία και γενικότερα οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία ή συντήρηση με άλλες μεθόδους. Η πιο απλή μέθοδος απόψυξης είναι η τοποθέτηση του προϊόντος σε θερμοκρασία δωματίου ολονυχτίς. Η διαδικασία αυτή είναι προτιμότερο να γίνεται είτε σε θερμοκρασία ψυγείου (4° C), είτε σε τρεχούμενο κρύο νερό, για να ελαχιστοποιηθεί η ανάπτυξη βακτηρίων στην επιφάνια. Οι μέθοδοι απόψυξης μπορεί να είναι θερμικές ή ηλεκτρικές. Στην πρώτη κατηγορία συμπεριλαμβάνεται η απόψυξη με αέρα και με νερό όπως και στο κενό. Όσον αφορά τις ηλεκτρικές μεθόδους απόψυξης μπορούν να επιτευχθούν μέσω των μικροκυμάτων, με ηλεκτρικές αντιστάσεις ή με διηλεκτρική απόψυξη.

1.4 Η Βιολογία του Λαυρακιού

Το λαβράκι (Εικόνα 1) ανήκει στους οστεϊχθύς της τάξης *Perciformes*, της οικογένειας των *Moranidae* και του γένους *Dicentrarchus*. Η επιστημονική του ονομασία είναι «*Dicentrarchus labrax*» (Linnaeus, 1758). Εντοπίζεται κυρίως στη Μεσόγειο και στη



Μαύρη θάλασσα όπως επίσης επεκτείνεται στον ανατολικό Ατλαντικό από την Νορβηγία ως το Μαρόκο και την Σενεγάλη. Από ανατομικής πλευράς, το μήκος του φτάνει ως ένα μέτρο και το βάρος του κυμαίνεται από 12 έως 14 κιλά. Έχει γκρι και ασημί χρωματισμούς ενώ στην παρυφή του βραγχοκαλύμματός του διακρίνεται μια μαύρη κηλίδα. Είναι σαρκοφάγο είδος πολύ αρπακτικό και λαίμαργο και τρέφεται με ποικιλία ψαριών, καλαμάρια, σουπιές και οστρακοειδή. Όσον αφορά το κομμάτι των ιχθυοκαλλιεργειών το *D. labrax* είναι ένα από τα πρώτα και κύρια ψάρια εκτροφής που καλλιεργήθηκαν στην Ευρώπη και αυτή την στιγμή αποτελεί το σημαντικότερο εμπορικό ψάρι της Μεσογείου. Η Ελλάδα, η Τουρκία, η Ιταλία, η Ισπανία, η Κροατία και η Αίγυπτος εντοπίζονται ως οι μεγαλύτεροι παραγωγοί του συγκεκριμένου είδους (FAO).



Εικόνα 1 Ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). (Από FAO)

1.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να παρατηρήσουμε τις αλλοιώσεις που υφίστανται τα αλιεύματα λαυρακιού κατά την κατάψυξη και απόψυξη τους. Πιθανές



ιστολογικές μεταβολές θα μπορούσαν να προσφέρουν μια γρήγορη μέθοδο για ανίχνευση εξαπάτησης πώλησης αποψυγμένου ψαριού ως νωπού. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις που αφορούν το μικροβιολογικό προφίλ νωπών και αποψυγμένων φιλέτων καθώς και τις ιστολογικές μεταβολές τους.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Διαδικασία Εξέτασης Δειγμάτων

Στα πλαίσια της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν λαβράκια βάρους περίπου 500 gr τα οποία προμηθευτήκαν από αγορά του Βόλου τον Μάρτιο του 2017 και μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο του εργαστηρίου Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Η διαδικασία ξεκίνησε με τα δείγματα σε νωπή μορφή και ακολούθησε η κατάψυξη και απόψυξή τους για την περαιτέρω ανάλυση. Τα ψάρια αφού φιλεταρίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, μελετήθηκαν τόσο νωπά όσο και μετά την απόψυξη τους. Το κάθε λαβράκι αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασίες κατάψυξης (-20°C) για διαφορετικό χρονικό διάστημα. Από τα φιλέτα των ιχθύων έγινε δειγματοληψία τριών δειγμάτων βάρους 15 g από κάθε ψάρι με σκοπό τον μικροβιολογικό έλεγχο. Στην συνέχεια λήφθηκαν δύο δείγματα μεγέθους 2 cm : 4 cm και πάχους 1cm για παρατήρηση στο στερεοσκόπιο, ενώ για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (SEM) λήφθηκε δείγμα πλάτους 1 cm, μήκους 1 cm και πάχους 0,5 cm. Την πρώτη ημέρα του πειράματος μελετήθηκαν όλα τα δείγματα νωπά και στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στη κατάψυξη. Το «Λαβράκι 1» αποθηκεύτηκε για 10 ημέρες ενώ τα «Λαβράκι 2» και «Λαβράκι 3» για 36 και 63 ημέρες αντίστοιχα. Η απόψυξη των δειγμάτων μετά το πέρας των αντίστοιχων ημερών πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία ψύξης στους 4°C για χρονικό διάστημα $24^{\text{ωv}}$ ωρών. Σκοπός της διαδικασίας αυτής υπήρξε η σύγκριση των αποτελεσμάτων των νωπών ιχθύων με τα αποψυγμένα προκειμένου να παρατηρηθεί εάν υπάρχουν μεταβολές ανάμεσα σε ένα νωπό και ένα αποψυγμένο φιλέτο λαυρακιού.



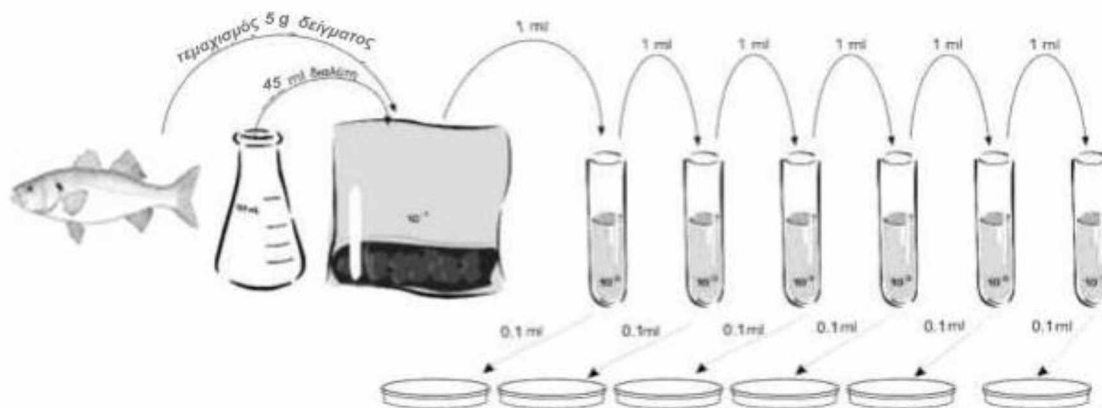
2.2 Μικροβιολογική Ανάλυση

2.2.1 Μικροβιολογικά Υλικά

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK). Το Iron Agar (IA) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram et al. (1987) όπως περιγράφεται παρακάτω: peptone 20 $g l^{-1}$, meatextract 3.0 g, yeastextract 3.0 $g l^{-1}$, ferric citrate 3.0 $g l^{-1}$, sodiumthiosulphate 0.3 $g l^{-1}$, NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 $g l^{-1}$ agar 14 $g l^{-1}$. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.4.

2.2.2 Απαρίθμηση Μικροβιακών Πληθυσμών

Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα των 5g εις τριπλούν από το κάθε λαβράκι. Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ειδικά αποστειρωμένη σακούλα Stomacher (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK) και προστέθηκαν σε αυτό 45 ml MRD (Maximum Recovery Diluent MRD- NaCl 0,85% και 0,1% Peptone). Τοποθετήθηκε σε συσκευή τύπου Stomacher για περίπου δύο λεπτά με στόχο την ομογενοποίηση. Έπειτα ακολούθησαν οι διαδοχικές αραιώσεις με MRD (NaCl 0,85% και 0,1% Peptone) με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου. Τα δείγματα τα οποία λήφθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες κάτω από φλόγα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri για ενσωμάτωση ή επίστρωση των θρεπτικών υλικών.



Εικόνα 2 Σχηματική παράσταση διαδικασίας προσδιορισμού μικροβιακής χλωρίδας με την εφαρμογή διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος.

Με το θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης TSA, προσδιορίστηκε η ολική μικροβιακή χλωρίδα καθώς η επίστρωση δείγματος σε αυτό, επιτρέπει την ανάπτυξη σχεδόν όλων των μικροοργανισμών. Ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας καθώς και των βακτηρίων που παράγουν H_2S (πιθανόν *Shewanella putrefaciens*) έγινε με επίστρωση σε θρεπτικό υλικό Iron agar. Με την μέθοδο της ενσωμάτωσης στο θρεπτικό υλικό VRBGA (Violet Red Bile Glucose agar) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae ενώ με ενσωμάτωση στο θρεπτικό υλικό MRS έγινε ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Με την μέθοδο της επίστρωσης δειγμάτων στο θρεπτικό υλικό CFC agar πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των *Pseudomonas* sp. Ολοκληρώνοντας, μεταφέραμε τα τρυβλία σε επωαστικούς κλιβάνους και προχωρήσαμε στην παρακολούθηση της διαδικασίας επώασης και της καταμέτρησης των αποικιών. Η επώαση των τρυβλίων για τα IA και MRS έγινε στους $25^{\circ}C$ για χρονικό διάστημα 72 ωρών, για το VRBGA έγινε επώαση στους $37^{\circ}C$ για 24 ώρες και για το CFC agar έγινε



επώαση στους 25° C για 48 ώρες. Η καταμέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας έγινε στους 25° C έπειτα από 72 ώρες.

2.3 Στερεοσκόπιο

Η πραγματοποίηση ελέγχου σε στερεοσκόπιο βασίζεται στην ανάλυση δειγμάτων διαστάσεων $\approx 2:4$ cm και πάχους 1cm καθενός φιλέτου από τα τρία λαβράκια. Αρχικά τα κατεψυγμένα φιλέτα έπρεπε να αποψυχθούν στους 4°C για 24 ώρες. Η ανάλυση, η οποία έγινε σε μεγέθυνση 6.3X στο στερεοσκόπιο περιλαμβάνει την ενέργεια σύγκρισης μεταξύ των μυομερών και των μέσων αποστάσεών τους πριν και μετά την κατάσταση ψύξης για το εκάστοτε δείγμα. Το πρόγραμμα GIMP.2. υπήρξε βασικό εργαλείο για την διεξαγωγή των μετρήσεων ενώ η στατιστική ανάλυση έγινε με την βοήθεια του προγράμματος EViews.

2.4 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η μελέτη των ιχθύων στο σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (S.E.M.) πραγματοποιήθηκε με ένα κομμάτι από κάθε λαβράκι διαστάσεων 1:1cm και πάχους 0,5 cm. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μονιμοποιήθηκαν με φορμόλη (φορμαλδεΰδη 10%) για 24 ώρες. Στην συνέχεια, διεξήχθη η διαδικασία ξήρανσης- αφυδάτωσης. Έπειτα ακολούθησε η επιμετάλλωση κατά την οποία χρησιμοποιήσαμε επιμεταλλωτή τύπου Baltec SCD 004. Σκοπός αυτής της ενέργειας είναι με την λεπτή επίστρωση χρυσού στο δείγμα, να ενισχυθεί η εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων. Η τάση του ρεύματος αντιστοιχούσε σε 25 mA, η πίεση (κενό) ήταν 5×10^{-2} mbar vacuum (μιλιόμπαρας) και ο απαιτούμενος χρόνος 3 λεπτά. Τελικός στόχος του



συγκεκριμένου μέρους της έρευνας είναι η παρατήρηση και καταγραφή τυχόν αλλαγών κατά την διαδικασία της απόψυξης.

Πίνακας 1 Πρωτόκολλο Αφυδάτωσης (Βερίλλης, 2015)

Διεργασία	Χημικά	Θερμοκρασία	Χρόνος	Επαναλήψεις
Αφυδάτωση	50% αιθυλική αλκοόλη σε δισαπεσταγμένο νερό	Δωματίου	5'	1
	70% αιθυλική αλκοόλη σε δισαπεσταγμένο νερό		5'	1
	80% αιθυλική αλκοόλη σε δισαπεσταγμένο νερό		5'	1
	95% αιθυλική αλκοόλη σε δισαπεσταγμένο νερό		5'	2
	100% αιθυλική αλκοόλη σε δισαπεσταγμένο νερό		5'	2

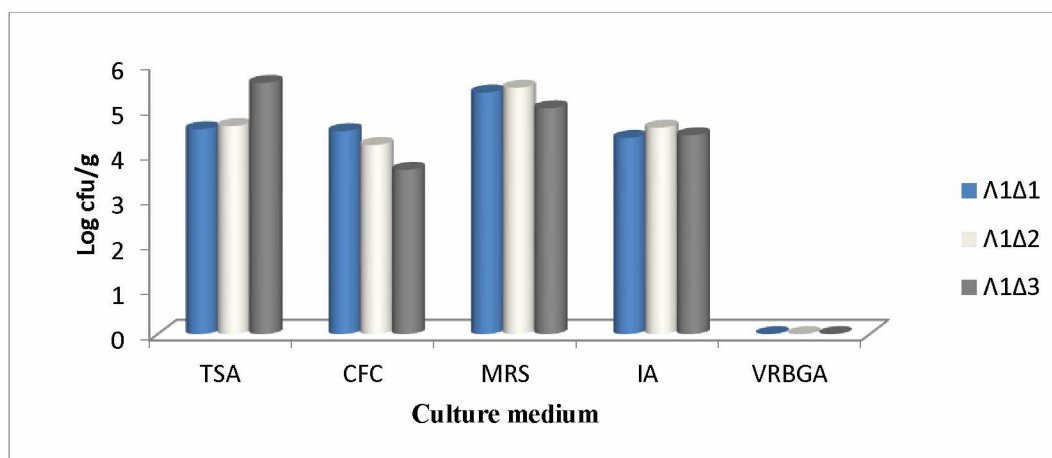


3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

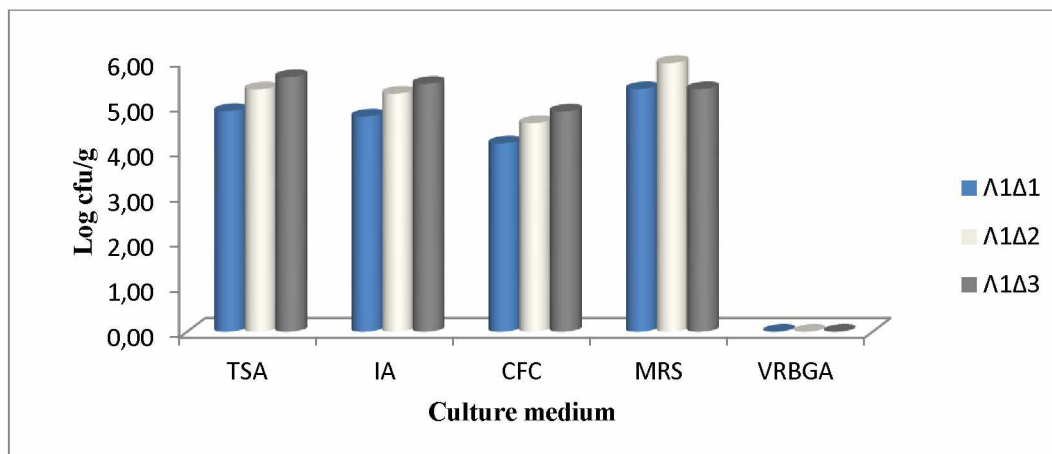
3.1 Μικροβιακοί Πληθυσμοί

Στα διαγράμματα 1-3 παρουσιάζονται η ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX) και οι κυριότεροι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί οι οποίοι εντοπίστηκαν στα φιλέτα πριν και μετά την αποθήκευση στους -20°C για 10, 36 και 63 ημέρες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι τα *Pseudomonas* spp., τα θειοαναγωγικά και τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

3.1.1 Λαβράκι 1 (κατάψυξη 10 ημερών)



(α)



(β)

Διάγραμμα 1 Μικροβιακοί πληθυσμοί της OMX (TSA), των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. (CFC), των Οξυγαλακτικών βακτηρίων (MRS), των θειοαναγωγικών (IA) και των Enterobacteriaceae (VRBGA) των νωπών φιλέτων (α) και των αποψυγμένων μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης στους -20°C (β) . Τα Λ1Δ1, Λ1Δ2 και Λ1Δ3 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα σάρκας ιχθύος.

Ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) που εντοπίστηκε στα νωπά φιλέτα του «Λαβρακιού 1» ήταν της τάξεως των 4,56, 4,62 και 5,58 log cfu/g στα σημεία Δ1, Δ2 και Δ3, αντίστοιχα και 4,89, 5,37 και 5,64 log cfu/g μετά από συντήρηση στους -20°C για 10 ημέρες (Διάγραμμα. 1). Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp. βρέθηκαν σε πληθυσμούς της τάξεως των 4,51, 4,20 και 3,65 log cfu/g την ημέρα 0 και των 4,18, 4,62 και 4,88 log cfu/g την ημέρα 10. Τα οξυγαλακτικά βακτηρίων καταμετρήθηκαν στους 5,37, 5,47 και 5,02 log cfu/g την ημέρα 0, ενώ μετά από 10 ημέρες κατάψυξης ήταν 5,38, 5,95 και 5,38 log cfu/g. Επιπλέον, τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης 1 log cfu/g τόσο την ημέρα 0 (νωπά φιλέτα), όσο και μετά από 10 ημέρες



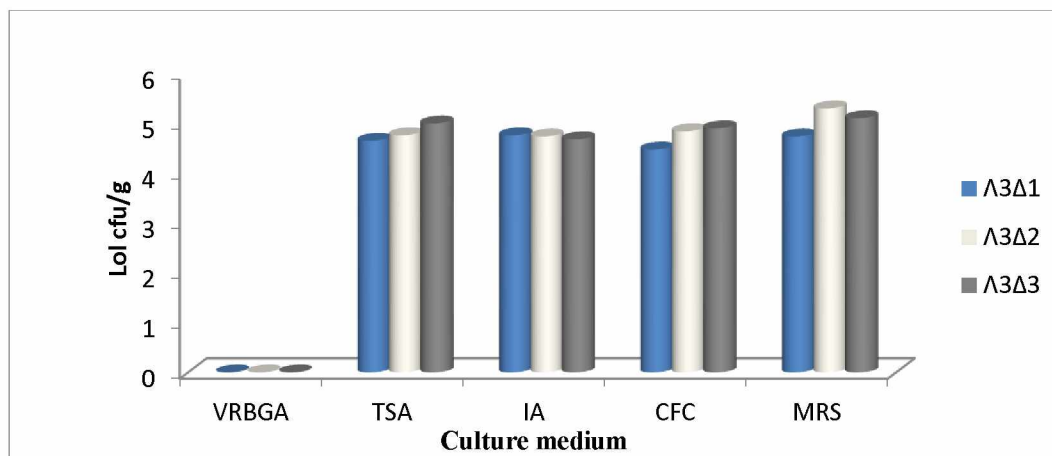
κατάψυξης στους -20ο C (Διάγραμμα 1). Στον παρακάτω Πίνακα 2 παρατηρούμε τις διαφορές με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση, και των τριών δειγμάτων.

Πίνακας 2 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για το σύνολο των δειγμάτων Δ1,Δ2,Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από δέκα ημέρες κατάψυξης

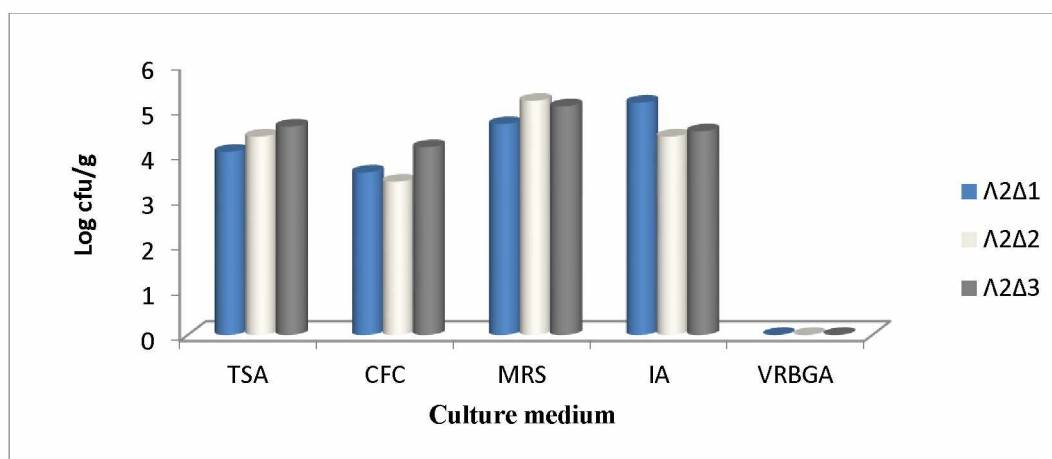
	0 Ημέρες (log cfu/g)		10 Ημέρες (log cfu/g)	
	Average	Standard deviation	Average	Standard deviation
	(Μέσος όρος)	(Τυπική απόκλιση)	(Μέσος όρος)	(Τυπική απόκλιση)
TSA	4,92	0,47	5,3	0,31
CFC	4,12	0,36	5,18	0,3
MRS	5,29	0,20	4,56	0,29
IA	4,46	0,10	5,57	0,27
VRBGA	<1	< 1	---	---



3.1.2 Λαβράκι 2 (κατάψυξη 36 ημερών)



(α)



(β)

Διάγραμμα 2 Μικροβιακοί πληθυσμοί της OMX (TSA), των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. (CFC), των Οξυγαλακτικών βακτηρίων (MRS), των θειοαναγωγικών (IA) και των Enterobacteriaceae (VRBGA) των νοπών φιλέτων (α) και των αποψυγμένων μετά από 36 ημέρες αποθήκευσης στους -20° C (β) . Τα Λ2Δ1, Λ2Δ2 και Λ2Δ3 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα σάρκας ιχθύος.



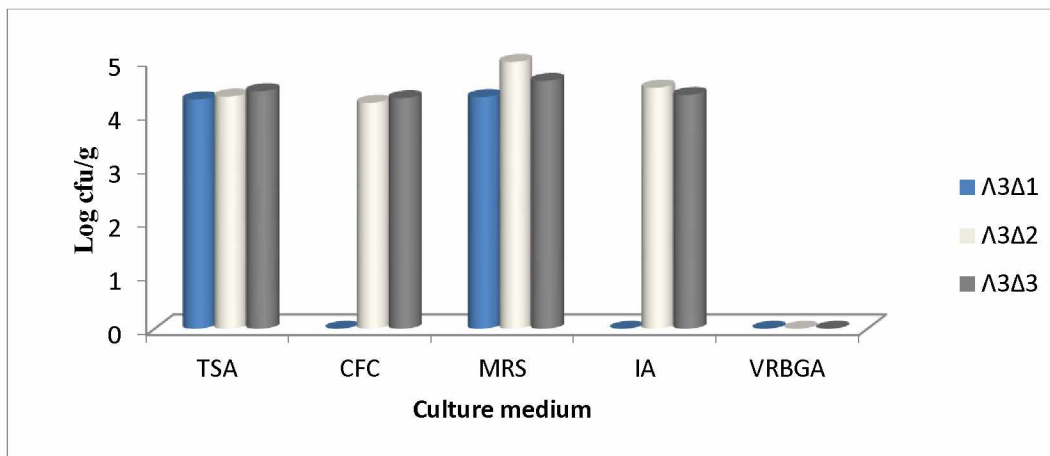
Στο «Λαβράκι 2» ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) που εντοπίστηκε στα νωπά φιλέτα του ήταν της τάξεως των 4,06 , 4,40 και 4,62 log cfu/g στα σημεία Δ1, Δ2 και Δ3, αντίστοιχα και 4,65, 4,76 και 5,00 log cfu/g μετά από συντήρηση στους -20° C για 36 ημέρες (Διάγραμμα. 2). Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* sp. βρέθηκαν σε πληθυσμούς της τάξεως των 3,60, 3,40 και 4,16 την ημέρα 0 και των 4,48, 4,85 και 4,90 την ημέρα 36. Τα οξυγαλακτικά βακτηρίων καταμετρήθηκαν στους. 4,67, 5,19 και 5,06 log cfu/g την ημέρα 0, ενώ μετά από 63 ημέρες κατάψυξης ήταν 4,74, 5,30 και 5,10 log cfu/g. Επιπλέον, τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης 1 log cfu/g τόσο την ημέρα 0 (νωπά φιλέτα), όσο και μετά από 36 ημέρες κατάψυξης στους -20° C (Διάγραμμα 2). Στον παρακάτω Πίνακα 3 παρατηρούμε τις διαφορές με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση, και των τριών δειγμάτων.

Πίνακας 3 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για το σύνολο των δειγμάτων Δ1,Δ2,Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από δέκα ημέρες κατάψυξης

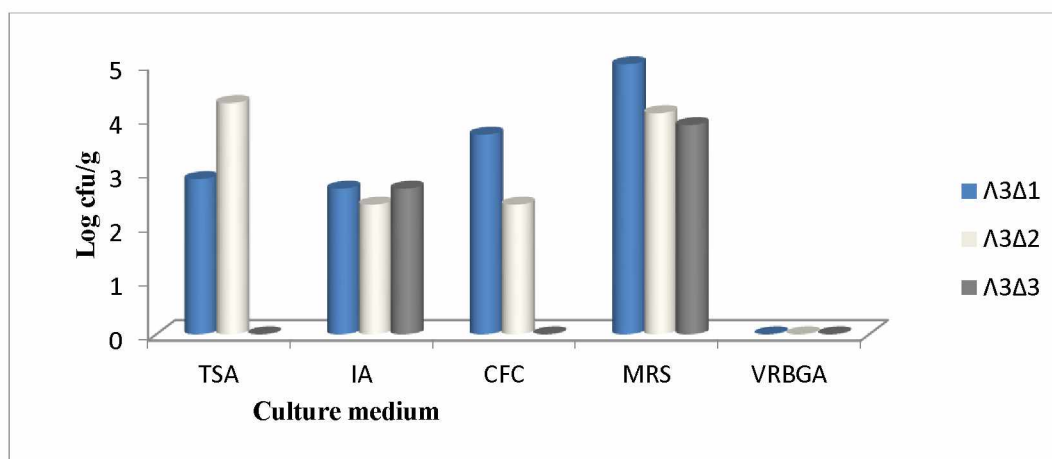
	0 Ημέρες (log cfu/g)		36 Ημέρες (log cfu/g)	
	Average (Μέσος όρος)	Standard deviation (Τυπική απόκλιση)	Average (Μέσος όρος)	Standard deviation (Τυπική απόκλιση)
TSA	4,36	0,23	4,73	0,14
CFC	3,72	0,32	4,74	0,19
MRS	4,98	0,22	5,05	0,23
IA	4,69	0,33	4,73	0,03
VRBGA	< 1	< 1	---	---



3.1.3 Λαβράκι 3 (κατάψυξη 63 ημερών)



(α)



(β)

Διάγραμμα 3 Μικροβιακοί πληθυσμοί της OMX (TSA), των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. (CFC), των Οξυγαλακτικών βακτηρίων (MRS), των θειοαναγωγικών (IA) και των Enterobacteriaceae (VRBGA) των νωπών φιλέτων (α) και των αποψυγμένων μετά από 63 ημέρες αποθήκευσης στους -20°C (β). Τα Λ3Δ1, Λ3Δ2 και Λ3Δ3 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα σάρκας ιχθύος.



Στο «Λαβράκι 3» ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός (OMX) που εντοπίστηκε στα νωπά φιλέτα του ήταν της τάξεως των 4,28, 4,33 και 4,43 log cfu/g στα σημεία Δ1, Δ2 και Δ3, αντίστοιχα και 2,88, 4,28 και 0 log cfu/g μετά από συντήρηση στους -20° C για 63 ημέρες (Διάγραμμα. 2). Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp. βρέθηκαν σε πληθυσμούς της τάξεως των 0, 4,22 και 4,30 την ημέρα 0 και των 3,70, 2,40 και 0 την ημέρα 63. Τα οξυγαλακτικά βακτηρίων καταμετρήθηκαν στους 4,32, 4,98 και 4,62 log cfu/g την ημέρα 0, ενώ μετά από 63 ημέρες κατάψυξης ήταν 5, 4,10 και 3,88 log cfu/g. Επιπλέον, τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης 1 log cfu/g τόσο την ημέρα 0 (νωπά φιλέτα), όσο και μετά από 63 ημέρες κατάψυξης στους -20° C (Διάγραμμα 3). Στον παρακάτω Πίνακα 4 παρατηρούμε τις διαφορές με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση, και των τριών δειγμάτων.

Πίνακας 4 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για το σύνολο των δειγμάτων Δ1,Δ2,Δ3 για την πρώτη ημέρα του πειράματος και μετά από 63 ημέρες κατάψυξης

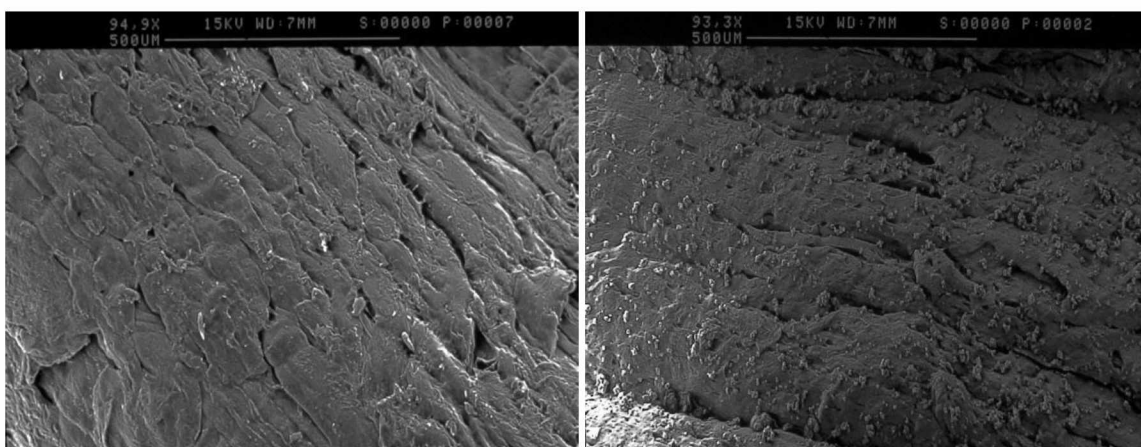
	0 Ημέρες (log cfu/g)		63 Ημέρες (log cfu/g)	
	Average (Μέσος όρος)	Standard deviation (Τυπική απόκλιση)	Average (Μέσος όρος)	Standard deviation (Τυπική απόκλιση)
TSA	4,35	0,06	2,39	1,79
CFC	2,84	2,01	2,6	0,14
MRS	4,64	0,27	2,03	1,53
IA	2,95	2,09	4,32	0,49
VRBGA	< 1	< 1	---	---



3.2 Παρατήρηση του Μυϊκού Ιστού των Αποψυγμένων Φιλέτων με Ηλεκτρονικό

Μικροσκόπιο Σάρωσης

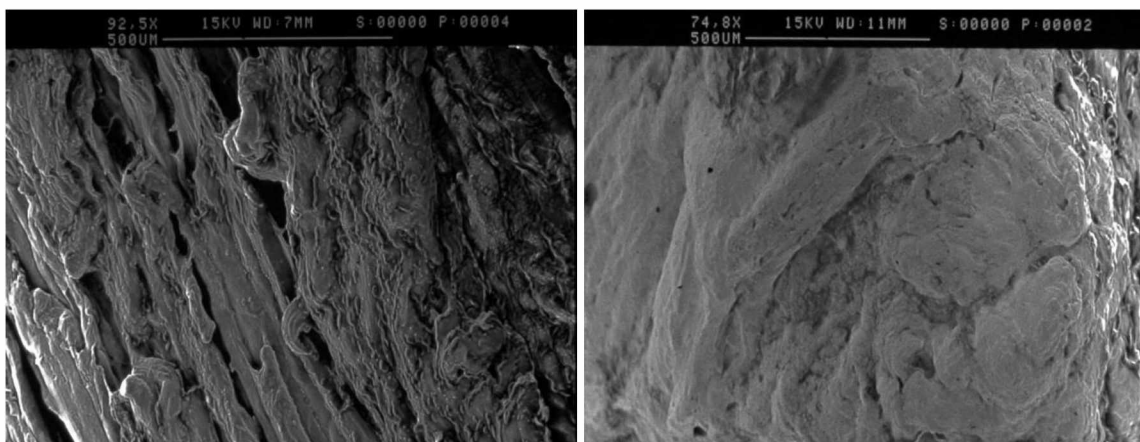
Όσον αφορά την μελέτη του μυϊκού ιστού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική διαφορά. Στις εικόνες που ακολουθούν (3 και 4) των αποψυγμένων φιλέτων από λαβράκι διακρίνουμε ότι δεν υπήρξαν μεταβολές στις σχισμές της σάρκας των ιχθύων μεταξύ της ημέρας παραλαβής και των ημερών απόψυξης (10, 36, 63).



(α)

(β)

Εικόνα 3 Ανάλυση της ποιότητας του ιστού των ιχθύων λαυρακιού μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης.



(α)

(β)

Εικόνα 4 Ανάλυση της ποιότητας του ιστού των ιχθύων λαυρακιού μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 36 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης.

3.3 Παρατήρηση της Μεταβολής των Μυομερών του Μυϊκού Ιστού των

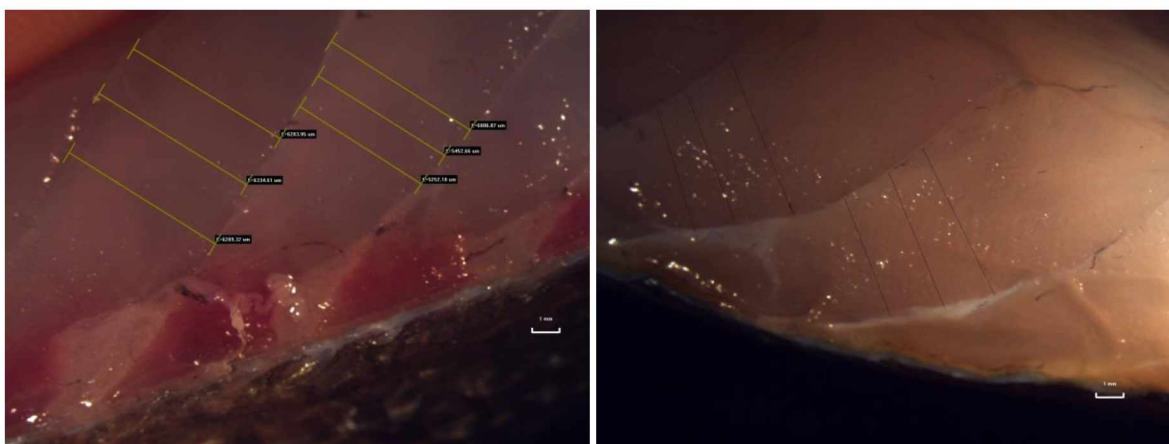
Αποψυγμένων Φιλέτων

Η μελέτη και η παρατήρηση των μυομερών των αποψυγμένων φιλέτων έγινε με την χρήση του στερεοσκοπίου. Οι μετρήσεις των αποστάσεων των μυομερών έγιναν με την βοήθεια του προγράμματος GIMP 2. (Εικόνες 5-7) ενώ στη συνέχεια έγινε η στατιστική ανάλυση τους με το πρόγραμμα EViews προκειμένου να γίνει η σύγκριση μεταξύ των νωπών φιλέτων και των αποψυγμένων μετά από 10, 36 και 63 μέρες κατάψυξης αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις τα δεδομένα έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Συγκρίνοντας τις αποστάσεις των μυομερών για το «Λαβράκι 1» (10 ημερών) παρατηρούμε ότι ακολουθούν κανονική κατανομή ($p > 0,05$), όπως επίσης και για το «Λαβράκι 2» (36 ημερών). Οι αποστάσεις των μυομερών στο «Λαβράκι 3» δεν ακολουθούν κανονική κατανομή ($p < 0,05$). Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε το τεστ



ελέγχου κανονικότητας Jarque -Bera. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται παρακάτω στους πίνακες 4-6. Μετά τους ελέγχους που αφορούν την κανονική κατανομή των μετρήσεων ακολούθησαν έλεγχοι για την στατιστική σημαντικότητα των παρατηρήσεων. Συγκεκριμένα διεξήχθησαν t-test για τα Λαβράκια 1 και 2 που οι τιμές κατανέμονται κανονικά και Mann-Whitney test για το Λαβράκι 3 του οποίου οι τιμές δεν ακολουθούν κανονική κατανομή.

➤ **Λαβράκι 1 (κατάψυξη 10 ημερών)**



(α)

(β)

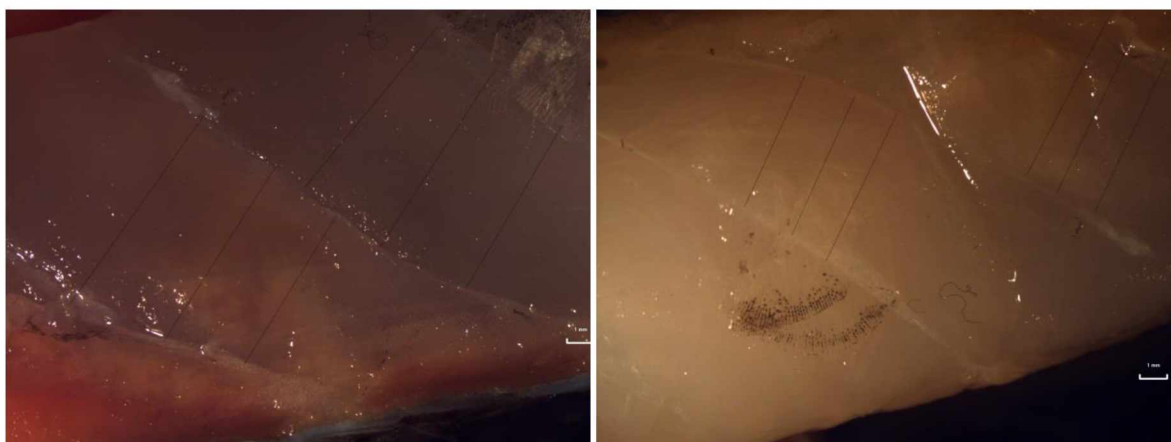
Εικόνα 5 Ανάλυση των αποστάσεων των μομερών ιχθύων λαυρακιού μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης

Πίνακας 5 Τα στατιστικά αποτελέσματα του συνόλου των αποστάσεων των μομερών με τους μέσους όρους και τυπική απόκλιση μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 10

Λαβράκι 1	N	Mean	Median	Maximum	Minimum	St. Dev.	Probability
0 days	40	5,80	5,67	8,23	3,76	1,22	0,366
10 days	40	5,10	4,82	7,16	3,48	0,98	0,192



➤ **Λαβράκι 2 (κατάψυξη 36 ημερών)**



(α)

(β)

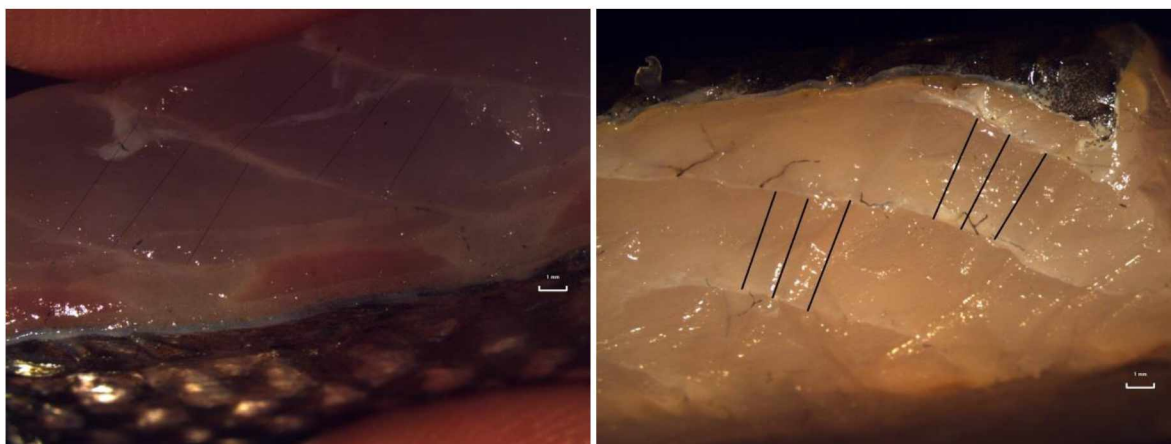
Εικόνα 6 Ανάλυση των αποστάσεων των μυομερών ιχθύων λαυρακιού μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 36 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης

Πίνακας 6 Τα στατιστικά αποτελέσματα του συνόλου των αποστάσεων των μυομερών με τους μέσους όρους και τυπική απόκλιση μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 36

Λαβράκι 2	N	Mean	Median	Maximum	Minimum	St. Dev.	Probability
0 days	40	5,60	5,66	7,64	3,28	0,87	0,540
36 days	40	4,76	4,85	6,77	2,99	0,96	0,775



➤ **Λαβράκι 3 (κατάψυξη 63 ημερών)**



(α)

(β)

Εικόνα 7 Ανάλυση των αποστάσεων των μυομερών ιχθύων λαυρακιού μεταξύ της ημέρας παραλαβής (α) και μετά από 36 ημέρες αποθήκευσης (β) σε θερμοκρασία κατάψυξης

Πίνακας 7 Τα στατιστικά αποτελέσματα του συνόλου των αποστάσεων των μυομερών με τους μέσους όρους και τυπική απόκλιση μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 63

Λαβράκι 3	N	Mean	Median	Maximum	Minimum	St. Dev.	Probability
0 days	40	5,02	4,74	9,38	3,14	1,43	0,000
63 days	40	5,00	4,40	12,38	3,55	1,90	0,000



4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ποιότητα των αλιευμάτων μειώνεται γρήγορα απαιτώντας στιγμιαία και επαρκή επεξεργασία για τη διατήρηση των θρεπτικών ιδιοτήτων τους. Βασικός σκοπός της επεξεργασίας τροφίμων είναι η αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών. Για την επίτευξη αυτής, γίνεται χρήση διάφορων μεθόδων συντήρησης όπως ψύξη και αποθήκευση σε κατάψυξη. Ωστόσο, πολλά κατεψυγμένα-αποψυγμένα ψάρια πωλούνται ως φρέσκα εξαπατώντας έτσι τους καταναλωτές. Αρκετές είναι οι μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση τέτοιου είδους νοθείας, διαχωρίζοντας ένα αποψυγμένο αλιεύμα από ένα νωπό. Οι πιο διαδεδομένες και μελλοντικά υποσχόμενες τεχνικές βασίζονται στη φασματοσκοπία ενώ ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι οι ιστολογικές και ενζυματικές μέθοδοι. Στην εργασία «Differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis» των Ethuin et al (2015), αναπτύχθηκε μια μέθοδος διαχωρισμού νωπών-αποψυγμένων φιλέτων λαυρακιού με βάση την ανάλυση της πρωτεϊνικής σύνθεσης των εκκρίσεων των φιλέτων, συγκρίνοντας τα προφίλ ηλεκτροφόρησης τους. Στη συνέχεια, ορισμένα σημεία χαρακτηρίστηκαν με φασματομετρία μάζας (MS/MS). Μια ακόμα μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό νωπών-αποψυγμένων φιλέτων βασίστηκε στην φασματοσκοπία σχεδόν υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIR spectroscopy). Στην εργασία «Detection of Frozen-Thawed Cycles for Frozen Tilapia (*Oreochromis*) Fillets Using Near Infrared Spectroscopy», οι συγγραφείς διερεύνησαν την δυνατότητα ανίχνευσης εάν τα ψάρια υποβλήθηκαν σε διαφορετικούς κύκλους κατάψυξης-απόψυξης, με τη χρήση φασματοσκοπίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (Wang et. Al., 2018)



Είναι γνωστό ότι η κύρια αιτία αλλοίωσης ενός νοπού αλιεύματος είναι οι μικροβιακοί οργανισμοί. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι ειδικοί αλλοιωγόνοι οργανισμοί είναι υπεύθυνοι για την ποιοτική υποβάθμιση των νοπών αλιευμάτων. Οι Parlapani et al. (2014b) παρατήρησαν σε φιλέτα τσιπούρας συντηρούμενα σε διαφορετικές συνθήκες, ότι τα *Pseudomonas* spp. υπήρξαν οι επικρατέστεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, ακολουθούμενοι από βακτήρια που παράγουν H_2S και πληθυσμούς *Enterobacteriaceae* σε όλες τις περιπτώσεις. Σε συμφωνία με την παραπάνω έρευνα, βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Shewanella putrefaciens* εντοπίστηκαν και από τα πειράματα της παρούσας εργασίας.

Η αλλοίωση των κατεψυγμένων αλιευμάτων ωστόσο, πραγματοποιείται κυρίως λόγω φυσικών μεταβολών (κρυσταλλοποίηση) ή χημικών και βιοχημικών μεταβολών. Ένα υψηλής ποιότητας κατεψυγμένο αλίευμα μπορεί να επιτευχθεί με την άμεση κατάψυξη και την αποθήκευση του σε χαμηλή και σταθερή θερμοκρασία (Jessen et al., 2014). Κατά την ψύξη και κατάψυξη, παρατηρείται επιβράδυνση στην ανάπτυξη μικροοργανισμών σε περιβάλλον ψύξης (4 έως $-10^{\circ} C$), ενώ κατά την κατάψυξη ($-18^{\circ} C$ έως $-40^{\circ} C$) επιτυγχάνεται τόσο αναστολή της μικροβιακής δράσης, όσο και ελάττωση της χημικής και ενζυμικής δράσης. Η παραπάνω παρατήρηση υποστηρίζεται στη συνέχεια από το πείραμα που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία, συμπεραίνοντας ότι η ποιοτική υποβάθμιση δεν προήλθε λόγω μικροβιακού φορτίου.

Η μικροβιακή αλλοίωση των δειγμάτων είναι πολύ πιθανή συνέπεια της διαδικασίας απόψυξης και όχι της κατάψυξης.. Κατά την απόψυξη η θερμοκρασία παραμένει κοντά στους $0^{\circ} C$ για μεγάλο χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται οι ψυχρότροφοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί. Όπως έχει διαπιστωθεί



και από πολλούς ερευνητές η αποθήκευση των νωπών αλιευμάτων σε ψύξη μετά την αλίευσή τους, παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ψυχρότροφου μικροβιακού πληθυσμού ο οποίος τελικά θα είναι και ο επικρατών πληθυσμός στο πέρας του χρόνου ζωής του προϊόντος (Parlapani and Boziaris, 2015). Οι αλλαγές στο μικροβιακό προφίλ των υπό εξέταση φιλέτων κατά τη διάρκεια της κατάψυξης είναι ελάχιστες, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η όποια αλλοίωση μπορεί να προήλθε κατά την απόψυξη των φιλέτων με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των ψυχρότροφων οργανισμών. Επιπροσθέτως, είναι πιθανό η μικρή διαφορά των πληθυσμών να οφείλεται στα διαφορετικά τμήματα του φιλέτου λαυρακιού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την δειγματοληψία για μικροβιακή ανάλυση. Παρατηρείται ότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών επηρεάζεται από την θέση και την πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά, τα οποία βρίσκονται στη σάρκα του ιχθύος πριν την κατάψυξη, εμφανίζει κάποια διαφοροποίηση.

Όσον αφορά την ποιοτική υποβάθμιση των αποψυγμένων φιλέτων λαβρακιού, είναι πιθανό να είναι αποτέλεσμα και των αυτολυτικών ενζυμικών δράσεων. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών και διάφορες χημικές αντιδράσεις όπως η οξείδωση των λιπιδίων, η πρωτεόλυση και ο σχηματισμός φορμαλδεΐδης, επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα των καταψυγμένων ιχθύων. (Jessen et. al., 2014). Η παρούσα μελέτη και το πείραμα που πραγματοποιήθηκε για τη σύνθεση αυτής, αποτελεί μια πρωταρχική δοκιμή για εκτίμηση της ποιοτικής υποβάθμισης που υφίσταται το φιλέτο λαυρακιού εξαιτίας των ενζύμων, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Ως τελικό αποτέλεσμα, από τις μετρήσεις δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ωστόσο, εμφανής



αλλαγές είναι πολύ πιθανό να γίνουν αντιληπτές έπειτα από περισσότερο χρόνο κατάψυξης ή ακόμα και σε περιπτώσεις απόψυξης και επανακατάψυξης του φιλέτου.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

-Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης δεν υφίσταται μικροβιακή αλλοίωση, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με τα πειράματα που διεξήχθησαν για την παρούσα εργασία. Οποιοσδήποτε μεταβολές παρατηρούνται στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών πιθανώς οφείλονται στα διαφορετικά τμήματα δειγματοληψίας του φιλέτου, όπου μικροοργανισμοί είχαν αναπτυχθεί πριν την κατάψυξη. Επίσης θα μπορούσαν να οφείλονται σε ανάπτυξη τους κατά την απόψυξη των φιλέτων.

-Όσον αφορά στη παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και στερεοσκόπιο, η στατιστική ανάλυση που διεκπεραιώθηκε μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μικρή μεταβολή μεταξύ των αποστάσεων δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Ενδεχομένως, αλλαγές στις αποστάσεις των μυομερών της σάρκας του λαβρακιού να μπορούν να διακριθούν μετά το πέρας μεγαλύτερου χρόνου αποθήκευσης.

Εν κατακλείδι, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό και την αποφυγή της νοθείας στην πώληση των αλιευμάτων είναι ένα θέμα που θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω.



Βιβλιογραφία

➤ Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- **Ashie I. N. A., Smith J. P., Simpson B. K. (1996).** Spoilage and self-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,
- **Boziaris, S. I. (2014),** .Microbiological examination of seafood. In: *Seafood Processing. Technology, Quality & Safety*. Edited by Boziaris I. S. IFST Advances in Food Science Series Wiley-Blackwell. 387-418
- **Chiesa L. M. et. al., (2020),** Discrimination between Fresh and Frozen-Thawed Fish Involved in Food Safety and Fraud Protection, *Foods*; 9(12): 1896
- **Dalgaard, Gram L, Huss H. H. (2003)** Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres, *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283-294.
- **Ethuin, P., et. al. (2015),** Differentiation between fresh and frozen-thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis. *Food Chem.* 176, 294–301
- **Gonçalves A. A., Nielsen J. and Jessen F. (2012),** Quality of Frozen Fish, *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, Second Edition. 479-506
- **Gramm L. and Huss H. H. (1996),** Microbiological spoilage of fish and fish products, *International Journal of Food Microbiology* 33. 121-137



- **Hassoun A., et. al. (2020)**, Emerging Techniques for Differentiation of Fresh and Frozen–Thawed Seafoods: Highlighting the Potential of Spectroscopic Techniques, *Molecules* , 25, 4472
- **Huis in't Veld J. H. J. (1996)**, Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview, *International Journal of Food Microbiology* 33. I- 18
- **Jessen F., Nielsen J., Larsen E., (2014)**, Chilling and Freezing of Fish, *Quality & Safety* Edited by Boziaris I. S. IFST Advances in Food Science Series Wiley-Blackwell. 33-55
- **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. et. al. (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., et. al. (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., et. al.. (2015)**, Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C. *Food Microbiology* 50 : 44-53



- **Parlapani, F. F., et. al. (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., et. al. (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
- **Szymczaka M. et. al. (2020)**, Effect of constant and fluctuating temperatures during frozen storage on quality of marinated fillets from Atlantic and Baltic herrings (*Clupea harengus*), *Food Science and Technology* 133. 109961
- **Wang, W.L. et. al. (2018)**, Detection of Frozen-Thawed Cycles for Frozen Tilapia (*Oreochromis*) Fillets Using Near Infrared Spectroscopy. *J. Aquat. Food Prod. Technology*. 27, 609–618

➤ **Ελληνική βιβλιογραφία**

- **Βερίλλης Π. (2015)**, Οπτική και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία
- **Ζουμπούλα Ν. (2010)**, Μικροβιολογικές και οργανοληπτικές μεταβολές και χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά την συντήρηση της νωπής τσιπούρας, Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.



- **Μαντζουρίδης Σ. (2018)**, Μικροβιολογικές και ιστολογικές μεταβολές σάρκας τσιπούρας μετά από κατάψυξη και απόψυξη, Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Μλαδένη Σ. (2017)**, Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*, L.) κατά την αποθήκευση τους σε υπερψύξη, Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Μποζιάρης Ι. (2012)**, Υγιεινή και συντήρηση εδώδιμων αλιευμάτων. Σημειώσεις μαθήματος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Μπρατσιάκος Β. Δ. (2016)**, Προσδιορισμός της ποιότητας νοπών αλιευμάτων μέσω εργαστηριακών μεθόδων, Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου
- **Πατσιούρα Ε. (2009)**, Επιθεώρηση Αλιευμάτων (Ιχθύων) Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση, Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης
- **Πιτσούλη Ελένη (2009)**, Επίδραση του τρόπου θανάτωσης των ιχθύων στις φυσικοχημικές μεταβολές και στο μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης κατά τη συντήρησή τους υπό διάφορες συνθήκες, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Χωρέμη Κ. (2017)**, Έλεγχος ποιότητας άγριας και εκτρεφόμενης τσιπούρας κατά την συντήρηση υπό ψύξη και έλεγχος προέλευσης, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.



➤ **Ηλεκτρονική βιβλιογραφία**

- <https://www.fishbase.se/Summary/SpeciesSummary.php?ID=63&AT=SEA+BASS>
- http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en



ABSTRACT

In this research, thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were evaluated. The sea bass fillets were firstly studied fresh and then after defrosting them, in order to compare them. The comparison was carried out in two stages, the first one through microbiological analysis and then through histological analysis using a stereoscope and an electron microscope. The aim of this paper was the determination of changes in the fish flesh, in case they exist, in order to find a new methodology to detect the fraud of selling frozen-thawed seafood as fresh.

The results of the study showed that there were no significant differences in the microbial profile of fish as the total viable count was found into levels of 2,4-5,3 log cfu/gr. The population of *Pseudomonas* spp. were found in populations of the class 2,6-5,2 log cfu/g and the lactic acid bacteria in 2-5,3 log cfu/g. The bacteria of *Enterobacteriaceae* population and those who produce H₂S was found, concerning the boundary detection minimum in 1 log cfu/g. Changes in the sea bass flesh were not evident in the electron microscope and the counts concerning the fish-flakes' spacing, according to the stereoscope, were not statistically important.

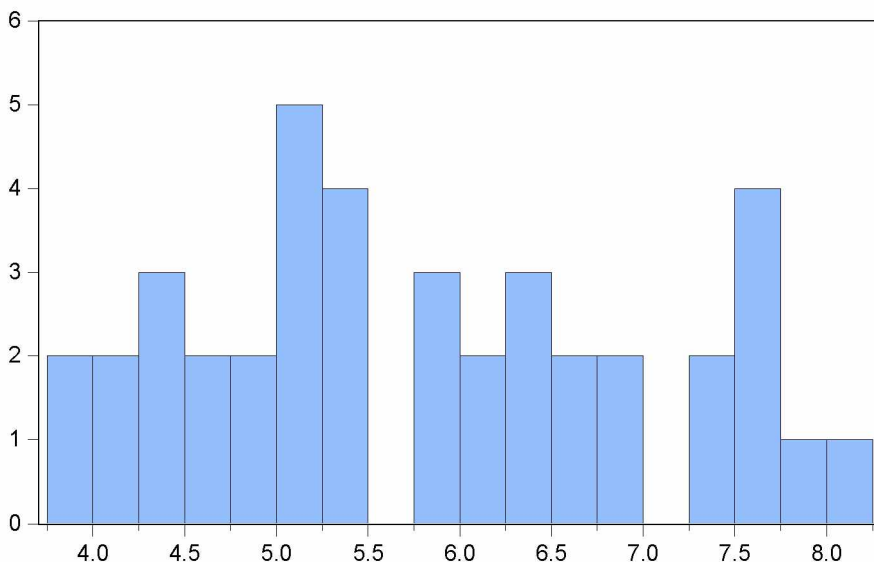
Keywords:

Microbiological spoilage, European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, Electron microscope, Stereoscope, Freezing, Thawing



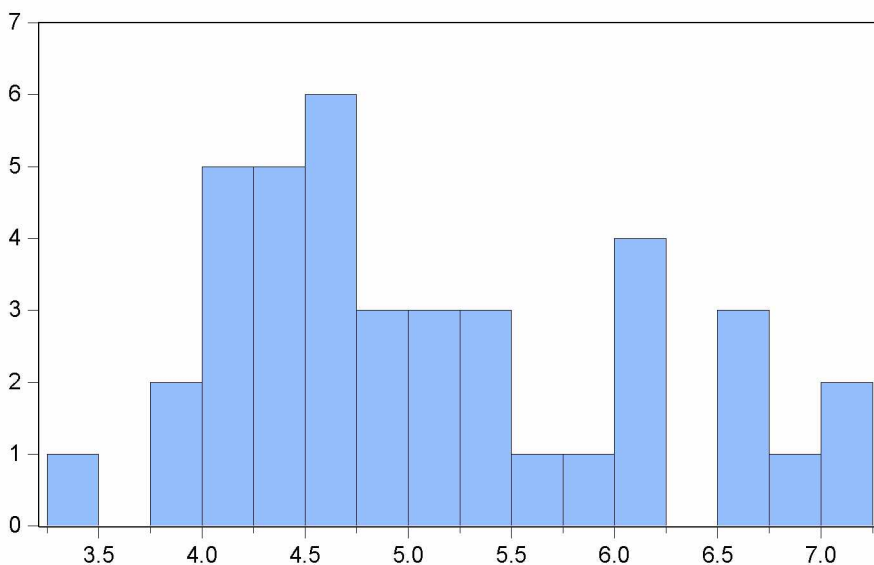
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Λαβράκι 1



Series: LAV1	
Sample 1 40	
Observations 40	
Mean	5.804142
Median	5.669573
Maximum	8.233784
Minimum	3.755263
Std. Dev.	1.220310
Skewness	0.230838
Kurtosis	2.002710
Jarque-Bera	2.012888
Probability	0.365516

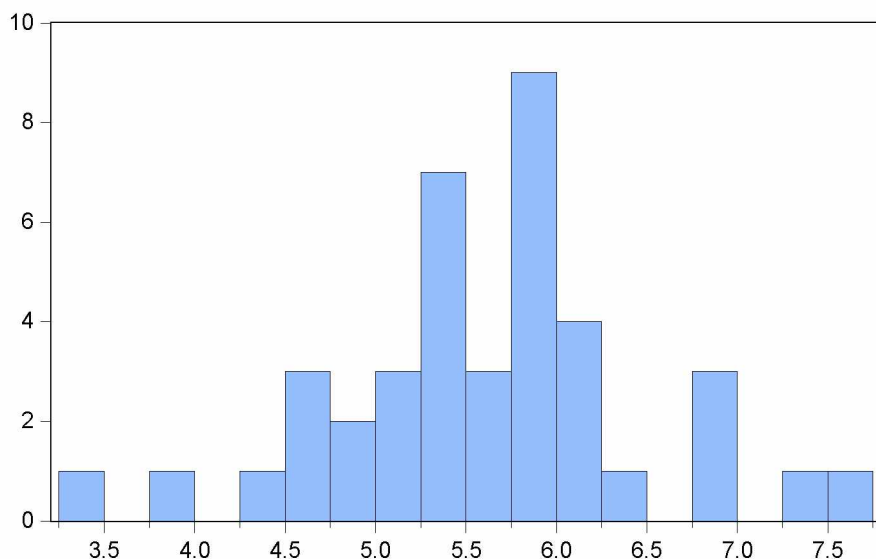
Λαβράκι 1 (10 ημερών)



Series: LAV1_10	
Sample 1 40	
Observations 40	
Mean	5.098996
Median	4.820377
Maximum	7.158108
Minimum	3.478378
Std. Dev.	0.980367
Skewness	0.571579
Kurtosis	2.180928
Jarque-Bera	3.296145
Probability	0.192420

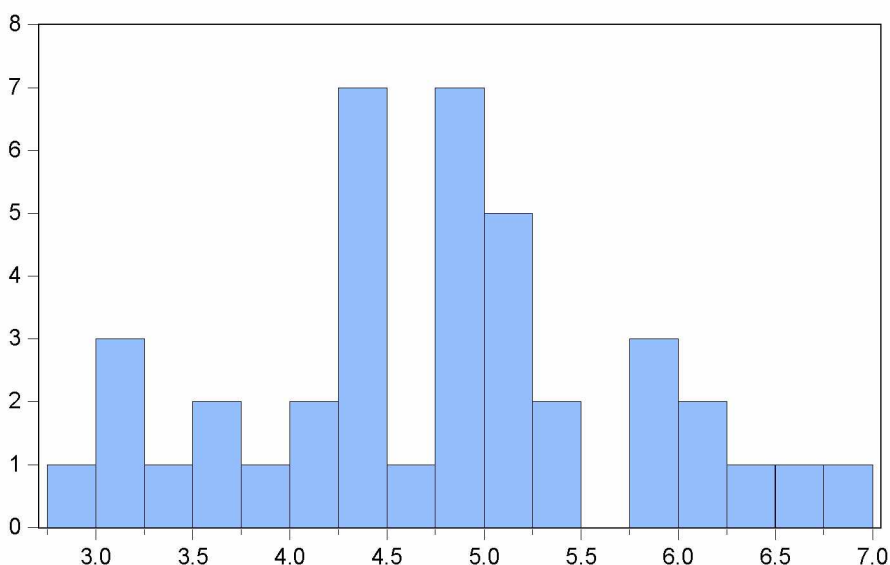


Λαβράκι 2



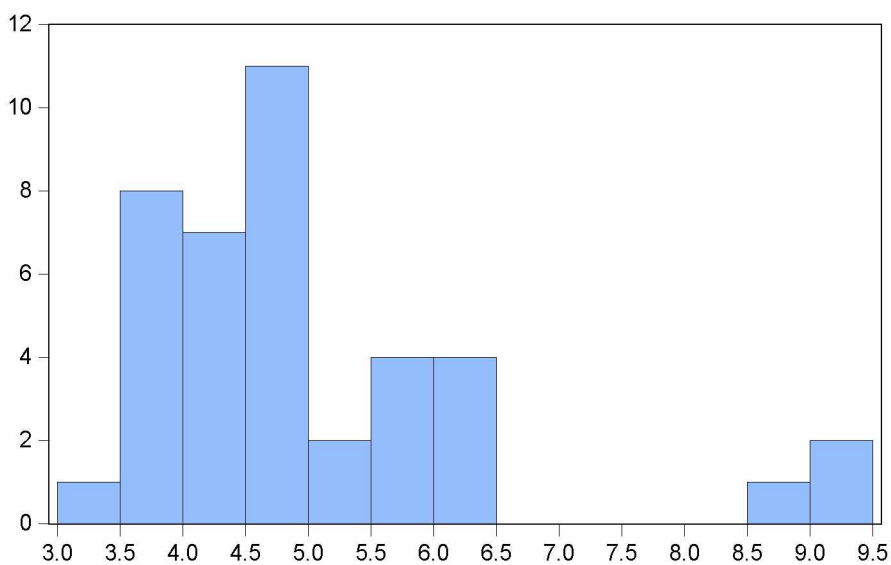
Series: LAV2	
Sample 1 40	
Observations 40	
Mean	5.597475
Median	5.663158
Maximum	7.636486
Minimum	3.283784
Std. Dev.	0.868122
Skewness	-0.094039
Kurtosis	3.838628
Jarque-Bera	1.231117
Probability	0.540339

Λαβράκι 2 (36 ημερών)



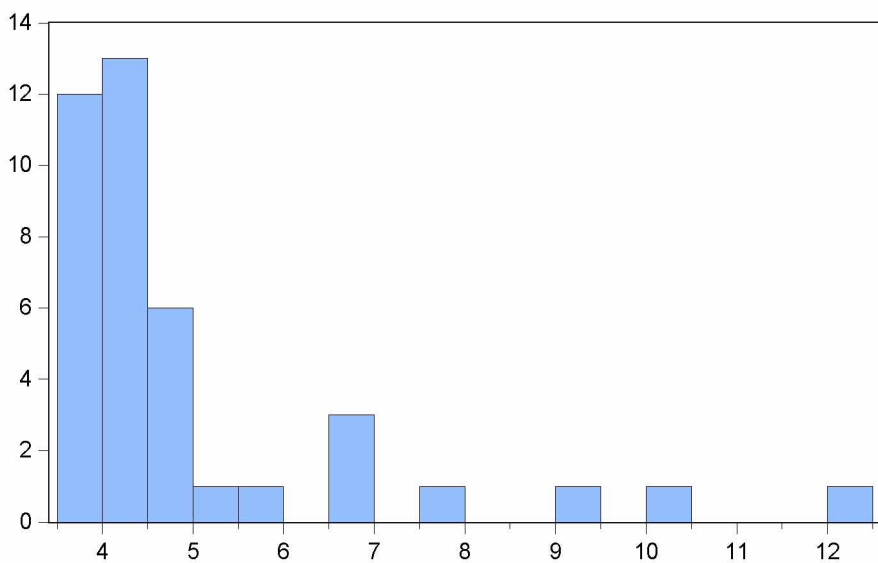
Series: LAV2_36	
Sample 1 40	
Observations 40	
Mean	4.764823
Median	4.846995
Maximum	6.767568
Minimum	2.992105
Std. Dev.	0.964684
Skewness	0.050428
Kurtosis	2.455866
Jarque-Bera	0.510422
Probability	0.774753

Λαβράκι 3



Series: LAV3	
Sample 1 40	
Observations 40	
Mean	5.020000
Median	4.737802
Maximum	9.381081
Minimum	3.137838
Std. Dev.	1.433022
Skewness	1.697452
Kurtosis	5.682141
Jarque-Bera	31.19875
Probability	0.000000

Λαβράκι 3(63 ημερών)



Series: LAV3_63	
Sample 1 40	
Observations 40	
Mean	5.002381
Median	4.395139
Maximum	12.38400
Minimum	3.553333
Std. Dev.	1.901372
Skewness	2.386014
Kurtosis	8.414474
Jarque-Bera	86.81464
Probability	0.000000