



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση εδώδιμης επικάλυψης με υγρό καπνό στους πληθυσμούς
των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας υπό ψύξη »**

MARINA MAGGOU

ΒΟΛΟΣ 2021

**«Επίδραση εδώδιμης επικάλυψης με υγρό καπνό στους πληθυσμούς των αλλοιογόνων
μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας υπό ψύξη »**

**(Effect of edible coating with liquid smoke on spoilage microorganisms of chilled stored
seabream fillets)**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Καθηγητής**, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
- 2) **Φωτεινή Παρλαπάνη, Επίκουρος Καθηγήτρια**, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων – Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
- 3) **Έλενα Γκολομάζου, Μέλος, Μόν. Επικ. Καθηγήτρια**, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

Στην μητέρα μου, Μαρία, στον πατέρα μου, Δημήτρη, στον αδερφό μου, Γιώργο που με αγκάλιασαν σε όλη μου την προσπάθεια. Στον παππού μου, Μάριο, που δεν βρίσκεται πλέον μαζί μας και που ελπίζω να είναι περήφανος για εμένα. Στον αγαπημένο μου φίλο, Χάρη που δεν σταμάτησε να είναι στο πλευρό μου.



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους, όσοι συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία που πραγματοποιήθηκε στην Σχολή Γεωπονικών Επιστημών του Βόλου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Καθηγητή κ. Ιωάννη Σ. Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και την διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά την διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τις Επικ. Καθηγήτριες κες Φωτεινή Παρλαπάνη και Ελένη Γκολομάζου, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες, την κα Φαίδρα Συροπούλου και τον κ. Στέφανο Κακάση, τόσο για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθεια τους, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού από το Εργαστήριο Εμπορίας & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων & Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αλλά και για την αμέριστη, καταλυτική και πολύτιμη συμπαράστασή τους κατά την διάρκεια του πειράματος.

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. Όλοι με την σειρά τους με καθοδήγησαν και μου συμπαραστάθηκαν τόσο πρακτικά όσο και ψυχολογικά, από την αρχή μέχρι το τέλος. Ο ενθουσιασμός και η αφοσίωσή τους σε εμένα μού έδιναν δύναμη να συνεχίσω. Ευχαριστώ ακόμη τον οικογενειακό φίλο, κ. Νικόλαο Ταπή, για τις εποικοδομητικές του παρατηρήσεις.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία μελετήθηκε η επίδραση εδώδιμων επικαλυμμάτων (coatings) αλγινικών αλάτων συγκεκριμένης συγκέντρωσης με γλυκερόλη σε συνδυασμό ή όχι με ορισμένη συγκέντρωση υγρού καπνού, στο μικροβιακό προφίλ, καθώς και στον εμπορικό χρόνο ζωής φιλέτων τσιπούρας αποθηκευμένων υπό ψύξη (4°C). Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκαν: φιλέτο που δεν υπέστη κάποια επεξεργασία (μάρτυρας), φιλέτο με εδώδιμη επικάλυψη αλγινικών αλάτων (μεταχείριση Α) και φιλέτο που περιείχε εδώδιμη επικάλυψη αλγινικών αλάτων και υγρό καπνό (μεταχείριση Β) τα οποία στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη για 10 ημέρες. Για την παρακολούθηση των μεταβολών του μικροβιακού πληθυσμού (OMX και κυριότεροι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί) και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν κάθε δύο ημέρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μεταχείριση Β ήταν πιο αποτελεσματική σε σχέση με την μεταχείριση Α, δεδομένου ότι οι πληθυσμοί της OMX, των ψευδομονάδων, των οξυγαλακτικών και των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων βρέθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα (1,5-2 λογαρίθμους) και ο εμπορικός χρόνος ζωής επεκτάθηκε κατά τρεις ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα και τη μεταχείριση Α. Συμπερασματικά διαπιστώνεται ότι οι βρώσιμες επικαλύψεις που περιέχουν αλγινικά άλατα και υγρό καπνό, μπορούν να επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής των φρέσκων ιχθυερών. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια οικονομική εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών τεχνολογιών για τη συντήρηση των ιχθυερών η οποία έχει και το πλεονέκτημα να συμβάλλει και στη μείωση των απωλειών των τροφίμων.

Λέξεις-Κλειδιά: εδώδιμες επικαλύψεις, εδώδιμες μεμβράνες, υγρός καπνός, τσιπούρα, αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, εμπορικός χρόνος ζωής



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Αλλοίωση των ιχθυηρών.....	1
1.2 Μέθοδοι συντήρησης ιχθύων.....	2
1.3 Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στους ιχθύες (EAM).....	12
1.4 Σκοπός της μελέτης.....	13
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
2.1 Προέλευση φιλέτων.....	15
2.2 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	15
2.3 Εκτίμηση εμπορικού χρόνου ζωής με οργανοληπτική αξιολόγηση.....	16
2.4 Μικροβιολογική ανάλυση.....	17
2.5 Διαδικασία παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων.....	17
2.6 Μικροβιολογική ανάλυση.....	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	20
3.1 Εμπορικός χρόνος ζωής.....	20
3.2 Μεταβολές του μικροβιακού πληθυσμού στα φιλέτα τσιπούρας.....	20
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	25
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	32
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	33
7. ABSTRACT.....	38



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αλλοίωση των ιχθυηρών

Η αλλοίωση των ιχθυηρών ορίζεται σαν το κάθε σύμπτωμα ξεχωριστά ή μια ομάδα συμπτωμάτων που εκδηλώνονται με αλλαγές στην οσμή και το άρωμα ή γενικά στην εμφάνιση του ιχθύ λόγω μικροβιακής δραστηριότητας. Η εκδήλωση της αλλοίωσης όπως η παραγωγή γλοιωδών ουσιών, οι αλλαγές στο χρώμα, στη γεύση και ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνισή της, εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία του προϊόντος, την αποθήκευση και τη διανομή. Αλλοιογόνα ψυχότροφα βακτήρια κυρίως και μύκητες, είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση των νωπών τροφίμων ζωικής προέλευσης. Η σάρκα των ιχθύων είναι πιο επιρρεπής στην αλλοίωση από ό,τι των ζωοειδών της στεριάς. Αυτό οφείλεται:

1. Στη ποικιλόθερμη φύση των ψαριών,
2. στο υψηλό pH της σάρκας των αλιευμάτων και
3. στην ποσότητα του μη πρωτεϊνικού αζώτου όπως είναι και το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (TMAO).

Η ποικιλόθερμη φύση των ψαριών επιτρέπει στα βακτήρια που διαβιούν σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών να αναπτυχθούν. Τα βακτήρια που είναι ικανά να το «εκμεταλλευτούν» είναι τα *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio* spp., *Lactobacillus* spp., κ. ο. κ. Στην περίπτωση του δεύτερου, το υψηλό pH της σάρκας των αλιευμάτων (pH > 6.0) σε συνδυασμό με το μικρό ποσοστό υδατανθράκων (<0.5 %) που περιέχεται στον μυϊκό ιστό των ιχθυηρών καθώς και η μικρή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, επιτρέπουν την ανάπτυξη του αλλοιογόνου βακτηρίου.

Το μη πρωτεϊνικό άζωτο στη σάρκα των ιχθύων, αποτελείται κυρίως από χαμηλού μοριακού βάρους υδατοδιαλυτές ουσίες, όπως ποσότητες ελεύθερων αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, τα οποία αποτελούν υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων. Η αποσύνθεση του θείου στα αμινοξέα είναι πολύ σημαντική στην διαδικασία της αλλοίωσης διότι προκαλεί δυσάρεστη οσμή και γεύση εξαιτίας του σχηματισμού υδρόθειου (H_2S), μερκαπτανών και σουλφιδίων (π.χ. CH_3SH , $(CH_3)_2S$). Τέλος, το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) αποτελεί μέρος του μη πρωτεϊνικού αζώτου, προκαλώντας υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό στην σάρκα των αλιευμάτων, ενώ έχει αποδειχτεί ότι η παρουσία του επιδρά σημαντικά στην αλλοίωση των αλιευμάτων, κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Ορισμένα αλλοιογόνα βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, διάφορα *Vibrionaceae* κτλ.) το χρησιμοποιούν ως αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναερόβια αναπνοή, προκαλώντας δυσάρεστη οσμή και γεύση εξαιτίας του σχηματισμού τριμεθυλαμίνης (Dalgaard et al., 1995).

1.2 Μέθοδοι συντήρησης ιχθύων

Ως συντήρηση ορίζεται η διαδικασία που αποτρέπει την υποβάθμιση της ποιότητας του ιχθύος και που αυξάνει τον χρόνο ζωής της σάρκας του. Οι μέθοδοι συντήρησης ιχθύων που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

1) Ψύξη. Με τον όρο νοείται η αποθήκευση των τροφίμων σε θερμοκρασίες από 1 ως 15°C. Για αλλοιώσιμα προϊόντα όπως τα νωπά αλιεύματα, η διατήρηση σε ψύξη γίνεται από 0-7°C. Με την εφαρμογή ψύξης πραγματοποιείται επιβράδυνση της μικροβιακής ανάπτυξης (αύξηση της φάσης προσαρμογής και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης) της μικροχλωρίδας αλλοίωσης και επεκτείνεται ο χρόνος ζωής του αλιεύματος. Επιπλέον επιβραδύνεται η χημική αλλά και η ενζυμική δραστηριότητα. Τροχοπέδη στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε αυτή

την περίπτωση αποτελεί η χαμηλή θερμοκρασία τόσο στην συντήρηση των νωπών αλιευμάτων όσο και στα ελαφρώς αλατισμένα, καπνιστά συντηρημένα υπό ψύξη αλιεύματα. Το είδος που ευνοείται από τη θερμοκρασία συντήρησης, αναπτύσσεται ταχύτερα και γίνεται ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός. Οι ψευδομονάδες, αναπτύσσονται έναντι των υπολοίπων μεσόφιλων μικροοργανισμών, όταν τα ιχθυρά συντηρούνται κάτω από αερόβιες συνθήκες. Σε αναερόβιες επικρατούν συνήθως ψυχρότροφοι γαλακτοβάκιλλοι. Διακρίνεται σε τρία είδη.

Ψύξη με πάγο

Ο τεμαχισμένος πάγος καθώς λιώνει απορροφά την θερμότητα από τα αλιεύματα, τα οποία πρέπει να είναι καλά τοποθετημένα και καλυμμένα με πάγο που έχει θρυμματιστεί επιτυχώς και η αναλογία ψαριών και πάγου να είναι σωστή. Ο βαθμός τεμαχισμού είναι επίσης σημαντικός. Τα αλιεύματα θα πρέπει να έχουν τοποθετημένο πάγο γύρω τους και να είναι καλά σκεπασμένα ώστε η θερμοκρασία τους να πέσει περίπου από 0-(-1°C). Ο πάγος θα πρέπει να παράγεται από νερό με χαρακτηριστικά πόσιμου, ενώ ενδείκνυται να είναι και χλωριωμένο.

Ψύξη με βύθισμα ή ψεκασμό με θαλασσινό νερό ή άλμη θερμοκρασίας -1 έως 0°C

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως πάνω στα μεγάλα αλιευτικά σκάφη και τα υγρά πρέπει να ψύχονται είτε με την προσθήκη πάγου είτε με ψυκτικά μηχανήματα.

Υπέρψυξη

Τα αλιεύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία έως -2,2°C. Στις θερμοκρασίες αυτές ένα ποσοστό των αλιευμάτων έχει κρυσταλλωθεί χωρίς όμως να είναι εξωτερικά εμφανές. Είναι σχετικά νέος τρόπος ψύξεως των ψαριών και τα αλιεύματα μπορούν να συντηρηθούν για αρκετά περισσότερες μέρες από ότι με τις άλλες μεθόδους. Επιτυγχάνεται συντήρηση έως 20 ημέρες.

Ψύξη με ψυχρό αέρα (φυσική κυκλοφορία)

Τα αλιεύματα τοποθετούνται σε ψυκτικό θάλαμο (ψυγείο) θερμοκρασίας από $-1-1^{\circ}\text{C}$. Αποφεύγεται η ψύξη σε ρεύμα ψυχρού αέρα (βεβιασμένη κυκλοφορία) διότι επιτυγχάνεται τάγγιση του λίπους, που είναι συνηθισμένη αλλοίωση των λιπαρών αλίπαστων ψαριών και οφείλεται σε χημική οξείδωση των λιπαρών οξέων των λιπιδίων. Επιταχύνεται από το οξυγόνο και την παρουσία σε ίχνη μετάλλων που δρουν ως καταλύτες στο αλάτι. Προσοχή θα πρέπει να δίνεται στην αποφυγή διακυμάνσεων της θερμοκρασίας διότι έτσι συμπυκνώνεται η υγρασία πάνω στα αλιεύματα με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η αλλοίωσή τους. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα προϊόντα συνιστάται να είναι συσκευασμένα.

2) Κατάψυξη. Είναι η μέθοδος διατήρησης των ιχθυηρών σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (από -18°C έως και -40°C), οι οποίες προκαλούν κρυστάλλωση του μεγαλύτερου μέρους των κυτταρικών υγρών (>92%) και αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης με επιβράδυνση ή αναστολή κάθε χημικής και ενζυμικής δραστηριότητας. Διακρίνεται σε βραδεία και ταχεία κατάψυξη. Ως καταψυγμένα θεωρούνται τα αλιεύματα στα οποία το σώμα τους είναι σκληρό, συμπαγές και άκαμπτο. Ο αντικειμενικός σκοπός της κατάψυξης, είναι η παραγωγή προϊόντων που έχουν την ικανότητα να συντηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και που μπορούν να αξιοποιηθούν μακριά από την περιοχή αλίευσής τους. Εξαρτάται από δύο βασικούς παράγοντες: τα αλιεύματα πρέπει να ψύχονται στην χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία και ο μέγιστος δυνητικά όγκος των αλιευμάτων πρέπει να μετατραπεί σε πάγο. Γενικά, είναι απαραίτητο η θερμοκρασία των ιχθύων να κατέβει τουλάχιστον στους -18°C και κατόπιν να συντηρηθούν στην ίδια θερμοκρασία που καταψύχθηκαν.

3) Συσκευασία σε κενό αέρος ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα απουσία οξυγόνου (Vacuum Packaging-VP). Στην συγκεκριμένη μέθοδο συντήρησης, η συσκευασία

εκκενώνεται από αέρα και το προϊόν κλείνεται σε συσκευασία χαμηλής διαπερατότητας. Έτσι, παρεμποδίζεται η ανάπτυξη αερόβιων και κατ' επέκταση καθυστερείται η ανάπτυξη δυνητικά αναερόβιων. Ευνοείται όμως η ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων, που αποτελούν τους ειδικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς για τους ιχθύες των θερμότερων θαλασσινών νερών. Χρησιμοποιούνται ειδικά φιλμ και πλαστικά που παρεμποδίζουν την δίοδο αερίων στο εσωτερικό (Gram & Huss, 1996).

4) Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα πλούσια σε CO₂ (Modified Atmosphere Packaging-MAP). Το οξυγόνο, το άζωτο και το διοξείδιο του άνθρακα είναι τα τρία κύρια αέρια που χρησιμοποιούνται εμπορικά, αν και ίχνη αερίων όπως μονοξείδιο του άνθρακα, οξείδιο του αζώτου και διοξείδιο του θείου αναφέρονται ως αέρια ενδεχόμενης χρήσης. Χρησιμοποιούνται επίσης μεμβράνες (φιλμ) για διατήρηση της αναλογίας του περιεχομένου μίγματος αερίων, ενώ η διαπερατότητα ως προς το CO₂ διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Όσο μεγαλύτερη η διαπερατότητα τόσο μικρότερη η προστασία. Συνήθως, το μίγμα αερίων είναι 60% CO₂ και 40% N₂. Το ίδιο μίγμα ισχύει και για τα καπνιστά ψάρια. Για τα μη λιπαρά ψάρια το μίγμα αερίων μπορεί να είναι 30% O₂, 40% CO₂ και 30% N₂ (Young et al. 1988).

5) Ξήρανση. Η αποξήρανση-αφυδάτωση λαμβάνει χώρα μετά από την συμπύκνωση των τροφίμων. Πραγματοποιείται απομάκρυνση νερού με σκοπό την μείωση της ενεργότητάς του και σε επίπεδα τέτοια ώστε να είναι δυνατή η διατήρηση του αλιεύματος για μεγάλα χρονικά διαστήματα και εκτός ψυγείου. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, για παράδειγμα με την κάπνιση και γίνεται σε 5 στάδια. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι έχουν να κάνουν με εφαρμογή θερμότητας και διακρίνονται σε απευθείας έκθεση στον ήλιο (παραδοσιακή μέθοδος) ή σε ξηρό και καλά αεριζόμενο χώρο, που αποτελούν μορφές φυσικής αποξήρανσης, ενώ η εφαρμογή ρεύματος θερμού αέρα, η επαφή σε θερμές επιφάνειες, η

λυοφιλίωση, η ωσμωτική αφυδάτωση και ο καταγωνισμός αποτελούν μορφές τεχνικής αποξήρανσης.

6) Προσθήκη συντηρητικών. Πρόκειται για φυσικές ή συνθετικές ουσίες, με αντιμικροβιακή ή/και αντιοξειδωτική δράση. Τα πρόσθετα συντηρητικά εισάγονται στο αλίευμα με σκοπό να εμποδίσουν του μηχανισμούς υποβάθμισής του και επιπλέον να διασφαλίσουν την υγιεινή και την ασφάλειά του και διακρίνονται σε αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά. Ως αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται τόσο οξέα που αποτελούν χημικά συντηρητικά όσο και τα τελευταία, όπου λαμβάνουν χώρα και στην διαδικασία της οξίνισης παράλληλα με τα θειώδη άλατα, το γαλακτικό οξύ και τα άλατα οξέων. Τα αντιμικροβιακά αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, παρεμποδίζουν χημικές ή ενζυμικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα να επιβραδύνουν ή να σταματούν την αλλοίωση των ιχθυηρών μαζί με το πάστωμα ή με την κάπνιση. Τέτοιες ουσίες θεωρούνται τα αντιοξειδωτικά, κάποια οξέα και τα πρόσθετα που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις (π.χ. EDTA), κ.ά., δρουν σε συνδυασμό με άλλα εμπόδια όπως η χαμηλή ενεργότητα νερού, η ψύξη κτλ. και πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο στις περιπτώσεις που οι άλλες μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων είναι πολύ δαπανηρές ή καταστρέφουν το προϊόν ή δεν μπορούν γενικώς να εφαρμοσθούν. Τέλος, αντιοξειδωτικοί παράγοντες θεωρούνται τα BHA, BHT, TBHQ, PG, οι τοκοφερόλες, καθώς και κάποια οξέα όπως το EDTA που αναφέρθηκε παραπάνω, το ασκορβικό και το κιτρικό.

7) Ακτινοβόληση. Αποτελεί την έκθεση των ιχθυηρών στην επίδραση ακτινοβολιών ιονισμού κάτω από ελεγχόμενες και προκαθορισμένες συνθήκες. Περιλαμβάνει την έκθεση σε ενέργεια από πηγές όπως οι ακτίνες γ, οι ακτίνες X ή οι δέσμες ηλεκτρονίων, όπως είναι οι καθοδικές ακτίνες και οι ακτίνες β. Κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης, τα αλιεύματα δεν θερμαίνονται, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στην περίπτωση του φούρνου μικροκυμάτων, και

δεν διατηρούν γενικά την ακτινοβολία. Επομένως, όταν εφαρμόζεται με βάση τις προδιαγραφές της τεχνολογίας τροφίμων, η ακτινοβολία δεν καθιστά τα ιχθυηρά ραδιενεργά.

8) Ζύμωση. Βιομετατροπή κατά την οποία παράγεται οξύ από τους μικροοργανισμούς που την προκαλούν, όπως γαλακτικό οξύ (γαλακτική ζύμωση), προπιονικό οξύ (προπιονική ζύμωση), οξικό οξύ (βακτηριακή ζύμωση), αιθυλική αλκοόλη (αλκοολική ζύμωση) κτλ, που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας και την μείωση του pH του αλιεύματος. Παράγονται επίσης αντιμικροβιακές ουσίες, όπως αιθανόλη, υπεροξειδίο του υδρογόνου, βακτηριοσίνες, κτλ. Είναι δηλαδή μια επιθυμητή αλλοίωση που επικρατεί μικροβιακός ανταγωνισμός, γιατί κυριαρχεί η μικροχλωρίδα της ζύμωσης και φτάνουν σε υψηλούς πληθυσμούς και ακόμη, γίνονται φυσικές διεργασίες, όπως είναι η απώλεια υγρασίας που οδηγεί στην μείωση της ενεργότητας του νερού. Κυριότερη μορφή ζύμωσης στην συντήρηση αλιευμάτων είναι η γαλακτική. Τέλος, το παραγόμενο προϊόν μπορεί περαιτέρω να λάβει ήπια επεξεργασία όπως κάπνιση, ελαφρά θέρμανση και τέλος να συσκευασθεί ή όχι σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και να αποθηκευθεί υπό ψύξη.

9) Θερμική επεξεργασία. Καλείται οποιαδήποτε διεργασία που απαιτεί μεταφορά θερμότητας, καθώς καταστρέφει τις βλαστικές μορφές και τα σπόρια των μικροοργανισμών ανάλογα με την ένταση της. Τρόποι θέρμανσης είναι ο θερμός αέρας (ψήσιμο σε φούρνο, ξηραντήριο αέρα), που θερμαίνεται με φλόγα, ηλεκτρικές αντιστάσεις ή με εναλλάκτη θερμότητας ατμού, η επαφή με θερμές επιφάνειες (εναλλάκτες θερμότητας) με νερό ή ατμό, έκχυση ατμού απευθείας στο προϊόν ή στην συσκευασία του (κονσέρβες), υπέρυθρη ακτινοβολία και μικροκύματα. Επιτυγχάνεται με το μαγείρεμα, τηγάνισμα, βράσιμο σε νερό ή ατμό, καθώς και ψήσιμο σε φούρνο. Κάποια είδη της είναι το ζεμάτισμα, η παστερίωση και η εμπορική αποστείρωση (κονσερβοποίηση). Ο σκοπός της θερμικής επεξεργασίας είναι η μείωση του

συνολικού μικροβιακού πληθυσμού, η καταστροφή παρασίτων και τοξικών ουσιών εκτός των θερμοανθεκτικών τοξινών, η αδρανοποίηση ενζύμων και η βελτίωση οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Αυτό σημαίνει ότι όσο χαμηλότερο είναι το μικροβιακό φορτίο των ιχθύων τόσο πιο αποτελεσματική γίνεται μία συγκεκριμένη θερμική επεξεργασία καθώς η πιθανότητα επιβίωσης των μικροοργανισμών ελαττώνεται.

10) Αλάτιση. Ονομάζεται η προσθήκη αλατιού (NaCl) με σκοπό την μείωση της ενεργότητας του νερού τουλάχιστον κάτω από 0.92 (NaCl ~ 10%) και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Συνήθως συνδυάζεται με ένα ή περισσότερα εμπόδια όπως είναι η κάπνιση, η οξίνιση, η θερμική επεξεργασία, η προσθήκη διαφόρων συντηρητικών και μάλιστα αντιμικροβιακών κ.τ.λ. Γίνεται με ξηρό αλάτι (χονδρό ή λεπτό) και διακρίνεται στην ξηρή και στην υγρή αλάτιση με ασθενή, μέση ή ισχυρή άλμη. Στην αλάτιση με ασθενή ή μέση άλμη τα ψάρια παραμένουν συνήθως για μικρό χρονικό διάστημα (έως λίγες ώρες) ώστε να απορροφήσουν μικρές ποσότητες άλατος που συμβάλλουν στην γεύση και το άρωμα του τελικού προϊόντος και κατόπιν επεξεργάζονται με άλλο τρόπο, π.χ. κάπνιση, κονσερβοποίηση κ.ά. Στην αλάτιση με ισχυρή άλμη τα ψάρια μένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (αρκετές ημέρες) εμβαπτισμένα στην άλμη. Η μέθοδος αυτή να χρησιμοποιείται για την παραγωγή αλίπαστων αλιευμάτων. Τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την αλάτιση αφορούν κυρίως φαινόμενα διάχυσης όπου η κινητήριος δύναμη είναι η διαφορά συγκεντρώσεων και ωσμωτικής πίεσης μεταξύ της σάρκας του ψαριού και του άλατος ή της άλμης που εφαρμόζεται εξωτερικά. Παρατηρείται διάχυση του άλατος προς την σάρκα του ψαριού ενώ ταυτόχρονα μετακινείται νερό από την σάρκα προς το εξωτερικό περιβάλλον.

11) Μαρινάρισμα. Προσδιορίζεται ως συντήρηση με οξίνιση ή οξέωση και βασίζεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οργανικών οξέων. Πραγματοποιείται συνήθως με οξικό οξύ σε

συγκέντρωση 5-6% , αλλά και με κιτρικό ή προπιονικό. Τα ασθενή οργανικά οξέα μικρού μοριακού βάρους, όπως είναι εκτός των προηγούμενων και το σορβικό αλλά και το βενζοϊκό οξύ και γενικότερα τα άλατα, όπως είναι αυτά του καλίου ή νατρίου, το διοξείδιο του θείου και τα νιτρικά/νιτρώδη, είναι μεταξύ των κυριότερων χημικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη συντήρηση των τροφίμων, λόγω της διαλυτότητας τους, της χαμηλής τους τοξικότητας και της γεύσης τους. Το ψάρι υπόκειται σε προετοιμασία όπως αποκεφαλισμός, εκσπλαχνισμός, πλύσιμο κτλ. και κατόπιν εμβαπτίζεται στο ξύδι. Συνήθως προηγείται ελαφριά αλάτιση. Η οξέωση πραγματοποιείται εν ψυχρώ ή εν θερμώ, ενώ μερικές φορές, πραγματοποιείται μετά από θερμική επεξεργασία. Τέλος τα προϊόντα αποθηκεύονται σε δροσερό μέρος ή σε θερμοκρασία ψύξης.

12) Εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης. Αποτελεί μέθοδο μη θερμικής επεξεργασίας, κατά την οποία εφαρμόζονται πιέσεις από 100 έως 900MPa (1000-9000 atm), σε υγρά ή στερεά, συσκευασμένα ή μη, τρόφιμα. Η θερμοκρασία κατά την διάρκεια διεργασίας μπορεί να είναι μικρότερη από 0°C έως και μεγαλύτερη των 100°C. Έτσι, επιτυγχάνεται η μείωση του μικροβιακού φορτίου και της ενζυμικής δραστηριότητας, ενώ η αλλοίωση των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών είναι πολύ μικρότερη από τις συμβατικές θερμικές μεθόδους συντήρησης.

13) Κάπνιση. Επισημαίνεται ως η εφαρμογή περισσότερων από ενός μικροβιακών εμποδίων, διότι τα αλιεύματα είναι συνήθως ελαφρώς αλατισμένα ή και αφυδατωμένα (χαμηλή aw). Η πρώτη περίπτωση συμβαίνει μετά την κάπνιση, ενώ η δεύτερη προηγείται αυτής. Ο καπνός εκτός της αντιμικροβιακής δραστηριότητας, παρουσιάζει και αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται κυρίως σε διάφορες φαινολικές ουσίες, αλλά και στην χαμηλή ενεργότητα του νερού. Επιπλέον, συνεισφέρει τα μέγιστα και στις οργανοληπτικές ιδιότητες των καπνιστών προϊόντων,

όπως το άρωμα, την γεύση αλλά και το χρώμα. Τα καπνιστά ιχθυηρά έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τα νωπά, ενώ συνεισφέρει επιπλέον στην διάρκεια ζωής τους η θερμική επεξεργασία κατά την θερμή κάπνιση και η τυχόν συσκευασία τους σε ατμόσφαιρα μειωμένου οξυγόνου. Η χαμηλή τάση οξυγόνου συνεισφέρει και στην επιβράδυνση ή και παρεμπόδιση της οξειδωσης των λιπιδίων. Διακρίνεται σε τρία είδη.

Ψυχρή κάπνιση

Η θερμοκρασία στον θάλαμο δεν υπερβαίνει τους 37°C και διαρκεί από μερικές ώρες έως και λίγες εβδομάδες. Τα ιχθυηρά δεν υφίστανται ψήσιμο αλλά ξήρανση και ακολουθεί η συντήρησή τους σε ψυγείο. Πριν την έναρξη της ψυχρής κάπνισης, τα προϊόντα συνηθίζεται να δέχονται μια προεργασία με αλάτισμα (νιτρικά/νιτρώδη άλατα) όπου το επιτρέπει η Νομοθεσία και κατόπιν ξεκινά η κάπνιση. Τέλος, παρόλο που φαίνεται να μειώνεται ο αριθμός των βακτηρίων, δεν παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του παθογόνου *Listeria monocytogenes*.

Θερμή κάπνιση

Η θερμοκρασία του θαλάμου είναι ικανή να φτάσει μέχρι τους 120°C. Η διαδικασία διακρίνεται σε δύο στάδια. Τα αλιεύματα αρχικά υφίστανται αφυδάτωση (αποξήρανση) στους 30-55°C, ενώ στο στάδιο της κύριας κάπνισης, η θερμοκρασία κυμαίνεται από τους 80-120°C, φτάνοντας περίπου στους 70-80°C στο κεντρικό σημείο της σάρκας των ιχθυηρών που ψήνονται. Ύστερα, τα ιχθυηρά ψύχονται και συσκευάζονται.

Υγρή κάπνιση

Πραγματοποιείται με ψεκασμό ή εμβάπτιση του αλιεύματος σε διάλυμα υγρού καπνού. Ο τελευταίος παράγεται με συμπύκνωση και κλασματική απόσταξη καπνού που προέρχεται από καύση ξύλων. Με αυτόν τον τρόπο, προσδιορίζονται και ελέγχονται τα αρωματικά συστατικά που λαμβάνονται από τα ιχθυηρά και διαχωρίζονται οι βλαβερές ουσίες, όπως είναι οι

πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες ενώ ταυτόχρονα προσδιορίζεται ως η μέθοδος με το μικρότερο κόστος κάπνισης.

14) Εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύμματα (edible films & coatings). Η ιδέα της χρήσης τους προέκυψε από τις φυσικές μεμβράνες που διαθέτουν κάποια τρόφιμα, όπως φρούτα και λαχανικά (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011). Μια ιδανική εδώδιμη μεμβράνη σχηματίζει ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνεια του τροφίμου και παρέχει έναν αποτελεσματικό φραγμό σε νερό, ατμούς, υγρασία ή/και θερμοκρασία (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Αποτελεί εναλλακτική μέθοδο για την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, δρώντας ως εμπόδιο διείσδυσης νερού, ατμού, οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα, αρωματικών ενώσεων κλπ, αλλά και για τη δράση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Οι εδώδιμες μεμβράνες θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον, δεδομένου ότι αποδομούνται εύκολα σε σύγκριση με τα κοινά συνθετικά πλαστικά. Οι ιδιότητες αυτών των βιοπολυμερών μπορούν να τροποποιηθούν με την προσθήκη πλαστικοποιητών, αντιμικροβιακών παραγόντων, χρωστικών ουσιών με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους (Gutierrez et al., 2016). Στις εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να ενσωματωθούν και άλλες ουσίες, όπως αρωματικές ενώσεις, αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακοί παράγοντες, χρωστικές και βιταμίνες (Evageliou et al., 2015). Παρασκευάζονται κυρίως από αλγινικά άλατα που κατά κύριο λόγο παράγονται από διάφορα γένη καφέ φυκών (κυρίως *Laminariahyperborean*, *Macrocystispyrifera*, *Ascophyllumnodosum*; λιγότερο από *Laminariadigitate*, *Laminariajaponica*, *Ecloniamaxima*, *Lesonianegrescens*, *Sargassum* sp.) και έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ομοιόμορφα, διαφανή, αδιάλυτα στο νερό και θερμοαναστρέψιμα πηκτώματα σε θερμοκρασία δωματίου (Comaposada et al., 2015). Επίσης, αποτελούν εξαιρετικά εμπόδια στο οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα λόγω των δεσμών υδρογόνου. Οι μεμβράνες μπορούν να σχηματιστούν είτε με εξάτμιση του νερού από ένα

αλγινικό πήκτωμα ή με μία διαδικασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει ζήρανση του αλγινικού διαλύματος και έπειτα προσθήκη διαλύματος άλατος του ασβεστίου (Paula et al., 2015). Μεμβράνες μπορούν να παρασκευασθούν ακόμα από φυσικώς απαντώμενους, δύσπεπτους πολυσακχαρίτες και επίσης από καραγενάνη υδρόφιλων γραμμικών θειωμένων γαλακτανών (Paula et al., 2015). Επιπλέον, φιλέτα χωρίς καμία επιπλέον μεταχείριση χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες (control). Όσον αφορά την εμβάπτιση (coating), τα φιλέτα εμβαπτίζονται σε διάλυμα αλγινικού ασβεστίου. Στη συνέχεια, τα φιλέτα από τις μεταχειρίσεις συντηρούνται υπό ψύξη για μερικές ημέρες.

Για την αντιμετώπιση και αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και για τη διασφάλιση της ποιότητας των ιχθύων, όπως και για την κάθε μέθοδο συντήρησης, πρέπει να ακολουθείται μια σειρά από πρωτόκολλα και διαδικασίες. Η κύρια μέθοδος συντήρησης η οποία μελετήθηκε στο εργαστήριο για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας, είναι η κάπνιση με υγρούς καπνούς και η συντήρηση υπό ψύξη με ψυχρό αέρα.

1.3 Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στους ιχθύες (EAM)

Τα νωπά τρόφιμα, όπως είναι τα ιχθυηρά, επιμολύνονται από μια πληθώρα μικροοργανισμών που προέρχονται από το φυσικό τους περιβάλλον, τον άνθρωπο, τους χώρους και τον εξοπλισμό επεξεργασίας. Μόνο ένα κλάσμα αυτών τελικά θα φθάσει σε υψηλούς αριθμούς και θα συνεισφέρει τελικά στην αλλοίωσή τους. Ο όρος που συνήθως χρησιμοποιείται αποδίδεται ως *μικροχλωρίδα αλλοίωσης* (microbial spoilage association). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για διαφορετικούς οργανισμούς (ως προς την οικογένεια, γένος ή ομάδα) που απαρτίζουν τη μικροβιακή χλωρίδα του τροφίμου στο σημείο αλλοίωσης.

Οι μεταβολές στην ποιότητα των ιχθυηρών συνήθως προέρχονται από την παραγωγή ουσιών, αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των βακτηρίων. Οι ουσίες αυτές που οδηγούν στη οργανοληπτική απόρριψη, παράγονται από τους *ειδικούς αλλοιογόνους οργανισμούς* (specific spoilage microorganism-SSO). Αρχικά οι EAM μπορεί να βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα και να αποτελούν ένα μικρό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, οι EAM αναπτύσσονται με πιο μεγάλο ρυθμό από ότι η υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα και παράγουν μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία δυσάρεστων οσμών.

Σε αυτό το σημείο, η συγκέντρωση των κυττάρων των EAM μπορεί να χαρακτηριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη που αντιπροσωπεύει την αλλοίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας αντικειμενικός *χημικός δείκτης μικροβιακής αλλοίωσης* (chemical spoilage index – CSI). Υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ του μικροβιακού πληθυσμού και του βαθμού αλλοίωσης γενικά στα τρόφιμα, διαδικασία που καθίσταται αδύνατη στα νωπά αλιεύματα. Για αυτό και είναι γενικά γνωστό και πρέπει να σημειωθεί ότι μικρές αλλαγές στις συνθήκες επεξεργασίας ή/και αποθήκευσης επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στο μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης με αποτέλεσμα έναν τελείως διαφορετικό τύπο αλλοίωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι EAM που έχουν ανευρεθεί σε αλλοιωμένους ιχθύες εύκρατων και τροπικών υδάτων που είχαν συντηρηθεί σε πάγο είναι οι *Pseudomonas spp.* & *Shewanella putrefaciens*, αντίστοιχα αυτοί που είχαν αποθηκευθεί σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος διέθεταν κυρίως *Vibrionaceae*.

1.4 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εδώδιμων επικαλυμμάτων αλγινικών αλάτων (coatings) σε συνδυασμό ή όχι με υγρό καπνό, στο μικροβιακό προφίλ και στον εμπορικό χρόνο ζωής φιλέτων τσιπούρας αποθηκευμένων υπό ψύξη (4°C).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προέλευση φιλέτων

Ολόκληροι ιχθύες τσιπούρας υδατοκαλλιέργειας (*Sparus aurata*) βάρους περίπου 400g ελήφθησαν από την αγορά του Βόλου και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο.

2.2 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Οι ιχθύες αρχικά φιλετοποιήθηκαν και προηγήθηκε η προετοιμασία των θρεπτικών υλικών, όπου θα αναλυθεί περαιτέρω παρακάτω. Στη συνέχεια, 4 τεμάχια βάρους 10g το καθένα χωρίς καμία επιπλέον μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control). Επίσης 4 τεμάχια ίδιου βάρους εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα εδώδιμης επικάλυψης (edible coating) που περιείχε αλγινικό νάτριο 1.5% (w/v), χλωριούχο ασβέστιο 2% (w/v) και γλυκερόλη 10% (v/v) (μεταχείριση Α) καθώς και άλλα 4 του ίδιου βάρους σε διάλυμα που περιείχε αλγινικό νάτριο 1.5% (w/v), χλωριούχο ασβέστιο 2% (w/v), γλυκερόλη 10% (v/v) και 0.2% υγρό καπνό L9 (μεταχείριση Β). Όσον αφορά την εμβάπτιση (coating), τα φιλέτα παρέμειναν ένα λεπτό στα αλγινικά άλατα, πιο συγκεκριμένα σε διάλυμα αλγινικού νατρίου 1.5% (w/v) πρώτα και ύστερα για ένα λεπτό σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου 2% (w/v). Στη συνέχεια, τα φιλέτα του μάρτυρα καθώς και από τις δύο μεταχειρίσεις αποθηκεύθηκαν στους 4°C για 10 ημέρες. Οι δειγματοληψίες για μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιούνταν κάθε δύο μέρες.

Οι εδωδιμες μεμβράνες αποτελούνται από ένα λεπτό στρώμα βρώσιμου υλικού που τοποθετείται απευθείας στο τρόφιμο, με ψεκασμό, επάλειψη ή με εμβάπτιση του τροφίμου σε αυτό και θεωρείται μέρος του τελικού προϊόντος. Η πιο χρήσιμη ιδιότητα των αλγινικών είναι ο σχηματισμός πηκτώματος. Ο σχηματισμός αυτός πραγματοποιείται όταν σε διάλυμα αλγινικού νατρίου εισαχθούν δισθενή κατιόντα, δηλαδή σύμφωνα με την παρούσα πτυχιακή εργασία, ιόντα ασβεστίου. Μεταφέρθηκαν 300 ml απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως και με ταυτόχρονη ανάμιξη σε ομογενοποιητή Ultra-Turax, προστέθηκε σταδιακά η ποσότητα του αλγινικού νατρίου η οποία ήταν 4,5 g. Μόλις ομογενοποιήθηκε το διάλυμα και απέκτησε παχύρρευστη υφή τύπου γέλης, προστέθηκαν 30 ml γλυκερόλης για την μεταχείριση A, ενώ για την μεταχείριση B προστέθηκε ο υγρός καπνός L9 ποσότητας 0,6 ml.

2.3 Εκτίμηση εμπορικού χρόνου ζωής με οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πενταβάθμια κλίμακα, και η αξιολόγηση των οργανοληπτικών παραμέτρων (εμφάνιση, οσμή, ελαστικότητα, κτλ) έγινε σύμφωνα με τον Οδηγό της Ευρωπαϊκής Ένωσης Multilingual Guide to EU Freshness Grades for Fishery Products. Έτσι, με 5 βαθμολογήθηκε το άριστο (E), με 4, 3 και 2 το φρέσκο(A), το αποδεκτό (B) και μη αποδεκτό (C), αντίστοιχα, ενώ με 1 το αλλοιωμένο. Βάσει της γενικής βαθμολογίας, ως χρόνος απόρριψης ορίστηκε ο χρόνος όπου το προϊόν βαθμολογήθηκε με 2 έστω από τους 2 εκ των 5 κριτών.

2.4 Μικροβιολογική ανάλυση

Όσον αφορά τα μικροβιολογικά υλικά και τα εδώδιμα χημικά αντιδραστήρια, τα πρώτα προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK) εκτός από το IronAgar (IA) το οποίο προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram et al. (1987). Η γλυκερόλη (φυτική) και το αλγινικό νάτριο προέρχονταν από την εταιρεία ManisChemicals (Ελλάδα).

2.5 Διαδικασία παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Tryptone Soy Agar (TSA)

Σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Περιείχε τα παρακάτω: Tryptone 15 g^l⁻¹, Soy Peptone 5 g^l⁻¹, NaCl 5 g^l⁻¹, και Agar 16 g^l⁻¹. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Σκοπός είναι η εύρεση των συνολικών αποικιών της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX).

Cetrimide Fucidin Cephaloridine agar (CFC)

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 48.4g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, μετά την προσθήκη Pseudomonas agar 28.4 g^l⁻¹, συμπληρώθηκαν 10 ml γλυκερόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθεί το θρεπτικό. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά. Το τελικό pH ήταν 7.1 ± 0.2 στους 25°C. Στη συνέχεια το θρεπτικό αφέθηκε να κρυώσει σε υδατόλουτρο μέχρι τους 45-50°C και προστέθηκε ένα φιαλίδιο με εκλεκτικό υλικό CFC, όπου συνήθως αποτελείται από αντιβιοτικό X108, ενώ πρώτα είχε διαλυθεί σε 10 ml αποστειρωμένο

νερό με 50 % αιθανόλη. Ύστερα, ακολούθησε η διαδικασία ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Αφέθηκε σε κατάσταση ηρεμίας ώστε να στερεοποιηθεί πλήρως στα τρυβλία και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 5-10°C για μελλοντική χρήση. Σκοπός είναι η εύρεση των συνολικών αποικιών των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.).

Iron Agar (IA)

Προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram et al. (1987) και περιείχε τα παρακάτω γι ποσότητα 1000 ml: Bacteriological peptone from Meat 20 g^l⁻¹, meat (beef) extract 3.0 g, yeast extract 3.0 g^l⁻¹, ferric citrate 0.3g^l⁻¹, sodium thiosulphate 0.4g^l⁻¹, NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 g^l⁻¹ και agar 14 g^l⁻¹. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.4. Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Σκοπός είναι η εύρεση των συνολικών αποικιών των υδροθειοπαραγών βακτηρίων.

De Man, Rogosa, Sharpe agar (MRS)

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 70g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Πιο συγκεκριμένα, περιείχε 55 g^l⁻¹ MRS Broth και 12 g^l⁻¹ agar. Το θρεπτικό θερμάνθηκε μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και έπειτα αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά. 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. Σκοπός είναι η εύρεση των συνολικών αποικιών των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

2.6 Μικροβιολογική ανάλυση

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν διπλά δείγματα σάρκας των 10g (για τον μάρτυρα και για τις δύο μεταχειρίσεις), μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, προστίθονταν 90ml Maximum Recovery Diluent (MRD-NaCl 0,85% και 0,1% Peptone) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 3 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (BugMixer, Interscience, London, UK). 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.

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική της επίστρωσης ήταν α) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα σε TSA μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48-72 ώρες, β) *Pseudomonas spp.* σε CFC ύστερα από επώαση στους 25°C για 48 ώρες γ) βακτήρια που παράγουν H₂S σε IA, με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48 ώρες, και δ) οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS, με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες.

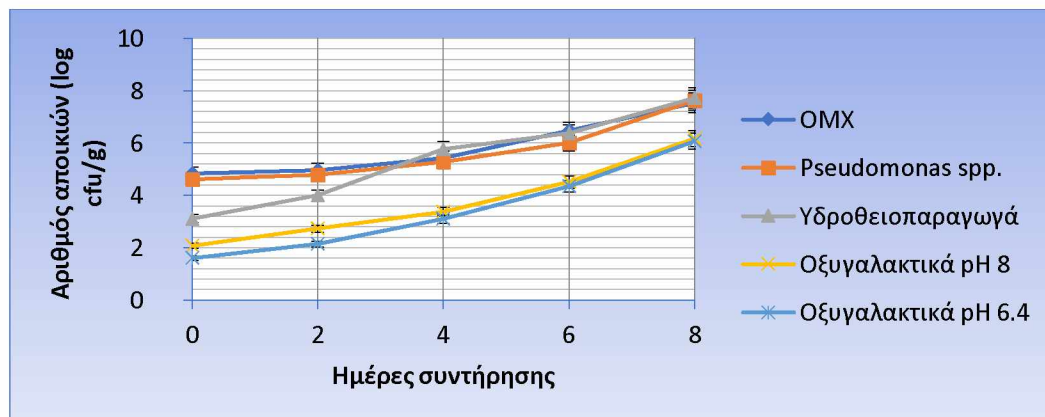
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εμπορικός χρόνος ζωής

Βάσει της αξιολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που πραγματοποιούνταν κάθε δύο ημέρες, η οσμή και η γενικότερη εμφάνιση των φιλέτων που αποτελούσαν τον μάρτυρα υποβαθμίστηκαν (παραγωγή δυσάρεστων οσμών, κ.ά.) αλλά θεωρήθηκαν αποδεκτά για κατανάλωση μέχρι την 5-6^η ημέρα της συντήρησης, ενώ τα φιλέτα της μεταχείρισης A μέχρι την 6^η ημέρα και τα φιλέτα της μεταχείρισης B μέχρι την 8-9^η ημέρα. Επομένως, ο χρόνος ζωής ορίστηκε στις 5-6 ημέρες για τον μάρτυρα, στις 6 ημέρες για τα φιλέτα της μεταχείρισης A και στις 8 ημέρες για τα φιλέτα της μεταχείρισης B, πράγμα το οποίο καθιστά την B ως την πιο αποτελεσματική μεταχείριση σε σχέση με την A και τον μάρτυρα.

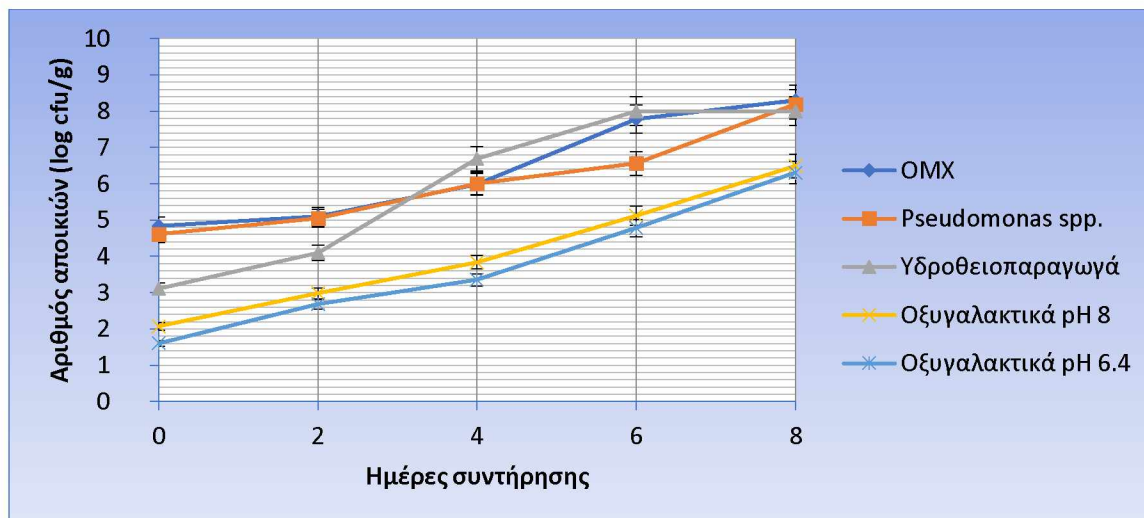
3.2 Μεταβολές του μικροβιακού πληθυσμού στα φιλέτα τσιπούρας

Οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX αλλά και των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών, συγκεκριμένα των *Pseudomonas* spp., υδροθειούχων (H_2S) και οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τεμάχια τσιπούρας κάθε μεταχείρισης, αποθηκευμένων στους $4^{\circ}C$, φαίνονται στις παρακάτω εικόνες (Εικ. 3.1-3.3).



Σχήμα 3.1 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας (μάρτυρας), κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων ($2 \times 2 = 4$) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών.

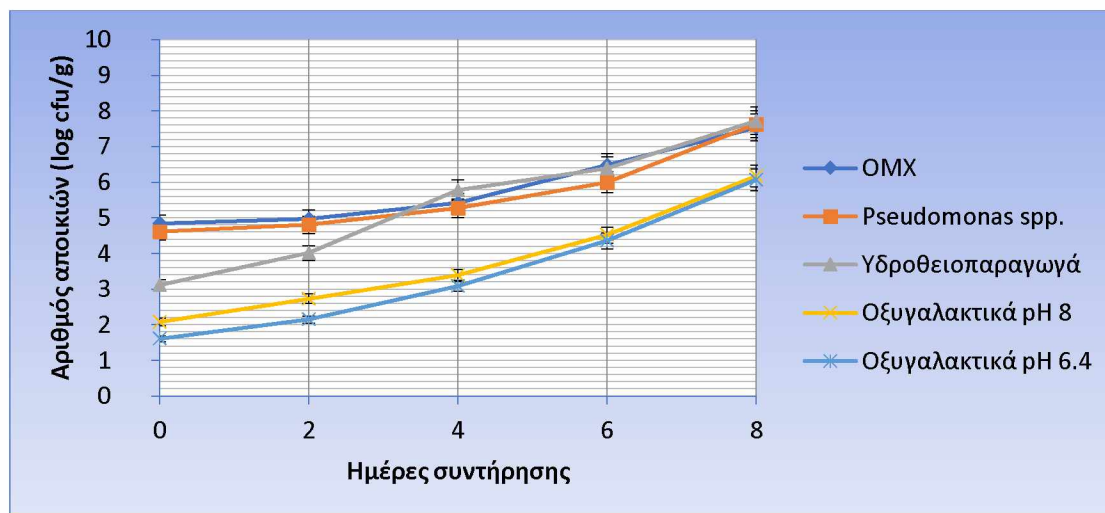
Στον μάρτυρα (Σχήμα 3.1), η OMX βρέθηκε αρχικά (ημέρα 0) σε πληθυσμό 4,84 log cfu/g, ενώ τα *Pseudomonas* spp., τα θειοπαραγωγά και τα οξυγαλακτικά βακτήρια στο pH 8 και στο pH 6.4 βρέθηκαν σε πληθυσμούς 4.61, 3.11, 2.08 και 1.6 log cfu/g, αντίστοιχα. Τη δεύτερη ημέρα συντήρησης, η OMX βρέθηκε να είναι 5.59 log cfu/g, τα *Pseudomonas* spp. 5.45 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά βακτήρια 4.5 log cfu/g, τα οξυγαλακτικά στο pH 8 να είναι 3.22 log cfu/g και στο pH 6.4, 2.94 log cfu/g. Όσον αφορά την τέταρτη ημέρα συντήρησης, η OMX βρέθηκε στα επίπεδα των 6.82 log cfu/g, τα *Pseudomonas* spp. στα επίπεδα των 6.38 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά στα επίπεδα των 6.97 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά στο pH 8 βρέθηκαν στους 4.16 log cfu/g και στο pH 6.4, στους 3.74 log cfu/g. Την έκτη μέρα συντήρησης (τέλος εμπορικού χρόνου ζωής καθώς παρατηρείται υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών), η τιμή της OMX βρέθηκε στα επίπεδα των 8.53 log cfu/g, των *Pseudomonas* spp. στα 7.96 log cfu/g, των θειοπαραγωγών βακτηρίων στα 8.17 log cfu/g, ενώ των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο pH 8 και στο pH 6.4, ο πληθυσμός βρέθηκε στους 5.86 log cfu/g και 5.21 log cfu/g, αντίστοιχα. Την τελευταία μέρα του πειράματος (8^η ημέρα), λόγω της υποβάθμισης της ποιότητας, η OMX βρέθηκε στους 9.07 log cfu/g, τα *Pseudomonas* spp. στους 8.86 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά στους 8.51 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά στο pH 8 στους 6.92 log cfu/g, και στο pH 6.4 στους 6.62 log cfu/g.



Σχήμα 3.2 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας που εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα που περιείχε αλγινικό νάτριο 1.5% (w/v), χλωριούχο ασβέστιο 2% (w/v) και γλυκερόλη 10% (v/v) (μεταχείριση A), κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2X2=4) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών.

Η ημέρα 0 ήταν κοινή για τις μεταχειρίσεις και το μάρτυρα (επομένως ίδιοι πληθυσμοί). Την δεύτερη ημέρα συντήρησης, ο πληθυσμός της OMX βρέθηκε στους 5.10 log cfu/g στα φιλέτα της μεταχείρισης A, των *Pseudomonas* spp. στους 5.05 log cfu/g, των θειοπαραγωγών βακτηρίων στους 4.1 log cfu/g, ενώ των οξυγαλακτικών στο pH 8 στους 2.98 log cfu/g και στο pH 6.4 στους 2.68 log cfu/g. Την τέταρτη ημέρα συντήρησης, η OMX βρέθηκε στα επίπεδα των 5.98 log cfu/g, τα *Pseudomonas* spp. στα επίπεδα των 6.01 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά στα επίπεδα των 6.69 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά στο pH 8 βρέθηκαν να είναι στους 3.84 log cfu/g και στο pH 6.4 στους 3.35 log cfu/g. Την έκτη μέρα συντήρησης (τέλος εμπορικού χρόνου ζωής, με βάση της αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών), η τιμή της OMX βρέθηκε να έχει πληθυσμό 7.78 log cfu/g, τα *Pseudomonas* spp. 6.56 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά 7.46 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια στο pH 8 βρέθηκαν σε πληθυσμό 5.12 log cfu/g

και στο pH 6.4 σε πληθυσμό 4.78 log cfu/g. Την τελευταία μέρα του πειράματος, δηλαδή την όγδοη, η OMX ήταν 8.3 log cfu/g, οι ψευδομονάδες ήταν 8.19 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά έχουν τιμές 8 log cfu/g, τελευταία και εξίσου σημαντικά είναι τα οξυγαλακτικά όπου για pH 8 είναι 6.49 log cfu/g, ενώ για pH 6.4 είναι 6.31 log cfu/g (Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.3 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας που εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα που περιείχε αλγινικό νάτριο 1.5% (w/v), χλωριούχο ασβέστιο 2% (w/v), γλυκερόλη 10% (v/v) και 0.2% υγρό καπνό L9 (μεταχείριση B), κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2X2=4) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών.

Στην μεταχείριση B, οι αρχικοί πληθυσμοί ήταν ίδιοι με αυτούς του μάρτυρα και της μεταχείρισης A. Τη δεύτερη ημέρα συντήρησης, η OMX ήταν 4.97 log cfu/g τα *Pseudomonas* spp. 4.8 log cfu/g, τα υδροθειοπαραγωγά βακτήρια 4.01 log cfu/g, τα οξυγαλακτικά βακτήρια στο pH 8 ήταν 2.73 log cfu/g και στο pH 6.4 ήταν 2.14 log cfu/g. Την τέταρτη ημέρα συντήρησης, η OMX βρέθηκε 5.42 log cfu/g, τα *Pseudomonas* spp. 5.27 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά βακτήρια 5.77 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά στο pH 8 βρέθηκαν να είναι σε πληθυσμό 3.38 log cfu/g

και στο pH 6.4 σε πληθυσμό 3.09 log cfu/g. Την έκτη μέρα συντήρησης, η τιμή της OMX ήταν 6.48 log cfu/g, τα *Pseudomonas* spp. στα 6 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά βακτήρια 6.39 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά στο pH 8 ήταν 4.51 log cfu/g και στο pH 6.4 ήταν 4.35 log cfu/g. Την τελευταία μέρα του πειράματος (8^η ημέρα), που ορίστηκε και ως το τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής με βάση τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, η OMX ήταν 7.53 log cfu/g, οι ψευδομονάδες ήταν 7.63 log cfu/g, τα θειοπαραγωγά ήταν 7.72 log cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά στο pH 8 ήταν 6.17 log cfu/g, και στο pH 6.4 ήταν 6.07 log cfu/g.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διάρκεια ζωής των συντηρημένων αλιευμάτων υπό ψύξη εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία ψύξης, τη συσκευασία, το αρχικό μικροβιακό φορτίο και το είδος του αλιεύματος. Οι ιχθύες με υψηλότερο αρχικό μικροβιακό φορτίο έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής, διότι επέρχεται ταχύτερα το επίπεδο αλλοίωσης. Έτσι, επιβάλλεται η άμεση ψύξη διότι καθυστερεί τις διεργασίες αλλοίωσης (αυτολυτικές, μικροβιολογικές, χημικές). Ωστόσο, η κοινή συντήρηση των αλιευμάτων υπό ψύξη δεν επαρκεί για να καθυστερήσει την αύξηση των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα τη γρήγορη υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κι επομένως τη γρήγορη αλλοίωση. Για παράδειγμα ο μέσος χρόνος ζωής του νωπού φιλέτου τσιπούρας στους 4°C είναι περίπου 5 ημέρες, ενώ μόλις από τη δεύτερη ημέρα της συντήρησης ξεκινάει η υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Parlapani et al., 2014). Για το λόγο αυτό, έχουν δοκιμαστεί διάφορες τεχνολογίες, συμπεριλαμβανομένων των συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας, της συσκευασίας κενού, κ.ά., με την επιπλέον προσθήκη διάφορων άλλων εμποδίων όπως καπνού, άλατος, μαρινάδας, κ.ά., που έχουν ως σκοπό τη διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και συνεπώς την επιμήκυνση του εμπορικού χρόνου ζωής. Στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση της επίδρασης εδώδιμων επικαλυμμάτων αλγινικών αλάτων (coatings) σε συνδυασμό ή όχι με υγρό καπνό που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία κάπνισης ιχθυηρών, στο μικροβιακό προφίλ και στον εμπορικό χρόνο ζωής φιλέτων τσιπούρας αποθηκευμένων υπό ψύξη (4°C).

Η μικροχλωρίδα αλλοίωσης θεωρείται από τους κύριους παράγοντες αλλοίωσης και εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος της επιμόλυνσης στα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, τις συνθήκες μικροβιακής ανάπτυξης λόγω των ενδογενών (pH, aw, Eh) και των εξωγενών (θερμοκρασία, ατμόσφαιρα κ.ά.) παραγόντων, τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις και

τους παράγοντες που αφορούν την επεξεργασία των προϊόντων (Parlapani et al., 2018b). Τα τελευταία χρόνια, διάφοροι ερευνητές έχουν δώσει μία διαφορετική προσέγγιση στη συντήρηση των τροφίμων με συσκευασία, όπως είναι η ανάπτυξη εδωδιμων μεμβρανών και επικαλυμμάτων. Γενικά, οι βρώσιμες μεμβράνες παρασκευάζονται ξεχωριστά και στη συνέχεια εφαρμόζονται στην επιφάνεια του φαγητού, ενώ οι επικαλύψεις σχηματίζονται απευθείας στις επιφάνειες των τροφίμων (Cordeiro de Azeredo, 2012). Έρευνες έχουν δείξει ότι και οι δύο μέθοδοι μπορούν να ενισχύσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των συσκευασμένων ιχθυηρών, όταν διαμορφώνονται σωστά. Διάφοροι ερευνητές ασχολήθηκαν με την ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών παραγόντων σε βρώσιμα φιλμ που χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη τροφίμων με ελάχιστη επεξεργασία. Επιπλέον, με την ενσωμάτωση αντιβακτηριακών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, μπορούν να λειτουργήσουν για να επιβραδύνουν την οξείδωση και/ή να καθυστερήσουν τη μικροβιακή αλλοίωση. Ωστόσο, η διαπερατότητα και οι μηχανικές τους ιδιότητες είναι γενικά φτωχότερες από τις συνθετικές μεμβράνες και αυτό θα περιορίσει τη χρήση τους σε συγκεκριμένες εφαρμογές. Με περαιτέρω έρευνα, ορισμένοι από αυτούς τους περιορισμούς θα ξεπεραστούν.

Μεμβράνες και επικαλύψεις με βάση από πολυσακχαρίτες μπορούν να κατασκευαστούν με κυτταρίνη, άμυλο (φυσικό και τροποποιημένο), παράγωγα πηκτίνης, εκχυλίσματα φυκιών (π.χ. αλγινικά, καραγενάνη και άγαρ) και χιτοζάνη. Έτσι, διάφορες μελέτες έγιναν σε διάφορα είδη ιχθυηρών. Πιο συγκεκριμένα, η επικάλυψη με αλγινικό νάτριο έδωσε σημαντική παράταση ζωής σε περίπου 160 ώρες σε σύγκριση με 57 ώρες για μη συσκευασμένα στρείδια, σύμφωνα με τους Costa et al., το 2014. Οι Hamzeh and Rezaei (2012) απέδειξαν την αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων, την διατήρηση της ποιότητας των ψαριών λόγω του μειωμένου βαθμού χημικής αλλοίωσης και των συνολικών αισθητηριακών αξιών της πέστροφας του ουράνιου

τόξου. Επίσης, παρατηρήθηκε αργή οξείδωση των λιπιδίων και σημαντικά μειωμένες πτητικές αλλαγές στον καπνιστό σολομό (Kim et al., 2012). Μικροβιολογικές, χημικές και αισθητηριακές αναλύσεις αξιολόγησης δείχνουν χαρακτηριστικά καλής ποιότητας και παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του ασημένιου κυπρίνου κατά την κατάψυξη (Fang et al., 2009). Η εφαρμογή coating μετά την κατάψυξη αύξησε την απόδοση απόψυξης, μείωσε την απώλεια και τροποποίησε τις παραμέτρους χρώματος των κατεψυγμένων και αποψυγμένων φιλέτων σολομού Ατλαντικού, σε σύγκριση με την εφαρμογή πριν από την κατάψυξη. Οι πρωτεϊνικές επικαλύψεις καθυστέρησαν την οξείδωση των λιπιδίων των φιλέτων σολομού, παρέχοντας καλύτερη προστασία (Rodríguez-Turiénzo et al., 2011). Οι βρώσιμες μεμβράνες με προστιθέμενα φυτικά εκχυλίσματα μείωσαν τα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων (όπως μετρήθηκαν με τους δείκτες υπεροξειδίου και TBARS) και επίσης, σε μικρότερο βαθμό, μείωσαν την μικροβιακή ανάπτυξη (συνολικές μετρήσεις), ενώ οι βρώσιμες μεμβράνες με βάση τη ζελατίνη-χιτοζάνη μείωσαν τους μικροβιακούς αριθμούς (συνολικές μετρήσεις, βακτήρια αναγωγής θειούχων). Ο συνδυασμός βρώσιμων μεμβρανών και υψηλής πίεσης, έχει ως αποτέλεσμα τόσο την πρόληψη της οξείδωσης όσο και την παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης. Έτσι, η επίδραση της επικάλυψης και της μεμβράνης χιτοζάνης-ζελατίνης στην εξέλιξη της οξύτητας στα φιλέτα πέστροφας ουράνιου τόξου κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στο ψυγείο ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) εξετάστηκε σε διάστημα 16 ημερών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επικάλυψη και η μεμβράνη χιτοζάνης-ζελατίνης διατήρησαν τα καλά ποιοτικά τους χαρακτηριστικά και επέκτειναν τη διάρκεια ζωής των δειγμάτων ψαριών κατά την αποθήκευση στο ψυγείο. Η επιστροφή ήταν καλύτερη από την μεμβράνη στη μείωση της λιπιδικής οξείδωσης των φιλέτων.

Η ενσωμάτωση λιπιδίων σε βρώσιμα φιλμ και επιχρίσματα μπορεί να βελτιώσει τη συνοχή, την υδροφοβία και την ευκαμψία, δημιουργώντας καλύτερα εμπόδια υγρασίας. Αυτό

μπορεί να βοηθήσει στην επέκταση της φρεσκάδας, του αρώματος, του χρώματος, της τρυφερότητας και της μικροβιολογικής σταθερότητας των φρέσκων και επεξεργασμένων θαλασσινών.

Υπάρχει πλέον ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων για την παραγωγή βρώσιμων μεμβρανών που έχουν διάφορες λειτουργίες, όπως αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές, αποκλειστές αερίων και αποκλεισμού υγρασίας, πέρα από την παραγωγή απλών φυσικών πολυμερών βρώσιμων μεμβρανών (Dehghani, Hosseini & Regenstein, 2018). Ως εκ τούτου, διάφορες μέθοδοι όπως η επιφανειακή τροποποίηση φυσικών πολυμερών, η ανάμειξη με άλλα πολυμερή και η ενσωμάτωση διαφόρων λειτουργικών εκχυλισμάτων έχουν προταθεί για την παραγωγή λειτουργικών βρώσιμων μεμβρανών (Pavli et al., 2018 ; Zheng et al., 2019). Παρόμοια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τις βρώσιμες επικαλύψεις αλγινικών αλάτων και γλυκερόλης της παρούσας πτυχιακής εργασίας προκειμένου να εξεταστεί η λειτουργικότητά τους.

Οι Shiyuan & Fang et al.(2019), απέδειξαν τις αντιοξειδωτικές και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες που εμφάνισαν οι μεμβράνες λιναρόσπορου και αλγινικού νατρίου με καρβακρόλη στην βελτίωση του λαβρακιού της Κίνας (*Lateolabrax maculatus*) κατά την διάρκεια της αποθήκευσής του υπό ψύξη. Καρβακρόλη χρησιμοποίησαν και οι Neira et al.(2019), ενώ τα αποτελέσματα αποκάλυψαν τη σημασία της καρβακρόλης ως δραστικού παράγοντα στα συσκευασμένα τρόφιμα. Οι Gómez-Estaca et al (2009), έλεγξαν τη χρησιμότητα του αιθέριου ελαίου γαρύφαλλου ως φυσικό αντιμικροβιακό πρόσθετο όταν περιλαμβάνεται σε βρώσιμα φιλμ με βάση τη ζελατίνη ψαριού ή τη ζελατίνη ψαριού και χιτοζάνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ούτε η μεμονωμένη μεμβράνη ζελατίνης (όπως αναμενόταν) ούτε η σύνθετη μεμβράνη ζελατίνης-χιτοζάνης έδειξαν αντιβακτηριακή δράση. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλές αναφορές

που δείχνουν ότι οι επικαλύψεις και τα φιλμ χιτοζάνης είναι αποτελεσματικά ως αντιμικροβιακές θεραπείες (Gómez-Estaca et al., 2009) αλλά τα αποτελέσματα διαφέρουν πολύ από τις πειραματικές διαδικασίες. Για παράδειγμα, οι Zivanovic et al.(2005) βρήκαν ένα φιλμ χιτοζάνης που δεν αναστέλλει ούτε το *L. monocytogenes* ούτε το *E. coli* κατά τη δοκιμή του in vitro, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου. Ωστόσο, βρήκαν μείωση 1–2 logόταν εφάρμοσαν την ίδια μεμβράνη για την διατήρηση των φιλέτων. Το αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου έχει δείξει καλές ανασταλτικές επιδράσεις τόσο στους παθογόνους όσο και στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου γαρύφαλλου διατηρήθηκε όταν ενσωματώθηκε σε βρώσιμα φιλμ, αλλά διαπιστώθηκαν κάποιες διαφορές.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αλληλεπιδράσεις ζελατίνης-χιτοζάνης στη μεμβράνη θα μπορούσαν να επηρεάσουν την απελευθέρωση δραστικών ενώσεων που υπάρχουν στο αιθέριο έλαιο, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητά του. Επομένως, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των συστατικών της μήτρας. Οι Martínez et al.(2018) εξέτασαν την βελτίωση ποιότητας φιλέτων καπνιστού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) με προσθήκη ρεσβερατρόλης και επίστρωση με βρώσιμα φιλμ χιτοζάνης και αλγινικού άλατος. Η ρεσβερατρόλη είναι μια φυτοαλεξίνη που συντίθεται από διάφορα φυτά ως απόκριση σε δυσμενείς συνθήκες όπως το περιβαλλοντικό στρες ή η παθογόνος επίθεση. Οι λειτουργικές ιδιότητες αυτού του μορίου έχουν μελετηθεί ευρέως, αλλά υπάρχει μικρή έρευνα για το ρόλο του ως πιθανό συντηρητικό ποιότητας τροφίμων. Έχει υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό, επομένως μπορεί να βοηθήσει στην επιβράδυνση της εμφάνισης της οξίνισης της γεύσης στα αλιευτικά προϊόντα. Παρ' όλα αυτά, έχει χαμηλή αντίσταση στο φως και οξειδώνεται γρήγορα (López-Hernández et al., 2009). Μια πιθανή λύση είναι η προστασία αυτού του μορίου με μεμβράνες ή βρώσιμα επιχρίσματα που θα βοηθήσουν στη διατήρηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του

κατά τη διάρκεια ζωής του τροφίμου στο οποίο προστίθεται. Οι Parreid et al., (2018), δημιούργησαν ένα μείγμα δύο υγρών καπνών με διαφορετική σύνθεση που έδειξε τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του ενός από αυτούς απώλεια στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στην ποιότητα σε φιλέτα λαβρακιού. Το αλάτι και το κάπνισμα με υγρά οδηγούν σε σημαντική βελτίωση της ποιότητας της υγιεινής, όταν επιλέγεται το κατάλληλο μείγμα.

Αυτό φάνηκε και στα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, καθώς οι βρώσιμες επικαλύψεις αλγινικών αλάτων, γλυκερόλης και συγκεκριμένης συγκέντρωσης υγρού καπνού L9 ήταν πιο αποτελεσματικές έναντι των μεμβρανών που περιείχαν μόνο αλγινικά άλατα και γλυκερόλη όσον αφορά την αριθμό των αποικιών των μικροοργανισμών αλλοίωσης. Φαίνεται δηλαδή η σταδιακή μείωση του μέσου όρου της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας από τον μάρτυρα στην μεταχείριση A και ύστερα στην μεταχείριση B. Ενώ αποδεικνύεται από τον αριθμό των αποικιών ότι ο πιο ανθεκτικός αλλοιογόνος μικροοργανισμός είναι οι ψευδομονάδες, κάτι που είναι λογικό γιατί οι θερμοκρασίες ψύξης εντάσσονται στο εύρος των θερμοκρασιών που είναι ικανές να αναπτυχθούν, μειώνεται επίσης σταδιακά ο μέσος όρος των αποικιών τους από τον μάρτυρα στην μεταχείριση A και ακόμα περισσότερο στην μεταχείριση B. Με μικρότερη συχνότητα αλλά με παρόμοιο τρόπο μειωνόταν και ο μέσος όρος των υδροθειοπαραγωγών από τον μάρτυρα στην μεταχείριση A και περισσότερο στην μεταχείριση B και το ίδιο στα οξυγαλακτικά με μεγαλύτερο αριθμό στο ελαφρώς βασικό pH από ό,τι στο ελαφρώς όξινο. Τελευταίο και εξίσου σημαντικό εύρημα ήταν ότι η χιτοζάνη παρήγαγε τη μεγαλύτερη μείωση των βιώσιμων μετρήσεων, δηλαδή σχεδόν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης μεσόφιλων, ψυχρόφιλων και αναερόβιων βακτηρίων (Socaciu et al., 2018).

Εν κατακλείδι, οι εδώδιμες επικαλύψεις καθυστερούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλοίωσης και κυρίως των οξυγαλακτικών βακτηρίων και λιγότερο των

ψευδομονάδων όταν χρησιμοποιούνται μαζί αλγινικό νάτριο 1,5% w/v και χλωριούχο ασβέστιο 2% w/v, με 10% γλυκερόλη και 0,2% υγρό καπνό L9. Επιβραδύνεται επίσης και η ανάπτυξη των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων, οπότε συνεπάγεται μείωση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Η υγρή κάπνιση σε συνδυασμό με την ψύξη είναι αποτελεσματική μέθοδος συντήρησης χωρίς να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία όταν τίθεται προς κατανάλωση.



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρήθηκε καθυστέρηση της αύξησης των μικροβιακών πληθυσμών όταν το φιλέτο τσιπούρας έχει εμβαπτιστεί σε διάλυμα αλγινικών αλάτων, γλυκερόλης και 0,2% υγρού καπνού L9, σε σχέση με το αν εμβαπτιστεί σε διάλυμα που περιέχει μόνο τα αλγινικά ή μόνο ο μάρτυρας.

Οι βρώσιμες επικαλύψεις που περιέχουν αλγινικά άλατα, γλυκερόλη και υγρό καπνό L9, μπορούν να επιμηκύνουν αποτελεσματικά τη διάρκεια ζωής των φρέσκων ιχθυηρών κατά τρεις ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα και κατά δύο ημέρες με το αν χρησιμοποιούνταν μόνο το διάλυμα των αλγινικών με την γλυκερόλη.

Η συγκεκριμένη μέθοδος αντιπροσωπεύει μια οικονομική εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών τεχνολογιών συντήρησης (συσκευασία κενού και τροποποιημένης ατμόσφαιρας), λόγω των περιορισμένων επενδύσεων κεφαλαίου σε σύγκριση με αυτές. Συμβάλλουν ακόμη και στην μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος, διότι εκτός από βιοδιασπώμενες, οι βρώσιμες μεμβράνες και τα επιχρίσματα βελτιώνουν τη μικροβιολογική σταθερότητα των ψαριών και μειώνουν τα απόβλητα, επιβραδύνοντας ακόμη και την οξείδωση των λιπιδίων. Τα τελευταία 10 χρόνια, η έρευνα σχετικά με τη χρήση αντιμικροβιακών υλικών συσκευασίας για εφαρμογές νωπών ιχθυηρών έχει υποστεί σημαντική εξέλιξη και θα συνεχίσει να υφίσταται.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Belichovska K., Belichovska D., Pejkovski Z. (2019) Smoke and smoked fish production. Scientific Journal “Meat Technology”, 60(1), 37-43.

Comaposada J., Gou P., Marcos B., Arnau J. (2015) Physical properties of sodium alginate solutions and edible wet calcium alginate coatings. LWT - Food Science and Technology, 64: 212-219.

Dalgaard P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. International Journal of Food Microbiology.

Dehghani S., Hosseini S. V., Regenstein J. M. (2018) Edible films and coatings in seafood preservation: A review. Food Chemistry. Volume 240. Pages 505-513.

Dutta M., Majumdar P. R., Rakeb-Ul-Islam M. D., Saha D. (2018) Bacterial and Fungal Population Assessment in Smoked Fish during Storage Period. Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene.

Fang S., Zhou Q., Hu Y., Liu F., Mei J., Xie J. (2019) Antimicrobial Carvacrol Incorporated in Flaxseed Gum-Sodium Alginate Active Films to Improve the Quality Attributes of Chinese Sea bass (*Lateolabrax maculatus*) during Cold Storage. Molecules 2019.24(18) 3292.

Economou V., Gousia P., Kansouzidou A., Sakkas H., Karanis P., Papadopoulou C. (2013) Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of

Salmonella enterica isolated from surface waters 89 within an agricultural landscape. International Journal of Hygiene and Environmental Health, Pages 435-444.

Evageliou V., Gerolymatou A., Sotirakoglou K. , Gardeli G., Yanniotis S. (2015) Retention of trans-anethole by single and double layered films based on gelatin. Food Hydrocolloids 47: 94-98.

Gómez-Estaca J., López de Lacey A., Gómez-Guillén M. C., López-Caballero M. E., Montero P. (2009) Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil. Journal of Aquatic Food Product Technology..Volume 18. Issue 1-2.

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

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

Gutiérrez T.J., Suniaga J., Monsalve A., García N.L. (2016) Influence of beet flour on the relationship surface-properties of edible and intelligent films made from native and modified plantain flour. Food Hydrocolloids, 54: 234-244.

Hamzeh A. &Rezaei M. (2012) The Effects of Sodium Alginate on Quality of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillets Stored at $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Journal of Aquatic Food Product Technology 21(1):14-21.

- Hielm, S. E. Hyytiä, A. Andersin, H. Korkeala (1998) A high prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. *J. Appl. Microbiol.*
- Kim I. H., Yang H. J., Noh B. S., Chung S. J. (2012) Development of a defatted mustard meal-based composite film and its application to smoked salmon to retard lipid oxidation. *Food Chemistry*.133(4):1501–1509.
- Lin H., Jiang J., Li D. (2008) Potential Hazards in Smoke-Flavored Fish. *Journal of Ocean University of China*.
- Martínez O., Salmerón J., Epelde L., Soledad Vicente M., de Vega C. (2018) Quality enhancement of smoked sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets by adding resveratrol and coating with chitosan and alginate edible films. *Food Control*. Volume 85.Pages 168-176.
- Neira L. M., Agustinelli S. P., Ruseckaite R. A., Martucci J. F. (2019) Shelf life extension of refrigerated breaded hake medallions packed into active edible fish gelatin films. *Packaging Technology and Science*. Volume 32.Issue 9.Pages 471-480.
- Parreidt T. S, Müller K., Schmid M. (2018) Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods* 2018.7(10). 170.
- Park S., Nam J., Yun H., Jin H.J., Kwak H. W. (2021) Aquatic polymer-based edible films of fish gelatin crosslinked with alginate dialdehyde having enhanced physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*. Volume 254. 117317.

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 F. F., Michailidou S., Pasentsis K., Argiriou A., Krey G., Boziaris I. S. (2018) A meta-barcoding approach to assess and compare the storage temperature-dependent bacterial diversity of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) originating from fish farms from two geographically distinct areas of Greece. *Int J Food Microbiology*.2;278:36-43.

Paula G.A., Benevides N.M.B., Cunha A.P., Vitória de Oliveira A., Pinto A.M.B., Morais J.P.S., Azeredo H.M.C. (2015) Development and characterization of edible films from mixtures of carrageenan, i-carrageenan, and alginate *Food Hydrocolloids*, 47: 140-145.

Rodriguez-Turienzo L., Cobos A., Diaz O. (2012) Effects of edible coatings based on ultrasound-treated whey proteins in quality attributes of frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 14:92-98.

Socaciu M. I., Semeniuc C. A., Vodna D. C. (2018) Edible Films and Coatings for Fresh Fish Packaging: Focus on Quality Changes and Shelf-life Extension. *Coatings* 2018.8(10). 366.

Southcott B. A., Razzell W. E. (1973) Clostridium botulinum control in cold-smoked salmon: a review. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*.

Tavassoli-Kafrani E., Hajar Shekarchizadeh H., Masoudpour-Behabadi M. (2016) Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137:360–374.

Umaraw P., Munekata P. E. S., Verma A. K., Barba F. J., Singh V. P., Kumar P., Lorenzo J. M. (2020) Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. Trends in Food Science & Technology. Volume 98. Pages 10-24.

Young, L. L., Reviere, R. D., and Cole, A. B. (1988). Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres. Food Technol. 42, 65-69.

Zivanovic S., ChiS.Draughon A. F. (2005) Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. FoodScience. Volume 70. Issue 1. Pages M45-M51.

Ελληνική βιβλιογραφία

Αρβανιτογιάννης Ι. Σ., Στρατάκος Α. Χ. (2011) Τεχνολογίες επεξεργασίας και συσκευασίας τροφίμων. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Γκιόκα Φ. (2017) Εφαρμογή της υπερυψηλής πίεσης σε γαλακτοκομικά προϊόντα. ΤΕΙ Πελοποννήσου. Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων. Πτυχιακή εργασία.

Μπλούκας Ι. Γ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Καθηγητή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων.

Μποζιάρης Ι. (2012) Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2η Έκδοση.

Μποζιάρης Ι. (2013) Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 3η Έκδοση.

Παυλαπάνη Φ. Φ. (2013) Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα. Διπλωματική Εργασία για το Διδακτορικό Πρόγραμμα Σπουδών.

Χατζηγιάννης Χ. (2019) Συσκευασία τροφίμων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP). LinkedIn.

7. ABSTRACT

In the present undergraduate Thesis, the effect of sodium alginate edible coatings in combination or not with a certain concentration of L9 liquid smoke, on the microbial profile, as well as on the commercial shelf life of fillets was studied at 4°C. Untreated fillet (control), fillet with alginates edible coating (treatment A) and fillet with alginates edible coating containing liquid smoke (treatment B) were chilled stored at 4°C for 10 days. To monitor changes in the microbial population (TVC and main microbial spoilage genera) and organoleptic characteristics, sampling was performed every two days. According to the results, treatment B was more effective than treatment A, since the populations of *Pseudomonas* spp., lactic acid and hydrogen sulfide producing bacteria were found to be lower (1.5-2 logarithms) and the commercial shelf life was extended by three days relatively to control and treatment A. In conclusion, edible coatings containing alginates, and liquid smoke, prolong the life of fresh fish. This method might be used as an economical alternative to conventional technologies for the preservation of fish, which also has the advantage of reducing food losses.

Keywords: edible films, edible coatings, liquid smoke tobacco, *Sparus aurata*, spoilage microorganisms, shelf-life.

