

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Μικροβιολογικές μεταβολές και διάρκεια ζωής ελαφρά αλατισμένων
φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) κατά την συντήρηση σε
αερόβιες συνθήκες, κενό και τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4°C »



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Μαρία Γ. Ειρηνάκη

Βόλος, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

2) **Φωτεινή Παρλαπάνη (M.Sc., Ph.D.)**, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων - Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες 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, Καθηγητή Δρ. Μποζιάρη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενη από τους Δρ. Παρλαπάνη Φωτεινή και Δρ. Καραπαναγιωτίδη Ιωάννη.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αναγνωστόπουλο Δημήτριο, Δρ. Μαρτσικάλη Πέτρο την υποψήφια διδάκτορα Συροπούλου Φαίδρα και τον υποψήφιο διδάκτορα Τσαρτσιάφη Αθανάσιο και την υπόλοιπη επιστημονική ομάδα για την αρωγή και την καθοδήγησή τους.

Τέλος, το θερμότερο ευχαριστήριο στην οικογένειά μου για την πολύτιμη υποστήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου, στην αδελφή μου Αντωνία και στον συμφοιτητή και μελλοντικό συνάδελφο Στέλιο Κουρδουσά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αξιολογήσει την επίδραση των συνθηκών αερόβιας συσκευασίας, κενού και τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) στο μικροβιολογικό προφίλ και την διάρκεια ζωής των ελαφρώς αλατισμένων φιλέτων λαβρακιού. Μετρήθηκαν επίσης φυσικοχημικές παράμετροι όπως a_w , υγρασίας και συγκέντρωση άλατος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το τέλος της διάρκειας ζωής των φιλέτων που αποθηκεύτηκαν αερόβια ήταν 6 ημέρες μικρότερο από αυτό των φιλέτου που αποθηκεύτηκαν σε κενό και MAP. Τα *Pseudomonas* spp. ακολουθήθηκαν από τα βακτήρια που παράγουν H_2S και ήταν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί σε όλες τις περιπτώσεις, παρόλο που τα επίπεδά τους ήταν χαμηλότερα σε δείγματα υπό κενό και αποθηκευμένα σε MAP κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου αποθήκευσης. Αντίθετα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ευνοήθηκαν στη συσκευασία κενού. Απαιτείται βελτιστοποίηση συνθηκών όπως a_w , περιεκτικότητα σε αλάτι στην υδατική φάση, επιλογή της καταλληλότερης μεμβράνης συσκευασίας καθώς και την επίτευξη της επιθυμητής μίξης αέριας ατμόσφαιρας για την επίτευξη της μέγιστης διάρκειας ζωής.

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the effect of aerobic, vacuum and modified atmosphere (MAP) packaging conditions on the microbiological profile and shelf life of lightly salted sea bass fillets. Physicochemical parameters such as a_w , moisture and salt concentration were also measured. The results showed that the end of life of fillets stored aerobically was 6 days shorter than that of fillets stored under vacuum and MAP. *Pseudomonas* spp. were followed by H_2S - producing bacteria and were the most dominant microorganisms in all cases, although their levels were lower in samples stored under vacuum and MAP during the entire storage period. In contrast, lactic acid bacteria were favored in vacuum packaging. Optimization of conditions such as a_w , aqueous phase salt content, selection of the most suitable packaging membrane and the desired gas-atmosphere mixture to achieve maximum shelf life is required.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία	7
1.1.1 Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758))	8
1.1.2 Ιστορική αναδρομή.....	10
1.2 Ευαισθησία αλιευτικών προϊόντων	10
1.2.1 Μικροβιακή αλλοίωση	12
1.3 Βασικές ομάδες αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στους ιχθύες	13
1.3.1 <i>Pseudomonas</i> spp	14
1.3.2 <i>Shewanella</i> spp.....	14
1.3.3 Enterobacteriaceae.....	15
1.3.4 Lactobacillales.....	15
1.4 Εμπορικός χρόνος ζωής (shelf life) και όρια ασφαλή προς κατανάλωση	15
1.4.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	16
1.5 Θεωρία εμποδίων και εφαρμογές.....	18
1.5.1 Συσκευασία σε κενό αέρος (Vaccum)	19
1.5.2 Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP).....	19
1.5.3 Συντήρηση υπό ψύξη.....	21
1.6 Σκοπός	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Προετοιμασία φιλέτων	24
2.2 Συσκευασία σε κενό αέρος (vacuum).....	25
2.3 Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP)	25
2.4 Ετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων	25
2.5 Διαδικασία εργαστηριακού μικροβιακού ελέγχου	26
2.6 Επάση και καταμέτρηση αποικιών	27
2.7 Λογαριθμικός υπολογισμός αποικιών	28
2.8 Μέτρηση ενεργότητας ύδατος (aw)	28
2.9 Μέτρηση υγρασίας.....	28
2.10 Μέτρηση αλατότητας	29
2.11 Οργανοληπτική αξιολόγηση	30
2.12 Μέτρηση αερίων στην συσκευασία VAC, MAP	30
2.13 Στατιστικός έλεγχος.....	30

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1 AIR μικροβιολογικό προφίλ.....	31
3.2 VAC μικροβιολογικό προφίλ.....	32
3.3 MAP μικροβιολογικό προφίλ.....	34
3.4 Φυσικοχημικές παράμετροι.....	35
3.5 Μέτρηση αερίων.....	37
3.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	38
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη ταλανίζεται λόγω του εκθετικά αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού. Βασική μέριμνα είναι η κάλυψη των διατροφικών αναγκών ανθρώπων διατηρώντας ταυτόχρονα την αύξηση των τροφικών αποθεμάτων, την ποικιλία διαθέσιμων τροφών, την ικανοποίηση υψηλών προδιαγραφών ποιότητας (ασφάλεια, περιβάλλον, ευημερία και ηθική) και την προσιτή τιμή για τον μέσο καταναλωτή. Έχοντας αυτά υπόψιν, οι προσπάθειες έχουν στραφεί στην ιχθυοκαλλιέργεια, ως ένα μέσο καταπολέμησης της έλλειψης ποιοτικών τροφών.

Το 2019 τα τρόφιμα που απορρίφθηκαν ζύγισαν τους 1,3 δισεκατομμύρια τόνους ή διαφορετικά το 1/3 των παραγόμενων τροφίμων. Πάνω από το 50% της συνολικής δαπάνης τροφίμων προέρχεται από τα νοικοκυριά, ακολουθούν υπόλοιποι τομείς όπως μονάδες παραγωγής ή/και επεξεργασίας τροφίμων αλλά και τον κλάδο των εστιατορίων και ξενοδοχείων. Ο κλάδος του εμπορίου τροφίμων συμμετέχει στο πρόβλημα με ποσοστό 5%. Επίσης πάνω από το 30% της συνολικής παραγωγής ψαριών χαλάει κάθε χρόνο λόγω προβλημάτων στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων (*Food and Agriculture Organization (FAO), 2020*).

Οι καταναλωτές ζητούν τα προϊόντα με τον μεγαλύτερο υπολειπόμενο χρόνο ζωής καθώς θεωρείται ενδεικτικό φρεσκάδας. Οι ποιοτικές απαιτήσεις έχουν αυξηθεί τόσο όσον αφορά τις οργανοληπτικές επιδόσεις όσο και την σταθερότητα υγιεινής του προϊόντος για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Όπως αναφέρεται στις Κατευθυντήριες Γραμμές του Ινστιτούτου Επιστήμης και Τεχνολογίας τροφίμων (*IFST, 1993*) “η διάρκεια

ζωής στο ράφι είναι η χρονική περίοδος κατά την οποία το διατροφικό προϊόν παραμένει ασφαλές, είναι βέβαιο ότι θα διατηρήσει τα αισθητήρια, χημικά, φυσικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του και θα τηρήσει με οποιαδήποτε επισήμανση τα θρεπτικά στοιχεία”.

Η επιμόλυνση και η δηλητηρίαση από την κατανάλωση θαλασσινών προκαλούνται συνήθως από την κατάποση των μικροοργανισμών των θαλασσινών και οι τροφιμογενείς ασθένειες από τα θαλασσινά είναι πιο συχνές σε χώρες με υψηλή κατανάλωση θαλασσινών ή με παραδόσεις κατανάλωσης ωμών θαλασσινών (Galaviz-Silva et al., 2009). Ψάρια που ανήκουν στις κλάσεις των Άγναθων (Agnatha), Χονδριχθύων (Chondrichthyes), ή των Οστειχθύων (Osteichthyes) είναι λιγότερο πιθανό να συσχετιστούν με τροφιμογενείς ασθένειες μιας και για την κατανάλωσή τους συνήθως μαγειρεύονται επαρκώς (Galaviz-Silva et al., 2009). Επίσης στόχος είναι και η επιβράδυνση της αλλοίωσης στην σάρκα των ιχθύων χρησιμοποιώντας εργαλεία και μεθόδους της επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων.

1.1.1 Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758))

Το λαβράκι συναντάται στη Μεσόγειο και στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού. Ζει σε παραλιακά ύδατα, σε βάθος μέχρι 100 μέτρων. Είναι ψάρι ευρύαλο και ευρύθερμο, αντέχει τις μεγάλες μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας του νερού. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζεται σε εύρος βάθους από 10 - 100 m και εύρος θερμοκρασίας από 8°C - 24°C (Fishbase, n.d.). Έχει σύνηθες μήκος 40 με 65 εκατοστά και βάρος 300 γραμμάρια με 7 κιλά (ΣΕΘ, 2020).

Το Λαβράκι μαζί με την τσιπούρα είναι ένα από τα κύρια εκτρεφόμενα και περιζήτητα Μεσογειακά ψάρια καθώς έχουν πλούσια διατροφική αξία. Μετρήσεις

παρουσιάζουν τα λιπίδια να μην ξεπερνούν τα 5 g/100g, πρωτεΐνες 20 g/100g, είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και ω – λιπαρά, ευεργετικά για την υγεία του καταναλωτή (Fuentes et al., 2010).

Η συνολική παγκόσμια παραγωγή λαβρακιού το 2019 εκτιμήθηκε στους 236.215 τόνους. Η Τουρκία είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός που αντιπροσωπεύει το 52,21% (137,419 tn) της παγκόσμιας παραγωγής. Ακολουθούν η Ελλάδα με 15,67% (41,237 tn) και η Αίγυπτος με 11,52% (30,313 tn) (Compassion in foodbusiness, 2021). Φαίνεται λοιπόν ότι το *D. labrax* είναι τρόφιμο το οποίο προτιμάται από τους καταναλωτές και υπάρχει ανάγκη για την εφαρμογή ορθής πρακτικής υγιεινής από την υδατοκαλλιέργεια έως και το πιάτο.

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη του λαβρακιού (Fishbase, n.d.)

Βασίλειο:	Ζώα (<i>Animalia</i>)
Συνομοταξία:	Χορδωτά (<i>Chordate</i>)
Ομοταξία:	Ακτινοπτερύγια (<i>Actinopterygii</i>)
Τάξη:	Περκόμορφα (<i>Perciformes</i>)
Οικογένεια:	Μορονίδες (<i>Moronidae</i>)
Γένος:	Δικέντραρχος (<i>Dicentrarchus</i>)
Είδος:	<i>D. Labrax</i>



Εικόνα 1. Απεικόνιση του *Dicentrarchus labrax*.

1.1.2 Ιστορική αναδρομή

Αιώνες πριν χρησιμοποιούταν διαφορετικές μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων, όπως το αλάτισμα ή η αφυδάτωση, για την πρόληψη της αλλοίωσης. Οι Αιγύπτιοι από το 3000 π.Χ. φαίνεται να καταναλώνουν γάλα, βούτυρο και τυρί και οι Βαβυλώνιοι με τους Κινέζους από το 1500 π.Χ. ζυμωμένα λουκάνικα (Ray & Bhunia, 2021). Μεταξύ 8000 και 1000 π.Χ., πολλές μέθοδοι συντήρησης τροφίμων, όπως στέγνωμα, μαγείρεμα, ψήσιμο, κάπνισμα, αλάτισμα, αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία (σε πάγο), αποθήκευση χωρίς αέρα (σε λάκκους), ζύμωση και (μπαχαρικά), χρησιμοποιήθηκαν, πιθανώς κυρίως για την επιβράδυνση της αλλοίωσης (Ray & Bhunia, 2021).

Τον 19ο αιώνα άρχισε να αναπτύσσεται η μελέτη της μικροβιολογίας των τροφίμων. Ο Λουί Παστέρ (*Louis Pasteur*) έπαιξε ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη της έρευνας για τη μικροβιολογία των τροφίμων. Ανακάλυψε και μελέτησε τις αρχές της μικροβιακής ζύμωσης και κατάλαβε πως η θερμότητα σκοτώνει τα βακτήρια. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται πλέον «παστερίωση». Οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν στη συνέχεια στην έρευνα συντήρησης τροφίμων. Ο τομέας της μικροβιολογίας τροφίμων εξακολουθεί να εξελίσσεται ραγδαία με νέα εργαλεία και τεχνικές για την ανακάλυψη και την πρόληψη τροφιμογενών ασθενειών που προκαλούνται από μικροοργανισμούς. Για τη διασφάλιση της ασφάλειας των προϊόντων διατροφής, απαιτούνται ακόμη και μικροβιολογικοί έλεγχοι για ασθένειες και αλλοίωση στις μέρες μας.

1.2 Ευαισθησία αλιευτικών προϊόντων

Τα θαλασσινά είναι από τα πιο ευπαθή τρόφιμα. Η αλλοίωση των θαλασσινών είναι αποτέλεσμα βιοχημικών ή/και μεταβολικών δραστηριοτήτων ενός κλάσματος της

μικροχλωρίδας των θαλασσινών, των λεγόμενων ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (EAM) (Specific Spoilage Organisms, SSOs), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κατά την αποθήκευση, καθιστώντας το προϊόν ακατάλληλο για κατανάλωση (Anagnostopoulos et al., 2022).

Η χαμηλή περιεκτικότητα της σάρκας σε υδατάνθρακες ωθεί άμεσα τους μικροοργανισμούς να χρησιμοποιήσουν αζωτούχα υλικά προς δημιουργία ATP, παράγοντας γρηγορότερα ακατάλληλες μυρωδιές και γεύσεις (Martin et al., 2008). Η υψηλή περιεκτικότητα σε μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους Μη πρωτεϊνικό άζωτο (NPN) και η χαμηλή οξύτητα (pH = 6) της σάρκας των ψαριών ευνοούν την ανάπτυξη βακτηρίων που προκαλούν αλλοίωση (Boziaris & Parlapani, 2017). Το μη πρωτεϊνικό άζωτο (NPN) που βρίσκεται στην σάρκα των ιχθύων είναι υδατοδιαλυτό και περιέχει ενώσεις όπως ελεύθερα αμινοξέα, νουκλεοτίδια και οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) και είναι ένα άμεσα διαθέσιμο υπόστρωμα βακτηριακής ανάπτυξης (Gram & Huss, 1996).

Η αλλοίωση φυσικής προέλευσης μπορεί να προκύψει και από την εισβολή εντόμων, τη μόλυνση με παράσιτα, την παρουσία σκουληκιών και την εισαγωγή ξένων σωμάτων.

Ενδεικτική χημική δραστηριότητα είναι η οξείδωση / τάγγιση των λιπαρών οξέων. Η υψηλή συγκέντρωση των ωφέλιμων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην σάρκα των ιχθυρών τα κάνει πιο επιρρεπή στην ταχύτερη οξείδωση μόλις έρθουν σε επαφή με το οξυγόνο του ατμοσφαιρικού αέρα (Martin et al., 2008).

1.2.1 Μικροβιακή αλλοίωση

Μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων ορίζεται σαν το κάθε σύμπτωμα ή ομάδα συμπτωμάτων που εκδηλώνονται με αλλαγές στην οσμή, στο άρωμα ή γενικά στην εμφάνιση του τροφίμου λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Gill, 1986). Οι τύποι οργανοληπτικών αλλοιώσεων ποικίλουν (δυσάρεστες οσμές και γεύσεις, παρουσία γλίτσας, ορατές αποικίες, παραγωγή αερίου, αποχρωματισμός/αλλαγή χρώματος) και υποδεικνύουν την εκδήλωση μικροβιακής δραστηριότητας (Gram & Huss, 1996).

Οι ωμές τροφές είναι αρχικά επιμολυσμένες με ποικιλία μικροοργανισμών, αλλά λίγοι από αυτούς μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε μεγάλους αριθμούς στο τρόφιμο (Gram & Huss, 1996). Ίδια τρόφιμα τα οποία προέρχονται από διαφορετική γεωγραφική περιοχή μπορεί να έχουν διαφορετική μικροβιακή αλλοίωση (Gram & Huss, 1996) ή/και διαφορετική ταχύτητα αλλοίωσης. Για παράδειγμα ιχθύες που διαβιούν σε κρύα νερά έχουν μεγαλύτερους πληθυσμούς ψυχοτρόφων ΕΑΜ έτσι και η συντήρησή τους υπό ψύξη θα έχει μικρότερη διάρκεια (Martin et al., 2008). Η γηγενής μικροχλωρίδα των υδρόβιων προϊόντων αποτελείται κυρίως από βακτήρια που μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση ενώ μερικά μπορεί να είναι και ανθρώπινα παθογόνα. Γηγενής μικροχλωρίδα επίσης αναφέρεται στους φυσικούς βακτηριακούς πληθυσμούς που μπορούν να βρεθούν στο δέρμα, τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα και σχετίζονται με τα νερά στα οποία ζουν τα ψάρια (Boziaris & Parlapani, 2017)

Γενικότερα λοιπόν η αλλοίωση θαλασσινών εξαρτάται από:

- Την ειδική και μη ειδική μόλυνση του ζώντος ζώου από το περιβάλλον,

- Τις συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών λόγω συγκεκριμένων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων όπως $T^{\circ}C$, a_w , pH, Eh, μικροβιακές αλληλεπιδράσεις κ.λπ.,
 - Το ευρύ φάσμα γεωγραφικής προέλευσης,
 - Τις τεχνικές μεταποίησης και συντήρησης,
 - Υψηλό pH (>6.0) της μεταθανάτιας σάρκας,
 - Ποσοστό μη πρωτεϊνικού αζώτου (NPN),
 - Παρουσία οξειδίου τριμεθυλαμίνης (TMAO)
- (Gram & Huss, 1996).

1.3 Βασικές ομάδες αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στους ιχθύες

Τα κατά Gram – αρνητικά βακτήρια, συνήθως ψυχότροφα, κυριαρχούν ιδιαίτερα στα ψάρια από κρύα (Βόρειος Ατλαντικός, Βόρεια Θάλασσα) ή και πιο ζεστά εύκρατα νερά (Μεσόγειος Θάλασσα). Υψηλότερες ποσότητες θετικών κατά Gram βακτηρίων μπορούν να βρεθούν σε ψάρια από τροπικά νερά (Gram & Huss, 1996). Βασικότερες ομάδες κατά Gram-αρνητικά βακτήρια είναι τα *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*. Κατά Gram-θετικά τα *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Vagococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* και Οξυγαλακτικά (Gram & Huss, 1996). Μπορούν επίσης να βρεθούν εντεροβακτηρίδια όχι σαν γηγενής πληθυσμός αλλά από ανθρώπινη επιμόλυνση (Boziaris & Parlapani, 2017; Gram & Huss, 1996) . Πιο συγκεκριμένα για την Μεσόγειο κυρίως οι *Pseudomonas* spp. και έπειτα το *Shewanella putrefaciens* έχει βρεθεί ότι είναι οι κύριοι ΕΑΜ ψαριών και οστρακοειδών, που αποθηκεύονται αερόβια σε χαμηλές θερμοκρασίες (Boziaris & Parlapani, 2017; Iacumin et al., 2022).

1.3.1 *Pseudomonas* spp.

Το γένος *Pseudomonas* περιέχει περισσότερα από 140 είδη, τα περισσότερα από τα οποία είναι σαπροφυτικά. Είναι προαιρετικά αερόβια βακτήρια και μπορούν να αναπτυχθούν σε εύρος θερμοκρασίας 4 – 42°C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης πάνω από 20°C (Chakravarty & Anderson, 2015). Περισσότερα από 25 είδη συνδέονται με τον άνθρωπο. Οι περισσότερες ψευδομονάδες που είναι γνωστό ότι προκαλούν νόσο στους ανθρώπους σχετίζονται με ευκαιριακές λοιμώξεις (Baron, 1996; Madigan et al., 2015). Κατά την αποθήκευση, η αλλοίωση από ψευδομονάδες συνδέεται συχνότερα με εμφάνιση λιπαρών στοιχείων από την κατανάλωση NPN (Non Protein Nitrogen). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα αρχικά την μεταβολή μυρωδιάς και γεύσης και την τάγγιση και σε επόμενο στάδιο την εμφάνιση γλίτσας (Dainty, 1996).

1.3.2 *Shewanella* spp.

Το γένος *Shewanella* αποτελείται από μη αφομοιωτικούς σιδηροαναγωγικούς και θειοαναγωγικούς μικροοργανισμούς. Είναι προαιρετικά αερόβια βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται αερόβια όταν υπάρχει παρουσία O₂. Η ενζυμική σιδηροαναγωγή είναι αποτέλεσμα αναγωγής θείου και θεικών από τα οποία λαμβάνει και την ενέργεια (Madigan et al., 2015). Η *Shewanella putrefaciens* παράγει μεγάλες ποσότητες H₂S και τριμεθυλαμίνης (TMA) όταν αναπτύσσεται σε ψάρια σε αντίθεση με τα *Pseudomonas* που δεν χρησιμοποιούν TMAO. Τα βακτήρια αναπτύσσονται καλά σε χαμηλές θερμοκρασίες (0-5° C) (Gram & Melchiorson, 1996).

1.3.3 Enterobacteriaceae

Τα εντεροβακτηρίδια είναι μια μεγάλη οικογένεια βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων πολλών από τα πιο γνωστά παθογόνα, όπως *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, κ.α.. Είναι αρνητικά κατά Gram και προαιρετικώς αερόβια (Madigan et al., 2015). Θεωρούνται δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης στα τρόφιμα. Αναπτύσσονται στα τρόφιμα όταν οι συνθήκες είναι ενοϊκές, δηλαδή το επιθυμητό εύρος θερμοκρασίας είναι 3 – 50° C και το εύρος του pH από 4,4 – 9,0 (Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009). Δεν έχουν ανάγκη τις υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών στο υπόστρωμα και η παρουσία τους είναι ανεπιθύμητη στα τρόφιμα σε μεγάλες συγκεντρώσεις (1 – 100/g) (Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2009).

1.3.4 Lactobacillales

Η τάξη των Lactobacillales απαρτίζεται από κατά Gram – θετικά βακτήρια τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ κατά τον μεταβολισμό τους, γι' αυτό έχουν και την ονομασία Οξυγαλακτικά βακτήρια. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί αλλά έχουν μεγάλη αντοχή στο O₂ και αναπτύσσονται και σε τέτοια περιβάλλοντα (αερανεκτικά αναερόβια) (Madigan et al., 2015). Δεν είναι όλοι οι γαλακτοβάκιλλοι σε θέση να ευδοκιμήσουν σε χαμηλό pH και μέτρια προς υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι (Angelis & Gobbetti, 2011).

1.4 Εμπορικός χρόνος ζωής (shelf life) και όρια ασφαλή προς κατανάλωση

Ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσουν οι ΕΑΜ στο ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, που συμπίπτει με τη συγκέντρωση των μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν οργανοληπτική απόρριψη, καθορίζει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων (shelf life) (Boziaris & Parlapani, 2017). Οι μικροβιολογικές μετρήσεις είναι ένα αρκετά αξιόπιστο εργαλείο για τον υπολογισμό των πληθυσμών και την προσέγγιση της ημερομηνίας λήξης του

τρόφιμοι. Ωμά θαλασσινά έχουν τιμές απόρριψης στα 6 – 9 log cfu/g (Gram & Dalgaard, 2002; Parlapani, 2020).

Δυσάρεστες σάπιες οσμές προκαλούνται από τον μεταβολισμό της κυστεΐνης προς παραγωγή υδρόθειου (H₂S) από το *S. putrefaciens* και κάποια *Vibrionaceae*. Επίσης και από την παραγωγή μεθυλμερκαπτάνης (CH₃SH) και διμεθυλοσουλφιδίου (CH₃)₂S από τον μεταβολισμό της μεθειονίνη που χρησιμοποιεί το *S. putrefaciens*. Τα *Pseudomonas* spp. παράγουν, εκτός από τα σουλφίδια, έναν αριθμό πτητικών αλδεϋδων, κετόνων και αιθυλεστέρων. Η παραγωγή αιθυλεστέρων μπορεί να είναι υπεύθυνη για γλυκές, φρουτώδεις μυρωδιές και είναι τυπικά προϊόντα της διάσπασης των αμινοξέων. Επιπλέον αν και δεν είναι υδροθειοπαραγωγικά απελευθερώνουν και μερικές από τις άλλες πτητικές ενώσεις θείου. Ορισμένα Οξυγαλακτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για παραγωγή υδρόθειου (Messina et al., 2021). Τέλος αρκετά εντεροβακτηρίδια χρησιμοποιούν οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) προς παραγωγή τριμεθυλαμίνης (TMA), που είναι υπεύθυνη για την χαρακτηριστική μυρωδιά της “ψαρίλας” (Leisner & Gram, 2014).

1.4.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τα τροφιμογενή παθογόνα (ιοί, βακτήρια, μύκητες, παράσιτα) είναι βιολογικοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν τροφιμογενείς ασθένειες. Η τροφιμογενής ασθένεια εμφανίζεται όταν ένα παθογόνο καταπίνεται με τροφή και εγκαθίσταται (και συνήθως πολλαπλασιάζεται) στον ανθρώπινο ξενιστή ή όταν ένα παθογόνο εγκαθίσταται σε ένα τρόφιμο και παράγει μια τοξίνη, η οποία στη συνέχεια προσλαμβάνεται από τον ανθρώπινο ξενιστή (Bintsis, 2017). Επιπλέον, ορισμένα βακτήρια και μύκητες μπορούν να παράγουν τοξίνες και σε τέτοιες περιπτώσεις η ταυτοποίηση του ίδιου του παθογόνου δεν αποτελεί επαρκές προληπτικό μέτρο για την ασφάλεια των τροφίμων (Martinović et al.,

2016). Έτσι, οι τροφιμογενείς ασθένειες ταξινομούνται γενικά σε: 1. τροφιμογενή λοίμωξη
2. τροφιμογενή δηλητηρίαση.

Στις τροφιμογενείς λοιμώξεις, δεδομένου ότι συνήθως εμπλέκεται περίοδος επώασης, ο χρόνος από την κατάποση έως την εμφάνιση των συμπτωμάτων είναι πολύ μεγαλύτερος από εκείνον των τροφιμογενών δηλητηριάσεων (Bintsis, 2017). Τα πέντε πιο σχετικά βακτηριακά γένη και είδη που συνδέονται με υδάτινα περιβάλλοντα και τα αλιεύματα είναι τα *Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* spp., *Salmonella* sp., και *Clostridium botulinum* (Novoslavskij et al., 2016).

Αξίζει να αναφερθεί το *Clostridium botulinum* παράγει τις νευροτοξίνες της αλλαντίασης, το πιο θανατηφόρο δηλητήριο με θανατηφόρα δόση τα 0,4ng/kg σωματικού βάρους και είναι γνωστό με τους τύπους A – G (Bintsis, 2017; Matthews et al., 2021). Οι τύποι A, B, E και F προκαλούν αλλαντίαση στον άνθρωπο, οι τύποι C και D προκαλούν αλλαντίαση σε πτηνά και θηλαστικά και ο τύπος G ο οποίος δεν έχει ακόμη εμπλακεί σε περίπτωση αλλαντίασης (Barash & Arnon, 2014; Novoslavskij et al., 2016).

Το *C. Botulinum* είναι υποχρεωτικά αναερόβιο βακτήριο. Οι τύποι A, B, F έχουν ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 10° C, ελάχιστο pH 4,6 και ελάχιστη τιμή a_w 0,94. Αντίστοιχα ο τύπος E έχει τους 3° C, pH ~ 5, a_w min = 0,97 (Matthews et al., 2021). Ιδανική συντήρηση για την αποφυγή πολλαπλασιασμού του οργανισμού είναι ο συνδυασμός εμποδίων. Κατά την συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η παρουσία οξυγόνου είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση του *C. Botulinum*.

1.5 Θεωρία εμποδίων και εφαρμογές

Το φαινόμενο των εμποδίων είναι μια απεικόνιση του φαινομένου ότι στα περισσότερα τρόφιμα διάφοροι παράγοντες (εμπόδια) συμβάλλουν στη σταθερότητα και την ασφάλειά τους. Τα εμπόδια έχουν θεμελιώδη σημασία για τη συντήρηση των τροφίμων. Σε ένα σταθερό προϊόν, ελέγχουν την μικροβιακή αλλοίωση, την πιθανή τροφική δηλητηρίαση του καταναλωτή καθώς και την επιθυμητή ζύμωση (Leistner, 2000). Το περιβάλλον του τροφίμου αποτελείται από την αλληλεπίδραση ενδογενών (pH, a_w , κλπ) και εξωγενών παραγόντων (θερμοκρασία, παρουσία μικροβίων κλπ) (Matthews *et al.*, 2021).

Όταν ο Leistner παρουσίασε την θεωρία, στο πρώτο αναφερόμενο θεωρητικό παράδειγμα απεικόνισε 6 εμπόδια (F- υψηλή θερμοκρασία, t-θερμοκρασίες ψύξης, a_w - ενεργότητα νερού, pH-οξύτητα, Eh-δυναμικό οξειδοαναγωγής και συντηρητικά) όπου εάν οι παρόντες μικροοργανισμοί δεν μπορούν να ξεπεράσουν αυτά τα εμπόδια, το τρόφιμο είναι μικροβιολογικά σταθερό και ασφαλές προς κατανάλωση. Στα 7 παραδείγματα που παρουσιάστηκαν στην έρευνα του έλαβε υπόψιν τις εντάσεις των εμποδίων (1^ο, 2^ο), στην συσκευασία των τροφίμων (3^ο), τους ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς λόγω κακής υγιεινής (4^ο), τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου (5^ο), τη συμπεριφορά των παθογόνων οργανισμών στο τρόφιμο (6^ο) και την ακολουθία των εμποδίων (7^ο). Επίσης παρουσιάζεται στο 8^ο παράδειγμα, ένα σημαντικό φαινόμενο το οποίο έχει σημασία για την συντήρηση τροφών που είναι ο συνδυασμός μεθόδων, διότι διαφορετικά εμπόδια στο τρόφιμο μπορούν να προσφέρουν σταθερότητα και ασφάλεια με μεγαλύτερη χρονική διάρκεια ζωής (Leistner, 1992).

Ο βασικός ρόλος της συσκευασίας είναι να απομονώνει τα προϊόντα από το εξωτερικό περιβάλλον και να διασφαλίζει την προστασία των τροφίμων από τη δράση

μηχανικών δυνάμεων, οσμών, σκόνης, αερίων, υγρασίας και μικροοργανισμών, καθώς και την προστασία από την ακτινοβολία/φως και τα έντομα. Η αποτελεσματική συσκευασία θα πρέπει να παίζει το ρόλο του εμποδίου για τη μείωση επιμόλυνσης των κοντινών τροφίμων. Ταυτόχρονα, η συσκευασία πρέπει να είναι αδιαπέραστη, μη τοξική και αδρανής στους μικροοργανισμούς (Al-tayyar et al., 2019).

1.5.1 Συσκευασία σε κενό αέρος (Vaccum)

Η συσκευασία σε κενό αντιπροσωπεύει μια στατική μορφή υποβαρικής αποθήκευσης (αποθήκευση χαμηλής πίεσης) που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της αποτελεσματικότητάς της στη μείωση των οξειδωτικών αντιδράσεων στο προϊόν με σχετικά χαμηλότερο κόστος. Στη συσκευασία κενού, το προϊόν περιέχεται σε συσκευασία κατασκευασμένη από υλικό με χαμηλή διαπερατότητα οξυγόνου και σφραγίζεται αεροστεγώς μετά την εκκένωση του αέρα. Η χρήση συσκευασίας κενού σε αδιαπέραστο και θερμοσταθερό υλικό έχει πολλά πλεονεκτήματα:

- Χωρίς ή χαμηλό κίνδυνο μόλυνσης μετά την παστερίωση.
- Ευκολία χειρισμού.
- Αναστολή ανάπτυξης αερόβιων αλλοιωτικών οργανισμών.
- Αναστολή ή επιβράδυνση της επιβλαβούς οξειδωτικής αντίδρασης στα τρόφιμα

(Kumar & Ganguly, 2014)

1.5.2 Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP)

Σε σύγκριση με την κανονική ατμόσφαιρα, η MAP μπορεί να προσφέρει ένα περιβάλλον με χαμηλά επίπεδα O₂ και υψηλά επίπεδα CO₂, τα οποία μπορούν να αναστείλουν τις αντιδράσεις οξείδωσης, τη μικροβιακή αλλοίωση, και έτσι να συνεισφέρουν στη

διατήρηση καλύτερης οργανοληπτικής ποιότητας (Qu et al., 2022). Η χρήση αερίων στην MAP όχι μόνο έχει επίδραση στην επιλογή της EAM, αλλά επηρεάζει επίσης τον μηχανισμό αντίδρασης αλλοίωσης και έχει επιβεβαιωθεί ότι επεκτείνει την ζωή του τρόφιμου (Cu et al., 2009; Milijasevic et al., 2019). Οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες δρουν σημαντικά στην φυσιολογική ανάπτυξη αερόβιων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Σε αναερόβιους οργανισμούς όπως τα *Clostridium* και *Enterobacteriaceae*, η τεχνική αυτή συντήρησης δεν είναι σημαντικά αποτελεσματική.

Η μικροβιακή αδρανοποίηση από το CO₂ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε νερό, εξαρτάται από τον τύπο του μικροοργανισμού, τη φάση ανάπτυξης και το μέσο εναιώρησης, το τελευταίο από τα οποία μπορεί να αναστείλει τη βακτηριοκτόνο δράση του CO₂. Το CO₂ όταν έρχεται σε επαφή με το νερό αντιδρά αμφίδρομα προς παραγωγή ανθρακικού οξέος (H₂CO₃) έπειτα διττανθρακικών (HCO₃⁻) και ιόν υδρογόνου (H⁺) και τέλος σε ανθρακικό άλας (CO₃²⁻) και 2 ιόντα υδρογόνου (2H⁺). Το διαλυμένο CO₂ δρα μειώνοντας το pH του μέσου και η οξύτητα που προκύπτει οδηγεί σε διαταραχή ορισμένων βιολογικών συστημάτων εντός των κυττάρων (Debs-Louka et al., 1999).

Τα υψηλότερα επίπεδα O₂ μπορούν να καταστείλουν την αύξηση των υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών, ταυτόχρονα όμως εάν τα ποσοστά του είναι αρκετά υψηλά θα ενισχυθούν οι οξειδωτικές διεργασίες (Qu et al., 2022). Το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης CO₂ που αντιδρά με τα προϊόντα μπορεί να κάνει το τρόφιμο πιο όξινο αλλά ο κύριος ρόλος του είναι να περιορίσει την οξείδωση και να σταματήσει την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων και μούχλας (Czerwiński et al., 2021). Το N₂ χρησιμοποιείται κυρίως ως αέριο ισορροπίας ή ανάπαυσης, δηλαδή βοηθάει στην ανάμειξη των CO₂ και O₂,

υποκαθιστώντας τον αέριο χώρο της συσκευασίας που θα αναμειχθούν τα 2 άλλα αέρια. Η διασπορά του αζώτου είναι αρκετά αργή και το υποτιθέμενο επίπεδο αζώτου παραμένει περισσότερο στη συσκευασία (Czerwiński et al., 2021).

1.5.3 Συντήρηση υπό ψύξη

Τα υπό ψύξη προϊόντα είναι αυτά που αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες 0-5° C. Η ψύξη μπορεί να αλλάξει τον τύπο αλλοίωσης καθώς και τον ρυθμό της (Martin et al., 2008). Ενδεικτικά, ο πολλαπλασιασμός των μεσόφιλων μικροοργανισμών παρεμποδίζεται γεγονός που οδηγεί τα ψυχοτρόφα βακτήρια να κυριαρχούν, που και αυτά πολλαπλασιάζονται με μειωμένο ρυθμό. Τα μεσόφιλα που επιβιώνουν από την ψύξη, αν και σε τραυματισμένη κατάσταση, μπορούν να παραμείνουν στο φαγητό για παρατεταμένες περιόδους και μπορεί να ανακάμψουν και να συνεχίσουν την ανάπτυξη εάν η κατάσταση γίνει αργότερα ευνοϊκή (Martin et al., 2008). Δεδομένου ότι η ψύξη δεν είναι βακτηριοκτόνος διαδικασία, η χρήση πρώτων υλών καλής μικροβιολογικής ποιότητας και ο υγιεινός χειρισμός αποτελούν βασικές απαιτήσεις για την παραγωγή ασφαλών διατηρημένων με απλή ψύξη τροφίμων. Συνιστάται ο συνδυασμός μεθόδων για την επιμήκυνση ζωής των τροφίμων αυτών.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται ανάπτυξη είναι:

- Ύπαρξη θρεπτικών συστατικών. Για παράδειγμα το *Vibrio* AF-I εμφανίζει έντονες διαφορές στην απόκριση ανάπτυξης όταν καλλιεργείται σε καλλιέργεια κατά παρτίδα, με διαφορετική πηγή άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκαν 9 πηγές άνθρακα και

στους 0° C δείχνει ότι εμφανίστηκαν οι μέγιστοι ρυθμοί πρόσληψης και ότι προσλήφθηκαν περίπου διπλάσια μόρια γλυκόζης (Herbert & Bell, 1977).

- Ενεργότητα νερού (a_w). Σε αρκετές περιπτώσεις, το a_w είναι η κύρια παράμετρος που είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα των τροφίμων, τη ρύθμιση της μικροβιακής απόκρισης και τον προσδιορισμό του τύπου των μικροοργανισμών που συναντώνται στα τρόφιμα (Πιν. 2). Για παράδειγμα, ο *S. aureus* (ένας εξαιρετικά ανεκτικός οργανισμός στο NaCl), με αναφερόμενο ελάχιστο a_w για ανάπτυξη τόσο χαμηλό όπως 0,85-0,86 (αερόβια) και 0,90-0,91 (αναερόβια), έχει αποδείξει ότι τα στελέχη που παράγουν Εντεροτοξίνη Α μπορούν να παράγουν την τοξίνη σε πιο δυσμενείς συνθήκες (0,87 a_w) από τα στελέχη που παράγουν Εντεροτοξίνη Β (0,97 a_w) (Tapia et al., 2008).
- pH.
- Η κατάσταση των κυττάρων του μικροοργανισμού

Πίνακας 1.1. Ελάχιστη τιμή a_w για την ανάπτυξη των εκάστοτε μικροοργανισμών

Range of a_w	Microorganisms Inhibited by Lowest a_w in this Range
1.00–0.95	<i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. botulinum</i> E, G, some yeasts
0.95–0.91	<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> A, B, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i>
0.91–0.87	<i>Staphylococcus aureus</i> (aerobic), many yeasts (<i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Hansenula</i>), <i>Micrococcus</i>
0.87–0.80	Most molds (mycotoxigenic penicillia), <i>Staphylococcus aureus</i> , most <i>Saccharomyces</i> (<i>bailii</i>) spp., <i>Debaryomyces</i>
0.80–0.75	Most halophilic bacteria, mycotoxigenic aspergilli
0.75–0.65	Xerophilic molds (<i>Aspergillus chevalieri</i> , <i>A. candidus</i> , <i>Wallemia sebi</i>), <i>Saccharomyces bisporus</i>
0.65–0.61	Osmophilic yeasts (<i>Sacharomyces rouxii</i>), a few molds (<i>Aspergillus echinulatus</i> , <i>Monascus bisporus</i>)
< 0.61	No microbial proliferation

Source: adapted from Beuchat (2002).

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός του εμπορικού χρόνου ζωής, ελαφρά αλατισμένων φιλέτων λαβρακιού σε διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας υπό ψύξη καθώς και η παρατήρηση της αύξησης των μικροβιακών πληθυσμών και η αλλαγή φυσικοχημικών παραμέτρων για το χρονικό αυτό διάστημα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία φιλέτων.

Η προετοιμασία του πειράματος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Βόλος).

Φιλέτα από ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), βάρους περίπου 200 g, παρελήφθησαν από γνωστή ελληνική εταιρεία υδατοκαλλιέργειας σε κιβώτια διογκωμένου πολυστυρενίου με πάγο και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος).

Απεντερωμένα φιλέτα *D. labrax* εμβαπτίσθηκαν σε άλμη 6% w/w και κατόπιν παρέμειναν σε ψυκτικό θάλαμο στους 4° C για 3 h. Με το πέρας των 3 ωρών τα φιλέτα στράγγιξαν σε σχάρες από την περίσσεια άλμης για 20 min. Ελήφθησαν φιλέτα για μετρήσεις a_w , αλατιού και υγρασίας εκτός των μικροβιολογικών αναλύσεων. Τα υπόλοιπα φιλέτα χωρίστηκαν ίσα και συσκευάστηκαν με 3 διαφορετικούς τρόπους και δόθηκαν οι κάτωθι κωδικές ονομασίες:

- Ομάδα Air (καλύφθηκε εκατέρωθεν από πλαστικό φιλμ αφήνοντας τις πλευρές ανοιχτές)
- Ομάδα Vacuum (συσκευάστηκε σε πλαστικό φιλμ σε κενό αέρος)
- Ομάδα Map (συσκευάστηκε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 50% CO₂, 10% O₂, 40% N₂).

2.2 Συσκευασία σε κενό αέρος (vacuum)

Τα φιλέτα τοποθετήθηκαν σε τροφосακούλες κενού αέρος και κωδικοποιήθηκαν αντίστοιχα με την ομάδα που ανήκαν (VAC). Συσκευάστηκαν με το μηχάνημα Alex Pac (© ARIS 44A Table – Type Vaccum Packaging Machine) και παρατηρούνταν προσεκτικά για τυχόν σκισίματα της συσκευασίας και για την αποτελεσματικότητα του vacuum. Τέλος τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4° C.

2.3 Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP)

Τα ψάρια συσκευάζονταν σε τροφосακούλες πολυαιθυλενίου, διοχετεύοντας μέσα σ' αυτές τα αέρια προς δημιουργία της επιθυμητής ατμόσφαιρας με το συσκευαστικό μηχάνημα Alex Pac (© ARIS 44A Table – Type Vaccum Packaging Machine).

2.4 Ετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων

Για το πείραμα γίνεται η χρήση 5 θρεπτικών υποστρωμάτων πάρθηκαν όλα από την εταιρία Neogen Culture Media, Heywood, UK.

A) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Το TSA (Tryptone soy Agar LAB011) είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια κυρίως αερόβιων ή/και προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων.

B) Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.

Το CFC (LAB108) παρέχει όλα εκείνα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού κάνει το θρεπτικό επιλεκτικό για *Pseudomonas* spp.

Γ) Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae

Το Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, LAB088) είναι το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για τον προσδιορισμό των Enterobacteriaceae. Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα.

Δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Το θρεπτικό υπόστρωμα de Man - Rogosa - Sharpe agar (MRS, LAB093) προσδιορίζει τα Οξυγαλακτικά βακτήρια.

Ε) Θειοαναγωγικά βακτήρια (H₂S) (και του *Shewanella putrefaciens*)

Το Iron Agar κατά Lyngby (IA, LAB53) χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H₂S).

2.5 Διαδικασία εργαστηριακού μικροβιακού ελέγχου

Η δειγματοληψία γινόταν εις διπλούν (2 φιλέτα) με 2 επαναλήψεις για το κάθε φιλέτο. Τηρώντας ασηπτικές συνθήκες και με την χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας γινόταν λήψη 25 g σάρκας και επιδερμίδας τοποθετούνταν σε σακούλα Stomacher συμπληρώνονταν με 225ml αποστειρωμένης σαλίνης (0.85% NaCl w/v) και τοποθετούνταν στον ομογενοποιητή (easyMIX® Lab Blender (AES-Chemunex)) για 4 min.

Για τις αραιώσεις με τη χρήση πιπέτας λαμβάνεται 1 ml από το ομογενοποιημένο δείγμα που θεωρείται ως αραιώση 10^{-1} και προστίθεται στον δοκιμαστικό σωλήνα με 9 ml σαλίνης. Στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1 ml από τον δοκιμαστικό σωλήνα στον επόμενο, έως ότου φτάσει την επιθυμητή αραιώση.

Με πιπέτα γίνεται η λήψη από την αραιώση του δείγματος που υποδεικνύουν τα εκάστοτε τρυβλία (1 ml για ενσωμάτωση, 0,1 ml για επίστρωση). Τέλος όλα τα τρυβλία φυλάσσονται ανάποδα στους αντίστοιχους επωαστικούς θαλάμους.

Τα τρυβλία της ενσωμάτωσης (VRBGA, IA, MRS) κινούνται σε ευκρινές οχτάρι για την ανάμιξη του τηγμένου θρεπτικού υλικού και του βακτηριακού εναιωρήματος γνωστού όγκου (1 ml). Όταν το θρεπτικό υλικό πήξει τοποθετείται άλλο ένα λεπτό στρώμα θρεπτικού για να σφραγίσουν. Η τεχνική της επίστρωσης περιλαμβάνει την επάλειψη ενός γνωστού όγκου (0,1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε ένα στερεό μέσο με την βοήθεια εξαπλωτή με κυκλικές κινήσεις για τα θρεπτικά CFC, TSA.

2.6 Επώαση και καταμέτρηση αποικιών

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν:

A) σε TSA, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 24 - 48 h

B) σε Iron Agar κατά Lyngby, με καταμέτρηση των μαύρων αποικιών μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 24 - 48h

Γ) σε VRBGA, με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο μετά από επώαση στους 37 °C για 18 - 24 h

Δ) σε MRS Agar, με καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους 25 °C για 48-72 h

E) σε CFC, με καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους 25 °C για 48 h

Με το πέρας των ωρών επώασης τα τρυβλία απομακρύνονται από τον επωαστικό κλίβανο και από κάθε θρεπτικό υλικό και φιλέτο επιλέγεται το τρυβλίο με την αραίωση που είχε 10- 300 αποικίες για να καταμετρηθούν.

2.7 Λογαριθμικός υπολογισμός αποικιών

Για την μετατροπή των αποικιών που καταμετρώταν στα τρυβλία σε μονάδα σχηματισμού αποικιών ανά γραμμάριο (log cfu/g. colony-forming unit per gram) λήφθηκε υπόψιν η τεχνική της επίστρωσης ή της ενσωμάτωσης. Οι αποικίες των θρεπτικών TSA και CFC (επίστρωσης) πολλαπλασιαζόταν ως εξής: $\text{αποικίες} * 10^{\text{αραίωση του τρυβλίου}} * 10$. Αντίστοιχα οι αποικίες στα θρεπτικά της ενσωμάτωσης (VRBGA, IA, MRS): $\text{αποικίες} * 10^{\text{αραίωση του τρυβλίου}}$.

2.8 Μέτρηση ενεργότητας ύδατος (aw)

Η μέτρηση της ενεργότητας νερού (water activity) ή της σχετικής υγρασίας σε ισορροπία (ERH - equilibrium relative humidity) αποτελεί βασική παράμετρο στον ποιοτικό έλεγχο των ευαίσθητων στην υγρασία προϊόντων ή υλικών. Χρησιμοποιήθηκε το φορητό σετ ενεργότητας ύδατος HygroPalm AW (HP23-AW-A-SET-14) Ελβετικής κατασκευής.

2.9 Μέτρηση υγρασίας

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κάψες πορσελάνης και έπειτα ακολούθησε η ζύγισή τους σε εργαστηριακό ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια, τα

δείγματα με τις κάψες πορσελάνης τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ξήρανσης στους 105° C για 24h. Το ποσοστό (%) υγρασίας προέκυψε από την εκατοστιαία διαφορά μάζας των δειγμάτων πριν και μετά την ξήρανση (105° C για 24h).

2.10 Μέτρηση αλατότητας

Αναλόγως την περιεκτικότητα του προϊόντος σε NaCl, λαμβάνεται κατάλληλο μέγεθος δείγματος (συνήθως 5 g). Θρυμματίζεται το δείγμα των 5 g. Προστίθεται γνωστός όγκο διαλύματος 0,1 M AgNO₃ – περισσότερο από αρκετό – ώστε να καθιζάνουν όλα τα Cl⁻ (30 ml). Προστίθεται 20 ml νιτρικού οξέος, HNO₃. Στη συνέχεια, βράζονται ελαφρά για περίπου 15 λεπτά, έως ότου όλα τα στερεά πλην του AgCl να διαλυθούν. Αφήνεται να κρυώσει και προστίθενται 30 ml απεσταγμένο νερό και 3 ml δείκτη (ferric indicator). Τέλος, ογκομετρώνται προσεκτικά με διάλυμα Θειοκυανικού Αμμωνίου – 0,1 M (NH₄SCN), μέχρι το διάλυμα να χρωματιστεί σταθερά φωτεινό καφέ.

Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα (%) του δείγματος σε NaCl, δίνεται από την σχέση:

$$NaCl \% = \frac{(V1 - V2) \times N \times 58,45}{S \times 1000} \times 100$$

όπου:

V1: τα ml AgNO₃ που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά

V2: τα ml του διαλύματος NH₄SCN που καταναλώθηκαν για την ογκομέτρηση του δείγματος

N, η κανονικότητα του διαλύματος AgNO₃ (=0,1 M)

S, τα g δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά.

Μοριακό βάρος NaCl: 58,45 g/mol

Ο υπολογισμός επί τοις εκατό περιεκτικότητας σε NaCl στην υδατική φάση υπολογίστηκε με την σχέση:

$$NaCl \% = \frac{NaCl\ dry\%}{Humidity\ \%} \times 100$$

2.11 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 4°C, πραγματοποιούνταν δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την οργανοληπτική αξιολόγηση των νωπών αλλά και του μαγειρεμένου προϊόντος, από 5 εξειδικευμένους δοκιμαστές. Αξιολογήθηκαν στα νωπά προϊόντα η εμφάνιση, οσμή και συνεκτικότητα, ενώ στα μαγειρεμένα (προθερμασμένος φούρνος στους 180°C για 20 λεπτά), η οσμή, η γεύση και η συνεκτικότητα. Η κλίμακα ήταν πενταβάθμια αρεσκείας με το πέντε (5) το άριστο και το τρία (3) να είναι το ελάχιστο για αποδοχή.

2.12 Μέτρηση αερίων στην συσκευασία VAC, MAP

Οι συγκεντρώσεις των αερίων CO₂ και O₂ εντός των συσκευασιών μετρούνταν με χρήση του μετρητή Checkpoint 3 O₂ & CO₂ (Ametek/Mocon, Minnesota, USA).

2.13 Στατιστικός έλεγχος

Τα δεδομένα από τις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές διαδικασίες ελήφθησαν εις τριπλούν, επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της Ανάλυσης της Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (one-way ANOVA) και χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Tukey post hoc με το λογισμικό IBM® SPSS® statistics 19 (SPSS Inc., Chicago, USA). Οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές $p \leq 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η πειραματική διαδικασία διήρκησε 12 ημέρες (μέχρι το πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής όλων των προϊόντων) εκ των οποίων έγινε λήψη δείγματος και καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου, a_w , υγρασίας, ποσοστό αλατιού και ποσοστό αλατιού στην υδατική φάση του προϊόντος σε συγκεκριμένες ημέρες για κάθε ομάδα και κάθε παράμετρο. Πίνακας 3.1).

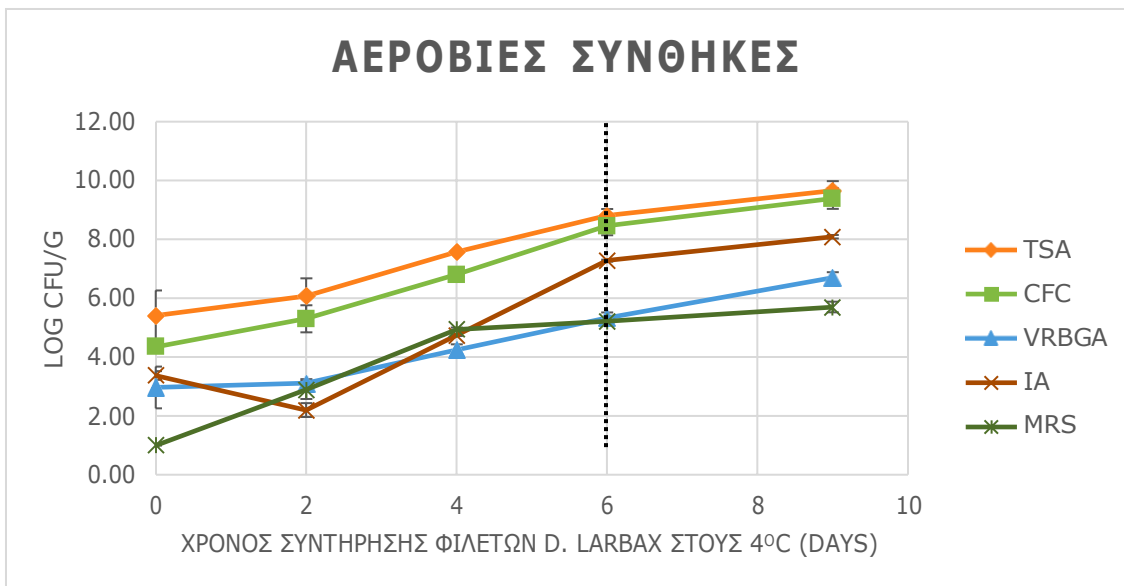
Πίνακας 3.1.: Εμφανίζονται οι ημέρες των μετρήσεων ανάλογα με την ομάδα AIR, VAC, MAP κατά την διάρκεια του πειράματος.

Συσκευασία	Μέρες δειγματοληψίας			
	Log cfu/g	Aw	Humidity %	NaCl %
AIR (αερόβια)	0, 2, 4, 6, 9	4, 6, 9	0, 4, 9	0, 4, 6
VAC (αναερόβια)	0, 4, 9, 12	4, 9, 12	0, 4, 9, 12	0, 4, 12
MAP (τροποποιημένη ατμόσφαιρα)	0, 4, 9, 12	4, 9, 12	0, 4, 9, 12	0, 4, 12

3.1 AIR μικροβιολογικό προφίλ

Σύμφωνα με τον στατιστικό έλεγχο ξεκίνησαν να υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές από την 2^η ημέρα συντήρησης σε σχέση με την ημέρα 0 (D0) όπου και στην 6^η ημέρα (D6) σημειώθηκε το τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Κατά την συντήρηση τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς με μικρή διαφορά στον μέσο όρο με τα υδροθειοπαραγωγικά. Οι πληθυσμοί κυμάνθηκαν την D0 σε 4,35 log cfu/g, την D4 σε 6,80 log cfu/g, την D6 8,81 log cfu/g που ορίστηκε ως εμπορικός χρόνος ζωής και κατά την τελευταία λήψη σε 9,39 log cfu/g.

Επόμενοι ήρθαν οι υδροθειούχοι μικροοργανισμοί με αρχικό πληθυσμό 3,34 log cfu/g, στην D6 με 7,28 log cfu/g και την D9 με 8,09 log cfu/g. Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια αρχικά είχαν πληθυσμό κάτω από το όριο ανίχνευσης των 10 cfu/g, ενώ την D6 είχαν πληθυσμό 5,21 log cfu/g και την τελευταία ημέρα έφτασαν 5,70 log cfu/g. Τα εντεροβακτηρίδια είχαν αρχικό πληθυσμό την D0 3,37 log cfu/g, ενώ στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής έφτασαν τα 4,25 log cfu/g ενώ στην D9 δεν ξεπέρασαν τα 6,70 log cfu/g. Τέλος η OMX κυμάνθηκε από 5,41 log cfu/g και ξεπέρασε τον πληθυσμό των *Pseudomonas* την 9^η ημέρα με 9,66 log cfu/g. (βλέπε Γράφημα 3.1).

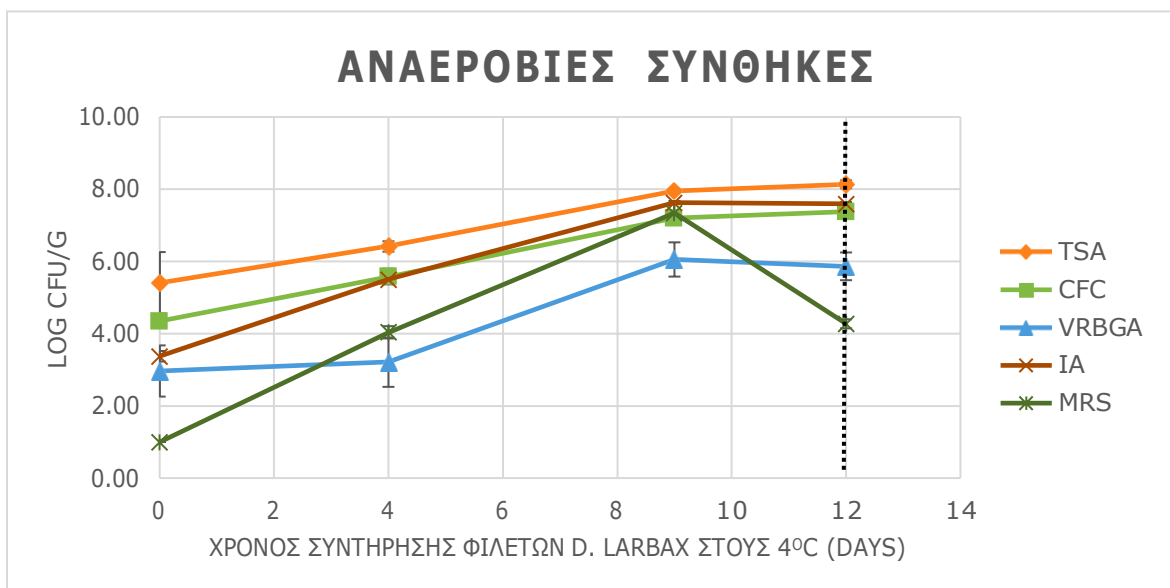


Γράφημα 3.1: Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (TSA), *Pseudomonas spp.* (CFC), εντεροβακτηριδίων (VRBGA), υδροθειούχων βακτηρίων (IA) και των οξυγαλακτικών (MRS) σε φιλέτα *D. larbax* κατά την συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 4° C. Με μαύρη κάθετη γραμμή σημαίνεται ο εμπορικός χρόνος ζωής στις 6 ημέρες.

3.2 VAC μικροβιολογικό προφίλ

Για τα φιλέτα που συσκευάστηκαν σε κενό αέρος η στατιστική ανάλυση φανέρωσε ότι σημαντικές στατιστικές διαφορές υπήρχαν στα φιλέτα μεταξύ ημέρας 0 και ημέρας 4^{ης}.

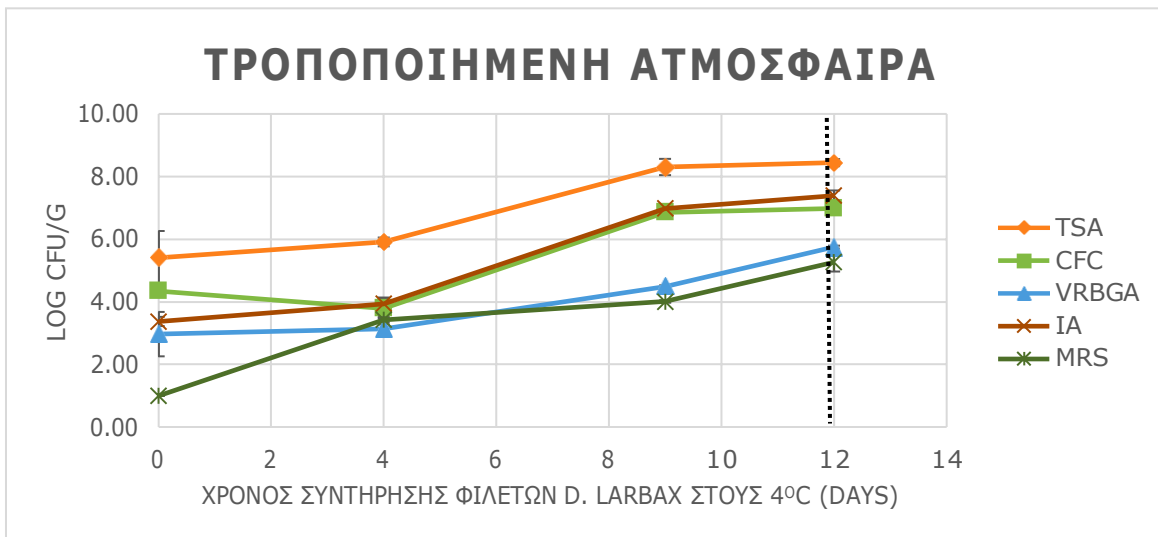
Και εδώ παρατηρούνται οι *Pseudomonas spp.* να είναι υπεύθυνοι αλλοιωτικοί μικροοργανισμοί κατά μέσο όρο ολικού πληθυσμού, με αρχικό πληθυσμό D0 4,35 log cfu/g, την D9 αυξήθηκε σε 7,20 log cfu/g και την D12 στην στατική φάση σε 7,59 log cfu/g. Με παρόμοια διακύμανση του πληθυσμού ακολουθούν τα υδροθειούχα, στην D0 είχαν 3,37 log cfu/g, την D9 ξεπέρασαν τα *Pseudomonas* με 7,63 log cfu/g και κατά την λήξη του πειράματος (D12) 7,59 log cfu/g. Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν κάτω από τα ανιχνεύσιμα επίπεδα την D0, την D9 είναι η κορυφή της εκθετικής τους φάσης με 7,34 log cfu/g και την τελευταία ημέρα έπεσαν στα 4,27 log cfu/g. Τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμό 2,96 και 6,06 log cfu/g τις ημέρες 0 και 9 αντίστοιχα, χωρίς να ξεπεράσουν τους 5,87 log cfu/g στο πέρας της διαδικασίας. Η OMX στην αρχή του πειράματος ήταν στους 5,41 log cfu/g, έφτασε στην τελευταία ημέρα τους 8,13 log cfu/g. Οι μεταβολές παρατηρούνται στο Γράφημα 3.2.



Γράφημα 3.2: Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (TSA), *Pseudomonas spp.* (CFC), εντεροβακτηριδίων (VRBGA), υδροθειούχων βακτηρίων (IA) και των οξυγαλακτικών (MRS) σε φιλετα *D. larbax* κατά την συντήρησή τους υπό αναερόβιες συνθήκες ψύξης στους 4° C. Με μαύρη κάθετη γραμμή σημαίνεται ο εμπορικός χρόνος ζωής στις 12 ημέρες.

3.3 MAP μικροβιολογικό προφίλ

Για τα φιλέτα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η στατιστική ανάλυση φανέρωσε ότι σημαντικές διαφορές υπήρχαν στα φιλέτα μεταξύ ημέρας 0 και ημέρας 4^{ης}. Τα *Pseudomonas spp.* είχαν πτώση την D4 από 4,35 σε 3,79 log cfu/g και στην D12 έφτασαν τα 6,98 log cfu/g. Και εδώ τα υδροθειούχα είχαν κατά μέσο όρο μικρή διαφορά με τα *Pseudomonas spp.* (0,07 log cfu/g) με 3,94 την D4 και 7,39 την τελευταία μέρα (D12). Για τα Οξυγαλακτικά βακτήρια την D4 αριθμούν 3,42 log cfu/g και την τελευταία ημέρα ανέβηκαν στα 5,26 log cfu/g. Τα Enterobacteriaceae στις ημέρες 0 και 4 δεν είχαν σημαντική αύξηση (0,19 log cfu/g διαφορά) και την D12 έφτασαν τα 5,75 log cfu/g. Τέλος η OMX την D4 μέτρησε 5,91 log cfu/g, ξεπέρασε τις μετρήσεις της ομάδας VAC την D9 με 8,30 log cfu/g και το πείραμα έληξε με 8,45 log cfu/g την τελευταία ημέρα. Οι μεταβολές παρατηρούνται στο Γράφημα 3.3.



Γράφημα 3.3: Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (TSA), *Pseudomonas spp.* (CFC), εντεροβακτηριδίων (VRBGA), υδροθειούχων βακτηρίων (IA) και των οξυγαλακτικών (MRS) σε φιλέτα *D. larbax* κατά την συντήρησή τους σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε συνθήκες ψύξης στους 4° C. Με μαύρη κάθετη γραμμή σημαίνεται ο εμπορικός χρόνος ζωής στις 12 ημέρες.

Συμπερασματικά από τα γραφήματα 3.1, 3.2 και 3.3 ότι οι βασικότεροι και κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που συνεισφέρουν στην αλλοίωση του *D. larbax* κατά την διάρκεια του πειράματος και σε όλες τις συνθήκες συσκευασίας υπό ψύξη στους 4° C είναι τα *Pseudomonas* spp. (Γράφημα 3.5) ακολουθούμενα τα υδροθειούχα βακτήρια (Γράφημα 3.6) (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*).

3.4 Φυσικοχημικές παράμετροι

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καταμετρώταν και η ενεργότητα ύδατος (a_w), το ποσοστό της υγρασίας, το ποσοστό του αλατιού στην σάρκα των ιχθύων καθώς και το ποσοστό αλατιού στην υδατική φάση του προϊόντος.

Τα φιλέτα *D. Larbax* που συσκευάστηκαν υπό αερόβιες συνθήκες φαίνεται να έχουν μηδενική διαφορά στην ενεργότητα του ύδατος της σάρκας την D4 έως την D9. Η ομάδα VAC κατέχει τις υψηλότερες τιμές από την αρχή (0,976) έως την λήξη του πειράματος (0,977). Τέλος η συσκευασία MAP έχει τις χαμηλότερες τιμές από 0,970 την D4 με πτώση σε 0,966 την D12. Οι αναφερόμενες τιμές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Οι τιμές της υγρασίας στην σάρκα του φιλέτου υπολογίστηκε κοινά και για τις 3 ομάδες την D0 σε 76,42%. Κατά μέσο όρο των μετρήσεων και καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος η AIR είχε τα υψηλότερα ποσοστά υγρασίας με 80,64%. Επόμενη είναι η VAC με μη σημαντική διαφορά στο 80,23%. Τέλος η ομάδα MAP φαίνεται σε όλες τις ημέρες να έχει τα χαμηλότερα ποσοστά που δεν είναι στατιστικώς σημαντικά, με καθ' ολικό μέσο όρο 78,79%.

Τελευταία παράμετρος που υπολογίστηκε ήταν το ποσοστό NaCl στην σάρκα των ιχθύων. Η μέτρηση την D0 για όλα τα νωπά φιλέτα ήταν κοινή με ποσοστό 2,21%. Η MAP

φαίνεται ανεβαίνει την D4 στο 2,35% και την D12 στο 2,32%. Η αερόβια και η αναερόβια συσκευασία δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό αλατότητας αφού οι διαφορές δεν είναι σημαντικές. Οι μεταβολές για τις ομάδες AIR, VAC, MAP παρουσιάζονται στον Πίνακες 3.2, 3.3, 3.4 αντίστοιχα. Γενικότερα η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας δείχνει να ρίχνει τα ποσοστά στον νοπό ιχθύ με τιμές την D4 2,49% σε 2,03% την D12.

Πίνακας 3.2: Φυσικοχημικές μεταβολές των παραμέτρων ενεργότητας ύδατος (a_w), υγρασίας %, περιεκτικότητα NaCl % σε νοπό και στην υδατική φάση (Αλάτι %) *D. larbax* υπό αερόβιες συνθήκες στους 4° C.

ΗΜΕΡΑ	a_w	Υγρασία %	Αλάτι % νοπό	Αλάτι % υδατική φάση
AIR				
0	0,974	78,58 ± 0,76	2,21 ± 1,04	2,99 ± 0,5
4	0,974	76,60 ± 0,76	2,35 ± 1,69	3,14 ± 0,69
6	0,974	90,96 ± 2		
9	0,974			

Πίνακας 3.3: Φυσικοχημικές μεταβολές των παραμέτρων ενεργότητας ύδατος (a_w), υγρασίας %, περιεκτικότητα NaCl % σε νοπό και στην υδατική φάση (Αλάτι %) *D. larbax* υπό αναερόβιες συνθήκες στους 4° C.

ΗΜΕΡΑ	a_w	Υγρασία %	Αλάτι % νοπό	Αλάτι % υδατική φάση
VAC				
0	0,974	78,58 ± 0,76	2,21 ± 1,04	2,99 ± 0,5
4	0,976	76,23 ± 2,32	2,93 ± 0,39	2,23 ± 0,39
9	0,976	90,37 ± 1,97		
12	0,977	77,89 ± 1,93	3,07 ± 1,01	2,38 ± 0,73

Πίνακας 3.4: Φυσικοχημικές μεταβολές των παραμέτρων ενεργότητας ύδατος (a_w), υγρασίας %, περιεκτικότητα NaCl % σε νωπό και στην υδατική φάση (Αλάτι %) *D. larbax* υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4° C.

ΗΜΕΡΑ	a_w	Υγρασία %	Αλάτι % νωπό	Αλάτι % υδατική φάση
MAP				
0	0,974	78,58 ± 0,76	2,21 ± 1,04	2,99 ± 0,5
4	0,971	74,92 ± 1,66	2,49 ± 0,53	1,86 ± 0,38
9	0,970	87,8 ± 7,76		
12	0,966	76,01 ± 0,19	2,32 ± 0,02	1,54 ± 0,00

3.5 Μέτρηση αερίων

Η συγκέντρωση των αερίων στις συσκευασίες MAP και κενού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4. Σε όλη την διάρκεια της συντήρησης, ακόμη και στην συσκευασία κενού λόγω της υψηλής διαπερατότητάς του φιλμ σε οξυγόνου, υπάρχει οξυγόνο στην συσκευασία. Το CO₂ μειώνεται και αυτό στην συσκευασία MAP από την αρχική τιμή 50.1% στο 4.2 % στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής μετά από 12 ημέρες.

Πίνακας 3.5: Συγκέντρωση αερίων O₂, CO₂ στις συσκευασίες υπό αναερόβιες συνθήκες και υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά την συντήρηση *D. Larbax* στους 4° C.

Ημέρες συντήρησης	MAP		Vacuum	
	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂
0	50.1	9.9	0.0	0.1
4	23.6	12.1	0.4	4.1
9	9.4	15.5	0.3	10.4
12	4.2	18.6	0.2	15.7

3.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Αρχικά η γενική εμφάνιση των φιλέτων ήταν εξαιρετική (Βαθμός 5), με καλή συνεκτικότητα, άριστη οσμή και πολύ καλή γεύση. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά αυτά υποβαθμίστηκαν με το πέρασμα του χρόνου συντήρησης και στο σημείο της ελάχιστης αποδοχής (Βαθμός 3) η εμφάνιση, οι δυσάρεστες οσμές ήταν το πιο προφανές χαρακτηριστικό που παρέπεμπε σε αλλοίωση, ενώ και το μαγειρεμένο προϊόν είχε ανεπιθύμητη γεύση. Τα υπό μελέτη προϊόντα έφτασαν στο ελάχιστο επίπεδο αποδοχής σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο εμπορικός χρόνος ζωής προσδιορίστηκε στις 6 ημέρες για τα φιλέτα αποθηκευμένα σε αέρα και τις 12 μέρες για αυτά σε κενό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.6: Προσδιορισμός του τέλους της διάρκειας ζωής των προϊόντων, σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση πέντε (5) εκπαιδευμένων δοκιμαστών.

Ατμόσφαιρα	Θερμοκρασία (°C)	Shelf-life (days)
AIR	4	6
VACCUM	4	12
MAP	4	12

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κάθε μικροοργανισμός έχει μια ιδανική ωσμωτική πίεση και η ικανότητά τους να αναπαράγονται και να αναπτύσσονται εξαρτάται από τη διατήρηση της ενεργότητας του ύδατος. Όταν ένας μικροοργανισμός συναντά ένα περιβάλλον όπου η ενεργότητα του νερού είναι χαμηλότερη από την εσωτερική δραστηριότητα, βιώνει οσμωτική καταπόνηση και αρχίζει να χάνει νερό στο περιβάλλον, καθώς το νερό μετακινείται για να βρεθεί ισορροπία μεταξύ οργανισμού και περιβάλλοντος (Trans et al., 2004). Σαν εμπόδιο η ενεργότητα νερού στο προϊόν μας δεν κρίνεται αξιόλογη για την επιβράδυνση της μικροβιακής αλλοίωσης. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προϊόντων μετά το αλάτισμα υποδεικνύουν ότι το προϊόν θα ήταν οριακά ασφαλές σε σχέση με το ψυχρότροφο *Clostridium botulinum* τύπου E, για συντήρηση σε συνθήκες ανοξικές (FDA, 2011). Σε όλη την διάρκεια της συντήρησης, ακόμη και στην συσκευασία κενού λόγω της υψηλής διαπερατότητάς του φιλμ σε οξυγόνο, υπάρχει οξυγόνο στην συσκευασία, το οποίο καθιστά το προϊόν ασφαλές από το *Clostridium botulinum* τύπου E.

Η ενεργότητα του ύδατος σχετίζεται και ελέγχεται στα προϊόντα με την χρήση αλατιού (ή και ζάχαρης) (Wiley, 2020), συνδεδεμένη είναι και η υγρασία, η διαθεσιμότητα δηλαδή νερού στο τρόφιμο. Σε απλοϊκή εξήγηση αναφέρεται από τον (Horner, 1997) ότι ο μηχανισμός της αλάτισης δρα διττά. Τα μόρια NaCl που προστίθενται σπάνε σε Na⁺ και Cl⁻, κάθε ένα από αυτά τα ιόντα έλκει και 1 μόριο νερού (H₂O). Με αυτό τον τρόπο το νερό δεν είναι πλέον διαθέσιμο από το περιβάλλον προς χρήση. Ταυτόχρονα τα ιοντισμένα μόρια έχουν την τάση να έλκουν και τα μόρια νερού μέσα από τα μικροβιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την αφυδάτωση των οργανισμών ή των σπορίων. Οι (Yang et al., 2020) παρατήρησαν σε δοκιμασίες αλάτισης με άλμη στον χάνο, ότι το ποσοστό αλατιού στην

σάρκα του ιχθύ αυξανόταν όσο οι μέρες περνούσαν. Η αντίθεσή τους με το παρόν πείραμα είναι ότι μετά την εμφύσηση στην άλμη το ψάρι αφυδατώθηκε φυσικά υπό ήλιο άρα έπεσε και η σχετική υγρασία της σάρκας. Προτείνεται και από τους (Köse, 2010; Onyuka, 2013; Yanar et al., 2006) η περίπου 6% συγκέντρωσης άλμης, είναι αποτελεσματική στον έλεγχο της ποιότητας και στην ενίσχυση της ασφάλειας των προϊόντων.

Ο αριθμός των υδροθειούχων βακτηρίων κατά την απόρριψη αποτελούσε μεγαλύτερο ποσοστό, δηλαδή 70-80% του συνολικού αριθμού σε φιλέτα συσκευασμένα σε κενό σε σύγκριση με 40-50% για ολόκληρα ψάρια κατά τους (Gram et al., 1987). Δεν καταμετρήθηκε κάτι αντίστοιχο καθώς οι τιμές της ημέρες απόρριψης δεν είχαν σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συσκευασιών. Επίσης η απόρριψη των φιλέτων και από (Jorgensen & Huss, 1989) έγινε όταν τα υδροθειούχα έφτασαν περίπου την τιμή 7,5 – 8 log cfu/g όπως και παραπάνω. Οι υδροθειούχοι οργανισμοί ως προαιρετικά αερόβιοι θα ήταν αναμενόμενο στην ομάδα VAC κατά την κορυφή της εκθετικής φάσης να είχαν και την υψηλότερη συγκέντρωση. Όμως η κλίση της εκθετικής φάσης στην ομάδα AIR ήταν πολύ πιο απότομη από τις άλλες 2 ομάδες, που θα μπορούσε να υποδεικνύει ότι τα θρεπτικά υλικά καταναλώθηκαν πιο γρήγορα και πιο αποτελεσματικά. Η αξιολόγηση μεταξύ AIR και MAP εμφανίζεται κατά φύσιν λόγω και της βακτηριοστατικής δράσης του CO₂. Τα ευρήματα υποστηρίζονται από (Leisner & Gram, 2014), αναφέρουν ότι κύριοι αλλοιωγόνοι σε ψάρια υπό ψύξη και αερόβια συσκευασμένα είναι αρχικά τα *S. putrefaciens* και μετά τα *Pseudomonas* spp. Παράλληλα σε ψάρια υπό ψύξη και κενό αέρος είναι πάλι τα *S. putrefaciens* και τα Οξυγαλακτικά όπως εμφανίζονται και στα αποτελέσματα.

Οι *Pseudomonas* είναι σε υψηλότερο πληθυσμό σαν μικροβιακή χλωρίδα στην σάρκα των ιχθύων αλλά η συντήρηση στους 4° C δεν είναι κατάλληλη για την βέλτιστη ανάπτυξή τους, επιτρέποντας τα υδροθειούχα βακτήρια να αναπτυχθούν με γρηγορότερο ρυθμό. Τα *Pseudomonas* spp. είναι κατάλληλος μικροοργανισμός για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής, καθώς είναι συνήθως κυρίαρχος στα ιχθυοπροϊόντα και θεωρείται εξίσου σημαντικός μικροοργανισμός αλλοίωσης για διατηρημένα με απλή ψύξη ψάρια της Μεσογείου, σε συσκευασία αέρα, όπως αποδείχθηκε από διάφορες μελέτες, (Correia Peres Costa et al., 2020; Parlapani, et al., 2014; Tryfinopoulou et al., 2002). Οι *Pseudomonas* spp. και η *Shewanella putrefaciens* επιβεβαιώνεται ότι επιβραδύνθηκαν κατά την συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε σχέση με την αερόβια αποθήκευση. Όπως αναφέρεται σε Cu et al., (2009) και σε Gram & Huss, (1996) τα Οξυγαλακτικά αυξανόταν παράλληλα και στις 3 συσκευασίες με πολύ μικρές αποκλίσεις στις τιμές.

Στο πείραμα των Torrieri & Cavella, (2006) φιλέτα λαβρακιού (4^η ομάδα) συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 40% O₂ – 60% CO₂ στους 3° C και η τιμή των Εντεροβακτηριδίων ήταν κοντά στο 3,3 log cfu/g την 9^η ημέρα. Συμπεράναν ότι το υψηλό επίπεδο διοξειδίου του άνθρακα (>50%) έχει προστατευτική επίδραση στο προϊόν είτε το επίπεδο οξυγόνου είναι ίσο είτε μικρότερο από 30 %. Η τιμή την D9 στο παρόν πείραμα ήταν στο 4,5 log cfu/g και πιθανή να ήταν η ανθρώπινη επιμόλυνση κατά κάποιο στάδιο της προετοιμασίας είτε επιβαρυνθήκαν ήδη από το περιβάλλον που αλιεύθηκαν. Επιπλέον η διάρκεια ζωής για την αερόβια συσκευασία και την τροποποιημένη ατμόσφαιρα μοιάζει με πείραμα των Parlapani, et al., (2014) για τους 5° C. Καθώς και οι μικροβιολογικές μετρήσεις σχεδόν ταυτίζονται τις αντίστοιχες ημέρες.

Το μείγμα αερίων στην συσκευασία MAP δίνει την δυνατότητα εκμετάλλευσης οξυγόνου από 2 πηγές, το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και το οξυγόνο από την χρήση ΤΜΑΟ, σε αντίθεση με την συσκευασία κενού αέρος. Οπότε η χρήση CO₂ στην MAP μπορεί να επιβραδύνει 2 είδη μικροοργανισμών, τους παραγωγούς ΤΜΑ και H₂S (Milijasevic et al., 2019). Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, παραγωγοί H₂S είναι του γένους *Shewanella spp.* και των Οξυγαλακτικών. Επίσης χρήση ΤΜΑΟ κάνουν και τα Εντεροβακτηρίδια. Η επιλογή των αερίων της τροποποιημένης ατμόσφαιρας φάνηκαν αποτελεσματικά για την έντονη αναστολή τουλάχιστον 3^{ων} ειδών ΕΑΜ και υποστηρίζονται και από Milijasevic et al., (2019) και Roncale et al., (2010). Στις παραπάνω αναφορές έγινε λόγος και για μείγμα αερίων με 0% παρουσία O₂. Το οξυγόνο είναι επίσης χρήσιμο στην παρεμπόδιση απελευθέρωσης μεγαλύτερης ποσότητας ΤΜΑ (Mohan, 2017).

Η συσκευασία υπό κενό αέρος αναφέρει ο Mohan, (2017) μπορεί να διπλασιάσει τον χρόνο ζωής ιχθύων κάτι που φαίνεται να συμβαίνει και παραπάνω. Σημαντικό είναι και το υλικό της συσκευασίας για να έχει ανθεκτικότητα και να λειτουργεί αποτελεσματικά σαν εμπόδιο προς το O₂ του ατμοσφαιρικού αέρα. Οι Silbande et al., (2018) επισημαίνουν ότι σε αναερόβιες συνθήκες συσκευασίας τα Οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν μεγάλους πληθυσμούς κατά την αποθήκευση κοκκινόψαρου στους 4° C, παρόμοια φανερώθηκε και στα αποτελέσματα.

Γενικότερα τα αποτελέσματα του παρόν πειράματος δεν συμφωνούν με τους Iacumin et al., (2022), οι τιμές τους χωρίς την χρήση βιοπροστατευτικών σε συσκευασία υπό αερόβιες συνθήκες και τροποποιημένης ατμόσφαιρας ήταν πολύ χαμηλότερες σε σχέση με την παρούσα εργασία. Επίσης οι Navarro-Segura et al., (2020) είχαν κοντινό αριθμό *Pseudomonas* την 22^η μέρα με τον παρόν αρχικό πληθυσμό.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά ο εμπορικός χρόνος ζωής των απεντερωμένων ιχθύων λαβρακιού που αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες είναι 6 ημέρες, υπό κενό αέρος και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 12 ημέρες. Η μικροβιακή αλλοίωση του λαβρακιού, που προέρχεται από ελληνικά εύκρατα ύδατα, προκαλείται κυρίως από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. υπό αναερόβιες συνθήκες και από υδροθειούχα βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *S. putrefaciens*) υπό αερόβιες. Το διοξείδιο του άνθρακα στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα φάνηκε να έχει κάποια βακτηριοστατική δράση. Επιβεβαιώνεται στο πέρας και αυτής της πειραματικής διαδικασίας, ότι οι κύριοι ΕΑΜ των εύκρατων Μεσογειακών υδάτων είναι τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια *Pseudomonas* spp. και *S. putrefaciens*. Η τεχνολογίες συσκευασίας θα ήταν ωφέλιμο να βελτιστοποιηθούν για να διατηρούνται όσο το δυνατόν πιο σταθερές οι ατμοσφαιρικές συνθήκες κατά την συντήρηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al-tayyar, N. A., Youssef, A. M., & Al-hindi, R. (2019). Antimicrobial Food Packaging Based on Sustainable Bio-based materials for Reducing Foodborne Pathogens: A Review. *Food Chemistry*, 125915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125915>
- Anagnostopoulos, D. A., Parlapani, F. F., & Boziaris, I. S. (2022). The evolution of knowledge on seafood spoilage microbiota from the 20th to the 21st century: Have we finished or just begun? *Trends in Food Science and Technology*, 120(March 2021), 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.004>
- Angelis, M. De, & Gobbetti, M. (2011). *Lactobacillus spp .: General Characteristics*. 3, 1479–1484.
- Barash, J. R., & Arnon, S. S. (2014). A Novel Strain of Clostridium botulinum That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(2), 183–191. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit449>
- Baron, S. (1996). *Medical microbiology*.
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
- Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017). Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. In *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6>
- Chakravarty, S., & Anderson, G. (2015). *The Genus Pseudomonas* (pp. 321–344). <https://doi.org/10.1201/b17871-24>
- Compassion in foodbusiness. (2021). *European seabass (Dicentrarchus labrax) statistics summary*. 1–13.
- Correia Peres Costa, J. C., Floriano, B., Bascón Villegas, I. M., Rodríguez-Ruiz, J. P., Posada-Izquierdo, G. D., Zurera, G., & Pérez-Rodríguez, F. (2020). Study of the microbiological quality, prevalence of foodborne pathogens and product shelf-life of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from

- aquaculture in estuarine ecosystems of Andalusia (Spain). *Food Microbiology*, 90(July 2019), 103498. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103498>
- Cu, J. P., Pack, P. D. F., & Tr, L. (2009). *Bozianis i s ed seafood processing technology quality and sa* (I. Bozianis S. (Ed.)).
- Czerwiński, K., Rydzkowski, T., Wróblewska-Krepsztul, J., & Thakur, V. K. (2021). Towards Impact of Modified Atmosphere Packaging (MAP) on Shelf-Life of Polymer-Film-Packed Food Products: Challenges and Sustainable Developments. In *Coatings* (Vol. 11, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/coatings11121504>
- Dainty, R. H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 19–33. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01137-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01137-3)
- Debs-Louka, E., Louka, N., Abraham, G., Chabot, V., & Allaf, K. (1999). Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 626–631. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.626-631.1999>
- FDA U.S. food and drug administration. (2011). *2011 Annual Report on Food Facilities, Food Imports, and FDA Foreign Offices*.
- Fishbase*. (n.d.). <https://www.fishbase.se/summary/dicentrarchus-labrax.html>
- Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Serra, J. A., & Barat, J. M. (2010). Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry*, 119(4), 1514–1518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.036>
- Galaviz-Silva, L., Gomez-Anduro, G., Molina-Garza J., Z., & Ascencio-Valle, F. (2009). Microbiologically Safe Foods. In N. Heredia L., I. Wesley V., & J. S. Garcia (Eds.), *Microbiologically Safe Foods* (p. 696). John Wiley & Sons. https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=q2Rfq1ZIWTMC&oi=fnd&pg=PA227&dq=pseudomonas+sso+vac&ots=LF1jWtC4xh&sig=qNUOrGNTIUdJFdcgpQVpRTY1V1Y&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria - Problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262–266. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9)

- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 605(96), 200–223. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1113-3_7
- Gram, L., & Melchiorson, J. (1996). Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(6), 589–595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03262.x>
- Gram, L., Trolle, G., & Huss, H. H. (1987). *Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 o C) and high (20 o C) temperatures. 4*, 65–72.
- Herbert, R. A., & Bell, C. R. (1977). Growth characteristics of an obligately psychrophilic *Vibrio* sp. *Archives of Microbiology*, 113(3), 215–220. <https://doi.org/10.1007/BF00492028>
- Horner, W. F. A. (1997). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). *Fish Processing Technology*, 32–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1113-3_2
- Iacumin, L., Jayasinghe, A. S., Pellegrini, M., & Comi, G. (2022). *Evaluation of Different Techniques, including Modified Atmosphere, under Vacuum Packaging, Washing, and Latilactobacillus sakei as a Bioprotective Agent, to Increase the Shelf-Life of Fresh Guttled Sea Bass (Dicentrarchus labrax) and Sea Bream (Sparus aurata)*. <https://doi.org/10.3390/biology11020217>
- Jorgensen, B. R., & Huss, H. H. (1989). *Growth and activity of Shewanella putrefaciens isolated from spoiling fish. 9*, 51–62.
- Köse, S. (2010). *Evaluation of Seafood Safety Health Hazards for Traditional Fish Products : Preventive Measures and Monitoring Issues. 160*, 139–160. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2010.0120>
- Kumar, P., & Ganguly, S. (2014). Role of vacuum packaging in increasing shelf life in fish processing technology : A Review. *Asian Journal of Bio Science*, 9(1), 109–112.
- Leisner, J. J., & Gram, L. (2014). Spoilage of Fish. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00125-7>

- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90158-2](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90158-2)
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Βιολογία των Μικροοργανισμών* (14th ed.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Martin, R., Adams and Maurice, O., & Moss. (2008). *Food Microbiology* (3rd ed.). RSC Publishing.
- Martinović, T., Andjelković, U., Gajdošik, M. Š., Rešetar, D., & Josić, D. (2016). Foodborne pathogens and their toxins. *Journal of Proteomics*, 147, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.029>
- Matthews, K. R., Kniel, K. E., & Montvill, T. J. (2021). *Μικροβιολογία Τροφίμων* (I. Γιοβάσησ, I. Μποζιάρησ, & E. Γκιαούρησ (Eds.); 1η Ελληνικ). Δίσιγμα Εκδόσεις.
- Messina, C. M., Arena, R., Ficano, G., Barbera, L. La, Morghese, M., & Santulli, A. (2021). Combination of freezing, low sodium brine, and cold smoking on the quality and shelf-life of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets as a strategy to innovate the market of aquaculture products. *Animals*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ani11010185>
- Milijasevic, B. J., Djordjevic, V., & Milijasevic, M. (2019). *Modified atmosphere packaging of fish – an impact on shelf life* *Modified atmosphere packaging of fish – an impact on shelf life*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/333/1/012028>
- Mohan, C. O. (2017). *Chapter 15 Vacuum packaging & MAP*. 165–174.
- Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., Martínez-Hernández, G. B., & López-Gómez, A. (2020). A new advanced packaging system for extending the shelf life of refrigerated farmed fish fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(12), 4601–4611. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10520>

- Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Bartkevičs, V., & Bērziņš, A. (2016). Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, 66(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1102-5>
- Onyuka, J. (2013). *COMPARISON OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF BRINE SALTING, CHLORINATED SOLUTION AND*. 13(3).
- Parlapani, F. F. (2020). Microbial diversity of seafood. *Current Opinion in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.005>
- Parlapani, F. F., Kormas, K. A., & Boziaris, I. S. (2014). *Microbiological changes , shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. October*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6957>
- Parlapani, F. F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.006>
- Qu, P., Zhang, M., Fan, K., & Guo, Z. (2022). Microporous modified atmosphere packaging to extend shelf life of fresh foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1811635>
- Ray, B., & Bhunia, A. (2021). History and Development of Food Microbiology. *Fundamental Food Microbiology*, 51–58. <https://doi.org/10.1201/b16078-8>
- Roncale, P., Beltra, J. A., Provincial, L., Gil, M., & Guille, E. (2010). *Original article Effect of modified atmosphere packaging using different CO 2 and N 2 combinations on physical , chemical , microbiological and sensory changes of fresh sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets*. 1828–1836. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02341.x>
- Silbande, A., Adenet, S., Chopin, C., Cornet, J., Smith-Ravin, J., Rochefort, K., & Leroi, F. (2018). Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the

microbiological, chemical and sensory properties of tropical red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets stored at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 266(September 2017), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.015>

Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2008). Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability: As a Hurdle in Food Preservation. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*, 239–271. <https://doi.org/10.1002/9780470376454.ch10>

Torrieri, E., & Cavella, S. (2006). *Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (Dicentrarchus labrax)*. 77, 1078–1086. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.038>

Trans, P., Lond, R. S., & Grant, W. D. (2004). *Life at low water activity* *Life at low water activity*. 1249–1267. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1502>

Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., & Nychas, G. J. E. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 65–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.65-72.2002>

Wiley. (2020). Water Activity in Foods. In *Water Activity in Foods*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118765982>

Yang, W., Shi, W., Qu, Y., Wang, Z., Shen, S., Tu, L., Huang, H., & Wu, H. (2020). *Research on the quality changes of grass carp during brine salting*. February, 1–16. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1599>

Κοτζεκίδου - Ρουκά, Π. (2009). *Μικροβιολογία τροφίμων και Μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων*. Εκδόσεις Γιαχούδη.