ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Π.Δ.Ε.

Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus*στους 10°C

Shelf-life, microbiological, chemical and sensory changes during the storage of blue crab *Callinectes sapidus*at 10°C

ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΒΟΛΟΣ, 2015

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Η επιστήμη και η τέχνη ανήκουν σε όλο τον κόσμο, και μπροστά τους εξαφανίζονται όλα τα σύνορα.

«Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus*στους $10^{o}C$

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

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

2) **Κωνσταντίνος Κορμάς (Δρ.)**, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο αποτέλεσμα μιας κοπιαστικής και μακροχρόνιας προσπάθειας με την συγγραφή της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Κωνσταντίνο Κορμά και κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους, καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την αμέριστη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή της, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον συμφοιτητή, συνάδελφο μα πάνω απ' όλα καρδιακό μουφίλο Κορομηλά Σωτήρη για την άψογη συνεργασία και την αμοιβαία στήριξη που είχαμε κατά την ταυτόχρονη διεξαγωγή των πειραμάτων μας.

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

Τέλος, θα ήθελα να επισημάνω ότι η συγκεκριμένη εργασία αφιερώνεται στον αγαπημένο φίλο μου-κολλητό μου-αδερφό μου Τριανταφύλλου Μιχάλη που ''έφυγε'' άδικα πολύ νωρίς, αφήνοντάς μου μόνο όμορφες αναμνήσεις να θυμάμαι από εκείνον.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίαςήταν οπροσδιορισμός των οργανοληπτικών, μικροβιολογικώνκαι χημικών μεταβολών με σκοπότην εκτίμηση της ποιότητας και του εμπορικού χρόνου ζωής των μπλε καβουριών αποθηκευμένων στους 10°C.Καβούρια του είδους *Callinectessapidus*, ελήφθησαν από την περιοχή της Χαλάστρας (Ν. Θεσσαλονίκης), τον Φεβρουάριοτου 2015και αποθηκεύθηκαν στους 10°C. Δείγματα καβουριών λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 2 ημέρες) για οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις (Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο, Άζωτο της Τριμεθυλαμίνης).

Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής των καβουριών ήταν έξι (6) ημέρες (144h).Η αρχική τιμή του pH ήταν 7.14και παρουσίασε ουσιαστική αύξηση από την ημέρα απόρριψης και έπειτα, με την τιμή να φτάνει τα 7.16, ενώ στο τέλος της συντήρησης άγγιξε τα 8.52. Οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanellaputrefaciens*) αποτέλεσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, ενώ τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμούς πολύ χαμηλότερους. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα ξεπέρασε τους 7.19$\log_{10}$ cfu/gμετά από έξι (6) ημέρες (144h) αποθήκευσης, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης (1$\log_{10}$cfu/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Για τους χημικούς δείκτες αλλοίωσης, το TVB-N παρουσίασε ραγδαία αύξηση, καταγράφοντας τιμές 1527.96 και 3553.56mgN Kg^{-1}σάρκας τη 6^{η} (τέλος εμπορικού χρόνου ζωής) και 12^{η} (πέρας του πειράματος) ημέρα αντίστοιχα, σε σχέση με τις αρχικές τιμές, οι οποίες ήταν περί τα 507.92mgN Kg^{-1}. Παρόμοιο προφίλ αύξησης παρουσίασε και το TMA-N καθ'όλη τη διάρκεια της συντήρησης,

φθάνοντας τα επίπεδα των 1024.9±179.1mg NKg^{-1} στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής και 1647.6±186.1mg NKg^{-1}στο τέλος του πειράματος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το μπλε καβούρι χαρακτηρίσθηκε οργανοληπτικά μη αποδεκτό ($6^{η}$ ημέρα) όταν α) τα *Pseudomonas* spp. και υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια αποτέλεσαν τους δύο σημαντικότερους σε πληθυσμό αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, χωρίς να ξεπεράσουν το επίπεδο των 5- 6 logcfu/g, β) το pHέφτασε στην τιμή 7,16 και γ) οι συγκεντρώσεις του TVB-Νκαι TMA-N έφτασαν στα επίπεδα των 1527.96 και1024.9±179.1mgN Kg^{-1}.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, φαίνεται ότι τοTVB-Νκαι TMA-Νθα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης των μπλε καβουριών.

Λέξεις-κλειδιά:*Μπλε καβούρι (Callinectes Sapidus), Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ), Εμπορικός χρόνος ζωής, Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N), Άζωτο της Τριμεθυλαμίνης (TMA-N)*

ABSTRACT

The aim of this work is to (i) determine the microbiological changes and shelf-life of blue crabs(*Callinectes Sapidus)*stored at 10°C, and (ii) carry out an investigation of Total Volatile Basic Nitrogen and Trimethylamine Nitrogen (TVB-N and TMA-N) profiles, in order to reveal their potential to be used as Chemical Spoilage Indices (CSIs) of blue crabs spoilage/freshness. This study will give valuable information regarding the spoilage of blue crabs which is an important added-value product of seafood market.

Shelf life of blue crabs, as determined by the overall sensory scores, was 6 days. The pH valueshowed a considerable increase after the end of shelf-life (day 6), reaching the level of 8.52 at the end of storage period. *Pseudomonas* spp. and H_2S-producing bacteria (presumptive *Shewanella putrefaciens*), were the dominant bacteria and reached populations not higher than 6 log_{10} cfu/g. Enterobacteriaceae populations were not higher than 3.16 log_{10} cfu/g, while LAB remained below the detection limit of 1 log_{10} cfu/g throughout the experiment. Aerobic Plate Countsreached the level of 7.19log_{10} cfu/g at the end of shelf life of blue crabs (day 6). TVB-N and TMA-N values increased substantially from the middle of storage, reaching a value of 1527.96 and1024.9±179.1mgN Kg^{-1}at the end of shelf life (day 6,).

Concluding, the level of TVB-N and TMA-N increased during storage, suggesting their potential as CSIs of blue crab.

Keywords: *Blue crab (Callinectes Sapidus), Specific Spoilage Organisms (SSOs), Shelf-life, Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N), Trimethylamine Nitrogen (TMA-N).*

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11

1.1 Γενικά στοιχεία για τα καρκινοειδή 11

1.2. Στοιχεία βιολογίας του μπλε καβουριού (*Callinectessapidus*) 12

1.3 Διατροφική αξία καβουριού 13

1.4 Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων 16

1.5 Μικροβιακή αλλοίωση καρκινοειδών 18

1.6 Μικροβιακή αλλοίωση καβουριού (*Callinectes sapidus*) 19

1.7 Διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού 21

1.8 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης 22

1.9 Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (ΕΑΜ) 22

1.10 Σκοπός της εργασίας 24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 25

2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός 25

2.2 Προέλευση δειγμάτων 25

2.3 Μικροβιολογική ανάλυση 25

2.3.1 Μικροβιολογικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια 25

2.3.1.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ) 26

2.3.1.2 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*spp. 27

2.3.1.3 Βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* 28

2.3.1.4 Οξυγαλακτικάβακτήρια (LacticAcidBacteria, LAB) 30

2.3.1.5 Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο 32

2.3.1.6 Βακτήρια δονακίου (Vibrio spp.) 34

2.4 Μικροβιολογική ανάλυση του κρέατος των καβουριών 35

2.5 Προσδιορισμός του χρόνου απόρριψης 37

2.6 Μέτρηση pH 38

2.7 Χημική ανάλυση 38

2.7.1 Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N) 38

2.7.2 Προσδιορισμός Αζώτου Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) φασματοφωτομετρικά 39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 40

3.1 Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης 40

3.2 Μικροβιολογική ανάλυση 41

3.3Χημική ανάλυση 43

3.3.1Προσδιορισμός του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N) 43

3.3.2 Προσδιορισμός του αζώτου της τριμεθυλαμίνης 44
3.4 Προσδιορισμός pH 46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ 48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΒΙΒΙΟΓΡΑΦΙΑ 58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τα καρκινοειδή

Τα καρκινοειδή είναι υδρόβια αρθρόποδα με βραγχιακή αναπνοή (με εξαίρεση ορισμένα είδη της τάξης των Ισόποδων καθώς και ορισμένα μικρά καρκινοειδή π.χ. κωπήποδα, στα οποία η αναπνοή είναι δερμική). Τα πρώτα καρκινοειδή εμφανίστηκαν στην αρχή του Παλαιοζωικού αιώνα (Κάμβριο, 545-550 εκατομμύρια χρόνια πριν). Σήμερα είναι γνωστά περίπου 26.000 είδη καρκινοειδών που κατακλύζουν το σύνολο σχεδόν των υδατικών οικοσυστημάτων. Η συμμετοχή τους στη σύνθεση του πλαγκτού και του νηκτού είναι έντονη ενώ παράλληλα συνιστούν ένα μεγάλο ποσοστό των βενθικών οργανισμών. Η ευρεία εξάπλωση των καρκινοειδών στο νερό και ο σημαντικός οικολογικός τους ρόλος για την ισορροπία των υδατικών οικοσυστημάτων (συμμετοχή σε τροφικές αλυσίδες, τροφικά πλέγματα) είναι χαρακτηριστικά ανάλογα με αυτά των εντόμων για τα χερσαία οικοσυστήματα. Σημαντική είναι επίσης και η άμεση οικονομική τους αξία για τον άνθρωπο (http 1).

Τα περισσότερα καρκινοειδή ζουν ελεύθερα, πολλά όμως είναι προσκολλημένα και αρκετά ζουν ως παράσιτα ή ξενιστές παρασίτων. Στην πλειοψηφία τους τα καρκινοειδή είναι γονοχωριστικά είδη, εκτός από κάποια που είναι ερμαφρόδιτα ή εμφανίζουν υπολειμματικό ερμαφροδιτισμό.

Το σώμα τον καρκινοειδών παρουσιάζει αμφίπλευρη συμμετρία και εξωτερικά εμφανίζει μεταμέρεια, χαρακτηριστικά που εκδηλώνονται με την έκφυση από το σώμα εξαρτημάτων (π.χ. ποδιών, κεραιών κ.ά.) σε ζεύγη και την ύπαρξη ενός σκληρού περιβλήματος (όστρακο) που διαιρείται σε τμήματα (μεταμερίδια). Χαρακτηριστική είναι για όλα τα καρκινοειδή η διχαλωτή κατασκευή των εξαρτημάτων (εξαρτήματα με σχήμα Y).

Το όστρακο των καρκινοειδών σχηματίζεται από χιτίνη που εκκρίνεται από την επιδερμίδα και εμποτίζεται με άλατα ανθρακικού και φωσφορικού ασβεστίου που συμβάλλουν στη σκληρότητα και ακαμψία του. Στις αρθρώσεις το όστρακο είναι μαλακό έτσι ώστε να εξασφαλίζονται δυνατότητες κίνησης (http 1).

Στο σώμα των περισσότερων καρκινοειδών διακρίνονται η κεφαλή, ο θώρακας και η κοιλιά. Σε αρκετά όμως καρκινοειδή, όπως η καραβίδα κ.ά., η κεφαλή και ο θώρακας σχηματίζουν έναν ενιαίο κεφαλοθώρακα.

Τέλος η ανάπτυξη των καρκινοειδών σπάνια είναι άμεση. Στις περισσότερες περιπτώσεις η προνύμφη τους υφίσταται απλές ή σύνθετες διαδοχικές μεταμορφώσεις που συνοδεύονται από εκδύσεις (http 2).

1.2.Στοιχεία βιολογίας του μπλε καβουριού (*Callinectessapidus*)

Το είδος *Callinectes sapidus Rathbun* (μπλέ καβούρι) (**εικόνα 1.2**) προέρχεται από τον Δυτικό Ατλαντικό Ωκεανό και η παρουσία του έχει καταγραφεί σε πολλές παράκτιες περιοχές της Μεσογείου, ιδιαίτερα στην ανατολική λεκάνη της (http3). Το καβούρι είναι ένα από τα πιο επιτυχημένα αλλόχθονα δεκάποδα καρκινοειδή ως προς τον βαθμό εγκλιματισμού, εγκατάστασης, εξάπλωσης αλλά και διαχρονικής παρουσίας του στις ελληνικές θάλασσες (Serbetis 1959, Holthuis 1961, Kinzelbach 1965, Riedl 1983, Pancucci-Papadopoulou et al. 2005, Kevrekidis 2010).

Η παρουσία του *C. sapidus* έχει καταγραφεί ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 1940 στον Θερμαϊκό (Serbetis 1959), ενώ η αφθονία του στον κόλπο παρουσιάζει διαχρονικά σημαντικές διακυμάνσεις. Σύμφωνα με αναφορές αλιέων του Όρμου Μεθώνης η αύξηση της αφθονίας του είδους παρουσιάσθηκε κατά τις δεκαετίες του 1950 και 1960, όπου σημειώθηκε και αντίστοιχη σημαντική εμπορική εκμετάλλευση. Παρόλα αυτά, από τότε μέχρι και πρόσφατα, ο πληθυσμός του καβουριού παρέμεινε

σχετικά σε χαμηλά επίπεδα. Από την άνοιξη του 2009 έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση του πληθυσμού του στον Θερμαϊκό κόλπο, ιδιαίτερα στον Όρμο Μεθώνης και στα εκβολικά συστήματα των ποταμών Αξιού και Αλιάκμονα, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα στην παράκτια αλιεία και στη μυδοκαλλιέργεια στον κόλπο (π.χ. καταστροφή των δικτύων, θήρευση καλλιεργούμενων μυδιών) (Kevrekidis 2010). Σύμφωνα με τα στοιχεία της ιχθυόσκαλας Θεσσαλονίκης η ετήσια παραγωγή του είδους για το 2010 προσέγγισε τους 84 τόνους (http 4). Τα τελευταία δύο χρόνια το καβούρι παρουσιάζει μια ιδιαίτερα δυναμική εξάπλωση στον Θερμαϊκό κόλπο, καθώς ο πληθυσμός του αυξήθηκε σε εντυπωσιακά επίπεδα. Η παρουσία του διαπιστώθηκε νότια ως τον ποταμό Πηνειό αλλά και στο βορειο-ανατολικό Αιγαίο, ως την εκβολική περιοχή του ποταμού Έβρου, περιοχές στις οποίες το είδος είχε καταγραφεί και παλαιότερα (Serbetis 1959, Enzeross et al. 1997).

Εικόνα 1.2 Μπλε Καβούρι (*Callinactussapidus*)

1.3 Διατροφική αξία καβουριού

Το καβούρι είναι ένας οργανισμός πλούσιος σε θρεπτικά συστατικά (**Πίνακας 1.3**) και κορεσμένα λίπη, αλλά περιέχει χοληστερόλη, σε μικρότερα επίπεδα μεν από το κρέας, αλλά μεγαλύτερα από τα ψάρια. Επιπλέον, αποτελεί ένα θρεπτικό και

εύγευστο τρόφιμο. Είναι πλούσιο σε ω-3 λιπαρά οξέα, βιταμίνες και μέταλλα. Πιο συγκεκριμένα, είναι πλούσιο σε Φολικό οξύ, Νιασίνη, Βιταμίνη Β-12, Α και C. Το κρέας των καβουριών είναι καλή πηγή σιδήρου, χαλκού, ψευδάργυρου, σελήνιου (ισχυρό αντιοξειδωτικό), κάλιο, νάτριο, φώσφορο, ασβέστειο και χρώμιο. Το χρώμιο συγκεκριμένα βοηθά πολύ τον οργανισμό να διατηρηθεί σε ευγλυκαιμία, κάτι που είναι χρήσιμο για τους διαβητικούς. Τέλος, τα καβούρια είναι πλούσια σε πρωτεΐνη και αμινοξέα (Matchesetal. 1988).

Στη συνέχεια παρατίθενται τα οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση καβουριών (http 5):

- ✓ Είναι πλούσια σε πρωτεΐνη και αμινοξέα. Παρά τη χαμηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες και λιπαρά, μια μερίδα με καβούρια προσφέρει 20 γραμμάρια πρωτεΐνης. Αυτό το καθιστά μια εξαιρετική εναλλακτική λύση για υψηλής ποιότητας-ποσότητας πρωτεΐνης για τους αθλητές. Επίσης περιέχουν πολύ χαμηλή ποσότητα υδατανθράκων, όπως εξάλλου όλα τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, που τα καθιστά μια καλή επιλογή για τους διαβητικούς.
- ✓ Περιέχουν πολύ χαμηλές θερμίδες και λιπαρά. Τα καβούρια αποτελούν το 'ιδανικό κρέας' για όσους υπολογίζουν συστηματικά τις θερμίδες. Πιο συγκεκριμένα, 100 gr. καβούρι αποδίδει μόνο 102 θερμίδες, και λιγότερο από 2gr λίπους ανά μερίδα, χαρακτηριστικά ευεργετικά για την καρδιακή λειτουργία. Παρά τη χαμηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες και λιπαρά, τα καβούρια αποτελούν ένα ιδιαίτερα θρεπτικό, χορταστικό και εύγευστο κυρίως τρόφιμο.
- ✓ Περιέχουν χαμηλή συγκέντρωση σε υδράργυρο. Ένα από τα μεγάλα προβλήματα που αφορούν στην κατανάλωση θαλασσινών είναι η έκθεση στον υδράργυρο. Τα καλά νέα είναι ότι τα καβούρια του Ατλαντικού (μπλε

καβούρι) έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε υδράργυρο, καθιστώντας τα μια πολύ καλή επιλογή θαλασσινών για ολόκληρη την οικογένεια. Στην πραγματικότητα, τα καβούρια θεωρούνται μια από τις ασφαλέστερες μορφές των θαλασσινών όσον αφορά τα επίπεδα υδραργύρου.

- ✓ Είναι πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα. Τα καβούρια είναι μια καλή πηγή των ω-3 λιπαρών οξέων που βοηθούν στην καρδιακή λειτουργία, συμβάλλοντας στη μείωση των τριγλυκεριδίων και της αρτηριακής πίεσης, και καταλήγουν στη μείωση του καρδιαγειακού κινδύνου. Τα ω-3 λιπαρά οξέα θεωρούνται ότι μειώνουν τη φλεγμονή, ενισχύουν την ανοσολογική λειτουργία και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων τύπων καρκίνου. Οι περισσότεροι Ευρωπαίοι δεν παίρνουν αρκετά ω-3 λιπαρά οξέα με τη διατροφή τους, ενώ η προσθήκη κρέατος καβουριών στη διατροφή τους είναι μια καλή αρχή.
- ✓ Το κρέας καβουριών είναι επίσης πλούσιο σε βιταμίνες και μέταλλα. Πιο συγκεκριμένα είναι πλούσιο σε νιασίνη, φολικό οξύ, βιταμίνη Β-12 (ιδιαίτερα σημαντική για τη νευρική λειτουργία) και βιταμίνη Α και C, ενώ αποτελεί μια καλή πηγή σε ψευδάργυρο, σίδηρο, χαλκό, σελήνιο (ισχυρό αντιοξειδωτικό), νάτριο, κάλιο, φώσφορο, χαλκό, ασβέστιο και χρώμιο. Το χρώμιο συνεργάζεται με την ινσουλίνη στον μεταβολισμό της γλυκόζης βοηθώντας τον οργανισμό να διατηρηθεί σε ευγλυκαιμία, ιδιαίτερα χρήσιμο σε διαβητικούς. Επίσης βοηθά στην αύξηση των επιπέδων της HDL (καλή χοληστερόλη), η οποία μειώνει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου.

Πίνακας 1.3 Διατροφικά στοιχεία καβουριού (http 6)

ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΒΟΥΡΑ (ΜΠΛΕ) ΜΑΓΕΙΡΕΜΕΝΟΥ		
	Θερμίδες 102kcal/100gr	
ΠΡΩΤΕΪΝΗ	20,00 gr	40%
(ΤΡΥΠΤΟΦΑΝΗ)	0,281 gr	90%
ΛΙΠΟΣ	2 gr	3%
(Ω -3 λ.ο)	2700 mg	60%
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	0 gr	0%
ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗ	100 mg	33%
ΝΑΤΡΙΟ	279 mg	12%
ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α	7 mcg	1%
ΒΙΤΑΜΙΝΗ C	3 mg	5%
ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε	1.8 mg	9%
ΝΙΑΣΙΝΗ	3.3 mg	16%
ΘΕΙΑΜΙΝΗ	0,1 mg	7%
ΒΙΤΑΜΙΝΗ Β6	0.2 mg	9%
ΒΙΤΑΜΙΝΗ Β12	7.3 mg	122%
ΦΟΛΙΚΟ ΟΞΥ	51.6 mcg	13%
ΠΑΝΤΟΘΕΝΙΚΟ	0.4 mg	4 %
ΑΣΒΕΣΤΙΟ	75,00 mg	10%
ΣΙΔΗΡΟΣ	0,1mg	5 %
ΣΕΛΗΝΙΟ	40 mcg	57%
ΦΩΣΦΟΡΟΣ	206mg	21 %
ΜΑΓΝΗΣΙΟ	33 mg	8 %
ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ	4.2mg	28 %
ΧΑΛΚΟΣ	0.6mg	32 %
Τα ποσοστά είναι σύμφωνα με τις US συνιστώμενες ημερήσιες συστάσεις για ενήλικες. ΠΗΓΗ: nutritiondata		

1.4 Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων

Τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα συστήματα - μίγματα χημικών συστατικών τα οποία είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Εκτός από τα δομικά συστατικά που παρέχουν για τον μυϊκό ιστό και τα απαραίτητα προϊόντα για το μεταβολισμό, εξυπηρετούν τον άνθρωπο είτε βοηθώντας στην ανάπτυξη του οργανισμού και τη διατήρηση της κατάστασης υγείας του, είτε προμηθεύοντας την απαιτούμενη ενέργεια για τις λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος.

Επειδή τα τρόφιμα περιέχουν θρεπτικά συστατικά πρέπει να διαφυλάσσεται η θρεπτικότητα και να επιδιώκεται η βελτίωση της θρεπτικής αξίας αυτών,

λαμβάνοντας πρόνοια για τις μικρότερες δυνατές αλλοιώσεις και για τη μείωση στο ελάχιστο των παραγόντων μόλυνσης. Οι επεξεργασίες παραγωγής και συντήρησης των τροφίμων πρέπει να είναι κατάλληλες, ώστε να παρέχουν προϊόντα ασφαλή με υψηλό βαθμό αποδοχής από τον καταναλωτή. Η καταλληλότητα ενός τροφίμου είναι υποκειμενική και στηρίζεται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτού (εμφάνιση, οσμή, γεύση, χρώμα, υφή). Η ποιότητα του τροφίμου ορίζεται ως ο βαθμός προσαρμογής στις απαιτήσεις του καταναλωτή, οι οποίες έχουν σχέση με τη θρεπτικότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητές του. Εξαρτάται από την ποιότητα των πρώτων υλών και από την τεχνολογία παραγωγής, εκφράζεται δε με τα χαρακτηριστικά του γνωρίσματα όπως είναι το άρωμα, η γεύση, η σύσταση κ.ά. Έτσι η ποιότητα ενός τροφίμου αποτελεί την οριακή «συνισταμένη των επί μέρους ποιοτήτων» των υλικών και των μεθόδων τεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του συγκεκριμένου προϊόντος.

Ως αλλοίωση των τροφίμων θεωρείται η υποβάθμιση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Huis in't Veld 1996). Τα θαλασσινά είναι πιο ευπαθή, σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης όπως το βοδινό και το χοιρινό κρέας ,το κοτόπουλο, κλπ. Για το λόγο αυτό απαιτείται πολύ προσεκτικός χειρισμός κατά την αποθήκευσή τους. Η υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσης μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξείδωσης (τάγγιση) (Ashie et al. 1996, Gram etal 1996).

1.5 Μικροβιακή αλλοίωση καρκινοειδών

Για να είναι επιτυχής στις αγορές τροφίμων ευρείας κατανάλωσης ανά τον κόσμο, οι αγρότες, οι αλιείς, οι μεταποιητές και οι έμποροι λιανικής πώλησης πρέπει να διασφαλίσουν ότι τα θαλασσινά προϊόντα είναι υψηλής ποιότητας και ασφαλή για κατανάλωση, ελέγχοντας την αλλοίωσή τους.

Τα θαλασσινά είναι πιο ευπαθή, σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το βοδινό και χοιρινό κρέας, το κοτόπουλο, κλπ. Για το λόγο αυτό απαιτεί πιο προσεκτικό χειρισμό και την αποθήκευση (Ashieetal. 1996). Η αλλοίωση των εν λόγω τροφίμων μπορεί να οριστεί ως οι αλλαγές στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (οπτικές, γεύση, οσμή και υφή) ώστε να τα καθιστά ακατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Gram&Huss 1996). Η αλλοίωση των αλιευμάτων μπορεί να προκληθεί από ένζυμα, αφυδάτωση, οξείδωση, μόλυνση και φυσική βλάβη (Harbell 1988). Ωστόσο, η κύρια αιτία της αλλοίωσής τους είναι η μικροβιακή ανάπτυξη και μεταβολική δραστηριότητα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αμινών, σουλφιδίων, αλκοολών, αλδεϋδών, κετόνων και οργανικών οξέων με δυσάρεστη και αποκρουστική γεύση. Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί επίσης να ανιχνευθεί από αποχρωματισμό του προϊόντος ή από τη δημιουργία βλέννας, ή ακόμη και από την εμφάνιση αποικιών. Η μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων είναι ένας τομέας της παγκόσμιας ανησυχίας δεδομένου ότι το 25% του συνόλου των τροφίμων που παράγονται και χάνεται μετά τη συγκομιδή οφείλεται στη μικροβιακή δραστηριότητα (Baird-Parker 2000).

Τα περισσότερα αλιευτικά εμπορικά είδη που εκφορτώνονται στους λιμένες βρίσκονται μακριά από την περιοχή αλίευσής τους. Έτσι, ενδεχόμενες κακές πρακτικές και λάθος χειρισμοί κατά την αλίευση και την προσωρινή αποθήκευσή τους στο σκάφος, αλλά και τη μετέπειτα συντήρησή του, μπορεί να προκαλέσουν

φθορά και υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευμάτων πριν αυτά φτάσουν στο σημείο πώλησης (Ashie et al. 1996). Ομοίως, στα καρκινοειδή και πιο συγκεκριμένα στο μπλε καβούρι *(Callinectes sapidus)*, η αλίευση, η αποθήκευση και η συντήρησή του είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν το βαθμό ποιότητάς του. Το κρέας των καρκινοειδών επιδεινώνεται ραγδαία σε θερμοκρασία ψύξης (Akpan 1997, Farragut 1965). Η υψηλή του περιεκτικότητα σε υγρασία και η χαλαρή σύνδεση μεταξύ των ινών του κολλαγόνου παρέχουν ένα πλούσιο και ιδανικό περιβάλλον για μικροβιακή ανάπτυξη (Suyama et al. 1987). Το κρέας των καβουριών έχει υψηλότερη σύνθεση των ελεύθερων αμινοξέων σε σύγκριση με αυτό των ιχθύων και ο μηχανισμός της αποσύνθεσης είναι κάπως διαφορετικός. Τα καρκινοειδή περιέχουν μικρές ποσότητες υδατανθράκων, και είναι πλούσια σε ασβέστιο, φώσφορο, μαγνήσιο, νάτριο, κάλιο, μαγγάνιο, ψευδάργυρο, και σίδηρο (Gökoðlu et al 2003, Lopez et al. 1981).

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στα καρκινοειδή και στο καβούρι (Gram & Dalgaard 2002). Η μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα εκδηλώνεται με αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (οσμή, γενική εμφάνιση) εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών (Gill 1991). Οι μικροοργανισμοί αυτοί που λαμβάνουν μέρος στην αλλοίωση προέρχονται από την αρχική μικροβιακή σύνθεση και από επιμόλυνση (μίανση).

1.6 Μικροβιακή αλλοίωση καβουριού (*Callinectes sapidus*)

Το καβούρι είναι ένα από τα πιο σημαντικά εμπορικά καρκινοειδή που αλιεύεται κυρίως στη νοτιοανατολική Αμερική. Είναι ένα παραδοσιακό έδεσμα που μαγειρεύεται στον ατμό, αλλά μπορεί να μολυνθεί κατά τη διάρκεια της διαλογής και συσκευασίας. Το κρέας που προέρχεται από τη μεταποίηση του καβουριού θεωρείται

έτοιμο για κατανάλωση με την προϋπόθεση ότι πληρούνται αυστηρά μικροβιολογικά πρότυπα κατά την επεξεργασία του (Ingham et al. 1990). Σε υψηλές αερόβιες συνθήκες, το κρέας του μπορεί να φιλοξενήσει επικίνδυνους για τη δημόσια παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes*. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η επεξεργασία με ακτινοβολία παρέχει μια πιθανή λύση σε τέτοια πιθανά προβλήματα με τη μείωση της αλλοίωσης και από άλλα βακτήρια που προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία και που ενδεχομένως εμφανιστούν στο κρέας του καβουριού (Grodner et al. 1991). Η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας με ακτινοβολία έχει δοκιμαστεί πειραματικά εκτενώς, αλλά οι επιδράσεις της ακτινοβολίας στην οργανοληπτική ποιότητα των νωπών προϊόντων δεν έχουν αναφερθεί. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μια μελέτη των επιπτώσεων της ακτινοβολίας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων με βάση το κρέας καβουριών είναι απαραίτητη στο εγγύς μέλλον.

Μετά τη σφαγή του ζώου, οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τους μύες του καβουριού, με αποτέλεσμα να παράγεται μία ποικιλία πτητικών. Η οσμή της αμμωνίας χρησιμοποιείται από τους ειδικούς ως δείκτης αλλοίωσης του κρέατος του καβουριού και γενικότερα των καρκινοειδών. Η τριμεθυλαμίνη (TMA) είναι μία πτητική αμίνη που χρησιμοποιείται ως δείκτης ποιότητας για το κρέας του καβουριού (Spink et al. 1996). Επίσης η ινδόλη έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την αλλοίωσή του, αλλά προτιμάται η τριμεθυλαμίνη (Snellings et al. 2003). Άλλες ενώσεις που παράγονται κατά την διάρκεια της αλλοίωσης περιλαμβάνουν υδρόθειο, διμεθυλοσουλφίδιο, και μεθυλο μερκαπτάνη από θειούχα αμινοξέα διάφορες αμίνες, αμμωνία, σκατόλη, πουτρεσκίνη και καδαβερίνη από τα αμινοξέα, κατώτερα λιπαρά οξέα από σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η ριβόζη, καρβονυλικών ενώσεων από λιπίδια (Avery et al. 1988, Smith et al. 1984, Watts et al. 1982). Η απώλεια της φρεσκάδας,

η οποία συχνά προηγείται της μικροβιακής αλλοίωσης, περιλαμβάνει κυρίως αυτολυτικές αντιδράσεις οι οποίες ελέγχονται από ενδογενή ένζυμα που υπάρχουν στο μυϊκό ιστό, καθώς και εκείνα που υπόκεινται σε έκπλυση από το έντερο (Ashie et al. 1996).

1.7 Διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής σύνθεσης ενός τροφίμου (απομόνωση, ταυτοποίηση, ανίχνευση και απαρίθμηση των μικροοργανισμών) στηρίζονται κυρίως στη χρήση εκλεκτικών ή γενικής χρήσης τεχνητών υποστρωμάτων (θρεπτικά υλικά) και χαρακτηρίζονται ως κλασσικές μέθοδοι. Η αξιοπιστία των κλασσικών τεχνικών περιορίζεται εξαιτίας της δυνατότητας μέτρησης μόνο των κυττάρων που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες καθώς και από την αξιοπιστία του ίδιου του υποστρώματος (θρεπτικό υλικό). Επίσης, τα καταπονημένα ή τραυματισμένα κύτταρα δεν αναπτύσσονται σε εκλεκτικά υλικά, ενώ άλλα παρεμποδίζονται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αφθονία (Hugenholtz et al. 1998). Γενικά, οι κλασσικές τεχνικές χαρακτηρίζονται ως χρονοβόρες και καλύπτουν μικρότερο ποσοστό του 1% των ειδών των μικροοργανισμών που απαρτίζουν τη μικροβιακή σύνθεση ενός περιβαλλοντικού δείγματος (Wardetal.1990).

Ο προσδιορισμός/ταυτοποίηση της μικροβιακής σύνθεσης στα καβούρια πραγματοποιείται κυρίως με φαινοτυπικές δοκιμές μετά από απομόνωση των μικροοργανισμών που απαντώνται στον ιστό του κρέατος σε θρεπτικά υλικά. Κατά καιρούς, διάφοροι ερευνητές μελέτησαν τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθυηρών και των καρκινοειδών είτε σε εκλεκτικά ή σε γενικής χρήσης θρεπτικά υλικά με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κάθε αποικίας (Gram et al. 1987, Gennari

et al 1988, Heinsz et al. 1988, Jorgensenetal 1989, Dalgaard 1995, Gennari et al. 1999, Rodriguez et al. 2003, Tryfinopoulou et al. 2002, 2007). Η χρήση φαινοτυπικών δοκιμών (μορφολογικές, βιοχημικές) σε καθαρές καλλιέργειες δεν επαρκεί για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών κυρίως εξαιτίας της χαμηλής διακριτικής τους ικανότητας.

1.8 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

Ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης είναι η εκτίμηση της αλλοιογόνου δυναμικής των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού των μεταβολικών τους προϊόντων που προκαλούν την αλλοίωση και την οργανοληπτική απόρριψη. Περαιτέρω, είναι δυνατό η χρήση τέτοιων μεταβολιτών ως χημικοί δείκτες μικροβιολογικής αλλοίωσης. Οι κυριότεροι χημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N), η τριμεθυλαμίνη (TMA) ή άζωτο της τριμεθυλαμίνης (TMA-N) (Schereretal. 2006,Mol et al. 2007).

1.9 Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (ΕΑΜ)

Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα μιας σειράς αλλαγών στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου, λόγω της επικράτησης των μικροοργανισμών (Nychas et al. 2008). Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στους μεταβολίτες των μικροοργανισμών και γίνονται αντιληπτές με τις μεταβολές που παρατηρούνται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευτικών προϊόντων, όπως είναι η οσμή, το άρωμα και ηγενική εμφάνιση (Parlapani et al. 2014).Οι Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ) αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard

2002). Οι ΕΑΜ αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης των 7-9log cfu/g οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους, έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard et al. 1993, Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996).Το επίπεδο ανάπτυξης των ΕΑΜ, μπορεί να χαρακτηριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη που αντιπροσωπεύει την αλλοίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημικός δείκτης αλλοίωσης (Chemical Spoilage Index, CSI) (Dalgaard 1993).

Η επικράτηση των ΕΑΜ δεν είναι καθορισμένη, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από μία σειρά παραγόντων κατά την παραγωγική αλυσίδα όπως επεξεργασία, μεταφορά και συντήρηση (Nychas et al. 2008). Οι μικροοργανισμοί που τελικά θα επικρατήσουν, είναι αυτοί οι οποίοι διαθέτουν τέτοιες στρατηγικές, που τους επιτρέπουν να προσαρμοστούν καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου. Είναι γνωστό πλέον, ότι σε κάθε τρόφιμο, πέντε είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (**Πίνακας 1.9**). Οι παράγοντες αυτοί μαζί αποτελούν τις συνιστώσες από κάθε ένα διαφορετικό σημείο του τροφίμου, η εξέλιξη του οποίου είναι διαφορετική στο χωροχρόνο, επηρεάζει και επηρεάζεται από τους μικροοργανισμούς. Η τροποποίηση ή ο έλεγχος ενός ή περισσοτέρων παραγόντων οδηγεί σε διαφορετική επιλογή και εξέλιξη των μικροοργανισμών, χαρακτηριστικό που μπορεί να έχει εφαρμογή στη δημιουργία προϊόντων με μεγάλη διάρκεια ζωής (Nychas et al. 2005).

Πίνακας 1.9 Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη

Ενδογενής (Intrincic)	Δομή του κρέατος του καβουριού: a_w, pH, παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σύσταση θρεπτικών συστατικών
Παράγοντες κατά την επεξεργασία (Processing)	Επηρεάζουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα του τροφίμου
Εξωγενής (Extrincic)	Θερμοκρασία, σχετική υγρασία,
Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες (Implicit)	Ανταγωνισμός και συνεργισμός μεταξύ των βακτηρίων
Συνεργιστικοί παράγοντες	Αλληλεπίδραση παραγόντων

1.10 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας είναι ο προσδιορισμός των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών για την εκτίμηση της ποιότητας και του εναπομείναντος εμπορικού χρόνου ζωής των καβουριών αποθηκευμένων στους 10^oC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Σε σαράντα (40) καβούρια από δύο (2) παρτίδες (των 20 ατόμων η κάθε μία), πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και του προφίλ των παραγόμενων χημικών δεικτών αλλοίωσης όπως TVB-N, TMA, καθώς επίσης και η μέτρηση του pH των δειγμάτων.

2.2 Προέλευση δειγμάτων

Καβούρια του είδους *Calinectes sapidus*σε δύο (2) παρτίδες των είκοσι (20) ατόμων ελήφθησαν από την εταιρία Blue Crab P.C., στην περιοχή της Χαλάστρας (Ν. Θεσσαλονίκης) και μεταφέρθηκαν σε διογκωμένο πολυστυρένιο εντός τριών ωρών στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο όπου αποθηκεύθηκαν στους 10°C.

2.3 Μικροβιολογική ανάλυση

2.3.1 Μικροβιολογικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK), εκτός από το STAA (streptomycin sulphate, thallus acetate, cycloheximide actidione agar) το οποίο προέρχονταν από την Biolife Italiana srl (Milano, Italy).To Iron Agar (IA) προετοιμάσθηκε σύμφωνα με τους Gram et al. (1987) καιπεριείχεταπαρακάτω: peptone 20 gl^{-1} , meatextract 3.0 g, yeastextract 3.0 gl^{-1} , ferriccitrate 3.0 gl^{-1} , sodiumthiosulphate 0.3 gl^{-1} , NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 gl^{-1} , agar 14 gl^{-1} . To pH ρυθμίσθηκε στο 7.4. Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.3.1.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ)

Το TSA (LAB011)(**Εικόνα 2.3.1.1**) είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων τον μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχτούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται παρακάτω:

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

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

Εικόνα 2.3.1.1 Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε θρεπτικό υλικό TSA

2.3.1.2 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*spp.

Το θρεπτικό μέσο (Cetrimide, Fucidin, Chephaloridine, LAB108)(**Εικόνα 2.3.1.2**) παρέχει όλα εκείνα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού κάνει το θρεπτικό εκλεκτικό για *Pseudomonas* spp. Η πεπτόνη ζελατίνης και η καζεΐνη από ενζυματική πέψη παρέχουν το άζωτο, το θείο και τις βιταμίνες που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί. Το χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και το θειϊκό κάλιο (K_2SO_4) παράγουν χρωστική. Η γλυκερόλη συμπληρώνεται ως πηγή άνθρακα (C). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες Sodium Nalidixate, Fucidin και Cephaloridine είναι εκλεκτικά υλικά και χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν $Gram^+$ και ορισμένα $Gram^-$ βακτήρια.

Συστατικά: g/1000 ml

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

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 25.2 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκαν 500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 5 ml γλυκερόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθεί το θρεπτικό. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 ^{o}C για 15 min. Το τελικό pH ήταν 7.1 ± 0.2 στους 25 ^{o}C. Στη συνέχεια το θρεπτικό αφέθηκε να κρυώσει σε υδατόλουτρο μέχρι τους 45 έως 50 ^{o}C και προστέθηκε ένα φιαλίδιο με εκλεκτικό υλικό CFC, αφού πρώτα διαλύθηκε σε 5 ml αποστειρωμένο νερό με 50 % αιθανόλη. Στη συνέχεια 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.

Εικόνα 2.3.1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas spp,*σε θρεπτικό υλικό CFC

2.3.1.3 Βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*

Ο προσδιορισμός των *Enterobacteriaceae* έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, LAB088)(**Εικόνα 2.3.1.3**). Χρησιμοποιείται

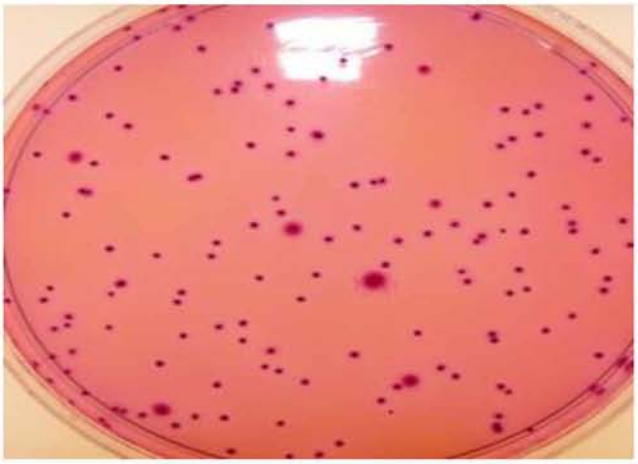
για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στην δράση των χολικών (biles) αλάτων και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτηρίδια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ζελατίνη από ενζυματική πέψη παρέχει άζωτο (N), αμινοξέα και άνθρακα (C). Το εκχύλισμα ζύμης προσφέρει τις απαραίτητες βιταμίνες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες (H/C). Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο παρουσία του δείκτη pH (Ουδέτερο κόκκινο, Neutralred).

Συστατικά: g/1000 ml

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

Διαδικασία παρασκευής:

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



Εικόνα 2.3.1.3α Ανάπτυξη βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* σε θρεπτικό υλικό VRBGA

2.3.1.4 Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα deMan - Rogosa - Sharpeagar (MRS, LAB093)(**Εικόνα 2.3.1.4)**. Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) καθώς και το βασικό pH καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ενζυματική πέψη ζωικού ιστού καθώς και το εκχύλισμα βοδινού και ζύμης είναι οι πηγές άνθρακα (C), αζώτου (N) και βιταμινών. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμούμενος υδατάνθρακας (H/C). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) είναι ανασταλτικός παράγοντας, ενώ μαζί με το κιτρικό αμμώνιο ($C_6H_{17}N_3O_7$) δρουν ως εκλεκτικοί παράγοντες. Το φωσφορικό κάλιο (K_3PO_4) δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας, ενώ το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το θειικό μαγγάνιο ($MnSO_4$) παρέχουν θετικά ιόντα για τον μεταβολισμό. Το πολυσορβικό (Polysorbate, Tween ® 80) είναι επιφανειοδραστικό, διευκολύνοντας την πρόσληψη των θρεπτικών από τους μικροοργανισμούς. Το άγαρ χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής, ενώ το τελικό pH είναι 6.5 ± 0.2 στους 25 ^{o}C.

Συστατικά: g/1000 ml

Mixed Peptones	10.0
Yeast Extract	5.0
Beef Extract	10.0
Glucose	20.0
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Triammonium Citrate	2.0
Magnesium Sulphate	0.2
Manganese sulphate	0.05
Tween ® 80	1.08
Agar	15.0

Διαδικασία παρασκευής:

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

Εικόνα 2.3.1.4 Ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό MRS

2.3.1.5 Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο

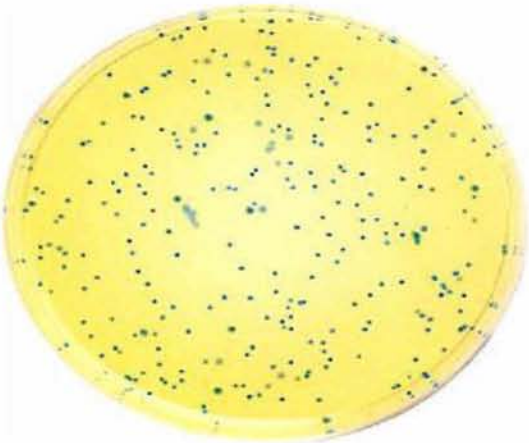
ToIron Agar (LAB53)(**Εικόνα 2.3.1.5**) χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H_2S). Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη, καθώς και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και βιταμίνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), τη δεξτρόζη, τη λακτόζη και την σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες (H/C) αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειϊκό νάτριο ($Na_2S_2O_2$) ανάγεται προς υδρόθειο (H_2S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου Fe και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες.

Συστατικά: g/1000 ml

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

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 65.0 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε στους 121 ^{o}C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 ^{o}C, μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.



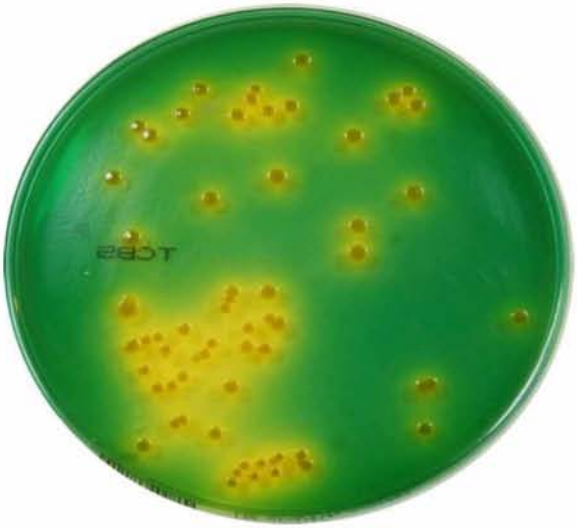
Εικόνα 2.3.1.5 Ανάπτυξη βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο σε θρεπτικό υλικό IronAgar

2.3.1.6 Βακτήρια δονακίου (Vibrio spp.)

Το TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar)(**Εικόνα 2.3.1.6**) είναι ένα υψηλά εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την εκλεκτική απομόνωση του δονακίου της χολέρας και του δονακίου παραναιμολυτικού από ποικιλία κλινικών και μη κλινικών δειγμάτων. Τα εντεροβακτηριακά και ο πρωτέας που πιθανόν να υπάρχουν στα δείγματα κοπράνων αναστέλλονται. Το TCBS μπορεί επίσης να χρησιμοποιηκεί για την απομόνωση του V. Fluvialis και του V.vulnificus. Τα Gram(+) βακτήρια αναστέλλονται από την παρουσία χολικών αλάτων στο υλικό. Η σουκρόζη περιλαμβάνεται σαν υδρογονάνθρακας για τον μεταβολισμό των δονακίων. Το αλκαλικό pH υποβοθάει την ανάπτυξη του δονακίου της χολέρας. Το μπλε της θυμόλης και της βρομοθυμόλης λειτουργούν σαν δείκτες για τις αλλαγές του pH.

Συστατικά: g/1000 ml

Yeast extract	5.0
Peptone mix	10.0
Sodium Citrate	10.0
Sodium Thiosulfate	10.0
Bile salts	9.0
Sucrose	17.0
Sodium chloride	10.0
Ferric Ammonium citrate	1.0
Bromthymol blue	0.04
Thymol blue	0.04
Agar No. 1	14.0



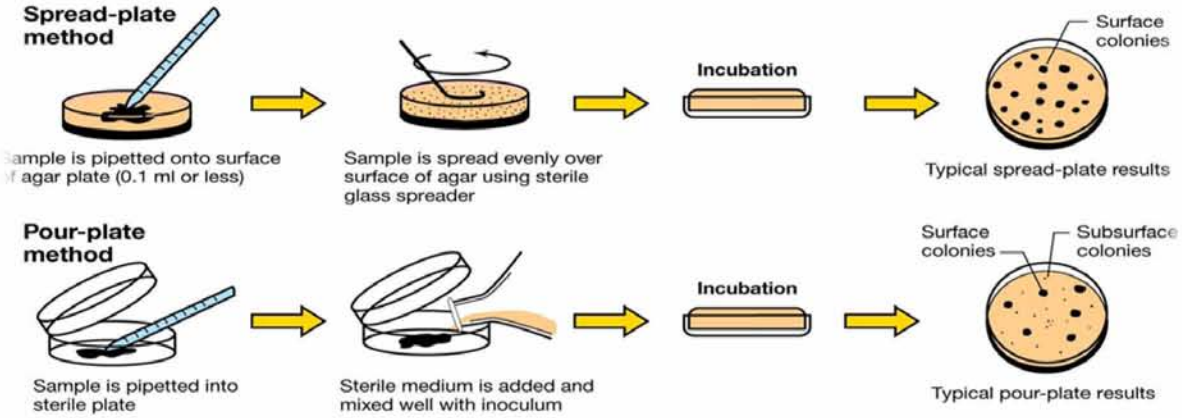
Εικόνα 2.3.1.6α Ανάπτυξη βακτηρίων δονακίου σε θρεπτικό υλικό TCBS

2.4 Μικροβιολογική ανάλυση του κρέατος των καβουριών

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν διπλά δείγματα σάρκας των 5g, από δύο διαφορετικά καβούρια (n=2x2=4), μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, προστίθονταν 45 ml Maximum Recovery Diluent (MRD-NACL 0,85% και 0,1% Peptone) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (BugMixer, Interscience, London, UK). Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1 ml από κάθε αραίωση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν α) Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός σε TSA (Tryptone Soy Agar) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48-72 ώρες, β) βακτήρια που παράγουν H_2S σε IA (Iron Agar), με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48 ώρες, γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar (Mann, Rogosa, Sharpe agar), με

καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες, ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC Pseudomonas Agar (Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine agar) με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48 ώρες και ζ) *Vibrio* spp. (presumptivecolonies) σε TCBSAgar (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar) με καταμέτρηση των αποικιών κίτρινου και πράσινου χρώματος μετά από επώαση στους 25°C για 48 ώρες. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, ενώ του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού, *Pseudomonas* spp.*και των βακτηρίων που παράγουν* H_2Sμε την τεχνική της επίστρωσης (**Εικόνα 2.4.2**).



Εικόνα 2.4.2Μέθοδος επίστρωσης και ενσωμάτωσης σε τρυβλίο

2.5 Προσδιορισμός του χρόνου απόρριψης

Η οργανοληπτική εξέταση πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων με βάση τα κριτήρια αρεσκείας που περιγράφονται στον **πίνακα 2.5**. Οι κριτές (panel) αποτελούνταν από πέντε (5) άτομα. Κάθε προϊόν απορρίπτονταν όταν οι τρεις (3) κριτές από τους πέντε κριτές (5) το αξιολογούσαν ως ακατάλληλο (υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό) για κατανάλωση. Η βαθμολογία για κάθε χαρακτηριστικό προέκυψε από τους μέσους όρους των πέντε (5) κριτών.

Πίνακας 2.5 Κριτήρια αρεσκείας για την αξιολόγηση της ποιότητας με τις αισθήσεις σε καβούρια

	3 ΒΑΘΜΟΙ (Άριστο)	**2 ΒΑΘΜΟΙ (Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό)**	**1 ΒΑΘΜΟΣ (Αλλοιωμένο, μη αποδεκτό)**
Εμφάνιση	Μπλε δαγκάνες έντονο άσπρο στην κοιλιακή χώρα γυαλιστερό	Θαμπό, ξεθωριασμένο,	Εξαιρετικά θαμπό, ξεθωριασμένο, σάπιο, αλλοίωση στις δαγκάνες
Συνεκτικότητα καβουκιού	Σφικτό	Αρκετά μαλακό	Πολύ μαλακή, διαλύεται
Οσμή	Έντονα θαλασσινή	Δυσάρεστη	Πολύ δυσάρεστη

2.6 Μέτρηση pH

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

2.7 Χημική ανάλυση

2.7.1 Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)

Ποσότητα 10 g δείγματος ομογενοποιούνταν σε συσκευή τύπου Stomacher με 50 ml διαλύματος τριχλωρο-οξικού οξέος 6% για 2 min και κατόπιν ακολουθούσε διήθηση μέσω ηθμού Whatman No.1 σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Στη συνέχεια, ποσότητα 40 ml εις διπλούν του διηθήματος (n=2) με 6 ml NaOH 20% οδηγούνταν σε αποστακτήρα τύπου Kjeldahl για απόσταξη μεθ'υδρατμών, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά Vyncke et al. (1987). Η δέσμευση των πτητικών βασικών αζωτούχων ουσιών πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 50 ml H_2BO_3 3% και τέλος ακολουθούσε τιτλοδότηση με 0,05 N HCl. Η διαδικασία πραγματοποιούνταν εις διπλούν(n=2x2=4). Τα υπόλοιπα 10 ml, ανά δοκιμή, χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της τριμεθυλαμίνης.

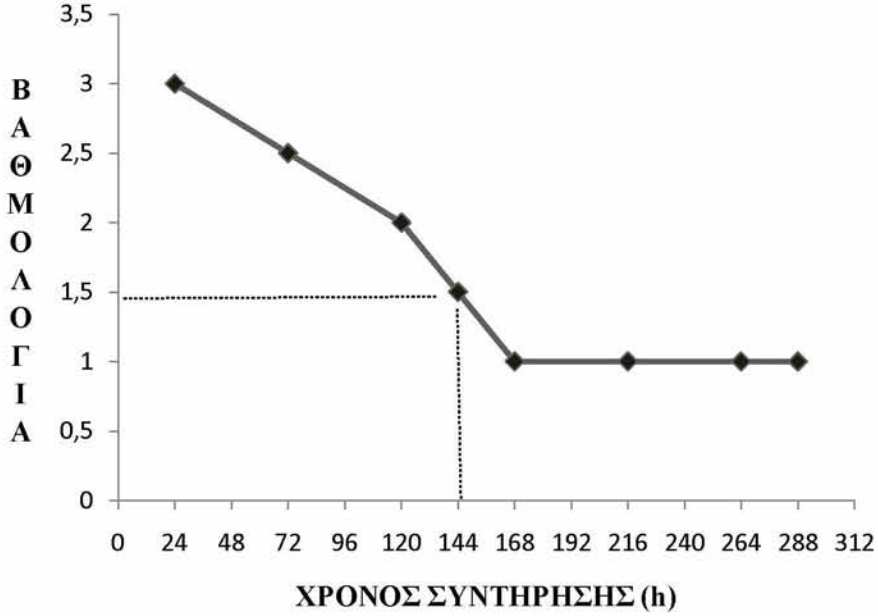
2.7.2 Προσδιορισμός Αζώτου Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) φασματοφωτομετρικά

Ποσότητα 1 ml από το υπόλοιπο διήθημα των 10 ml χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τριμεθυλαμίνης, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά Dyer (1945). Στο 1 ml του διηθήματος προστίθονταν 3 ml τουλουόλιο, 200 μl φορμόλης (φορμαλδεϋδη 40%) και 500 μl KOH 90% για την εξουδετέρωση των αζωτούχων ουσιών εκτός της τριμεθυλαμίνης. Ακολουθούσε ανάδευση του περιεχομένου σε vortex για 10 sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) για 15 min. Στη συνέχεια, στο 1 ml από το εκχύλισμα με τη δεσμευμένη τριμεθυλαμίνη προστίθονταν 0,5 g $NaSO_4$ και 3 ml πικρικό οξύ 0,02% σε τουλουόλιο. Ακολουθούσε ανάδευση του περιεχομένου σε vortex για 10 sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιούνταν σε φασματοφωτόμετρο στα 410nm. Για τον υπολογισμό της τριμεθυλαμίνης στα άγνωστα δείγματα, κατασκευάσθηκε πρότυπη καμπύλη για τα πέντε πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης σε τριμεθυλαμίνη 0, 0,05, 0,10, 0,15 και 0,20 mg TMA /ml TCA 6%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης

Όλα τα προϊόντα την πρώτη ημέρα (d 0) αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως άριστα. Στους 10 ^{o}C, τα καβούρια παρέμειναν σε 'άριστη' κατάσταση έως την 2^{η} ημέρα (βαθμός 3), σε κατάσταση 'πολύ καλή' έως την 4^{η} ημέρα (βαθμός 3-2) και σε κατάσταση 'υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό' έως την 6^{η} ημέρα (βαθμός 2), ενώ έφτασε σε κατάσταση 'απορριπτόμενο' την 7^{η} ημέρα (βαθμός 1). Από την 7^{η} ημέρα το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως πλήρες αλλοιωμένο (βαθμός 1) (Σχήμα 3.1).



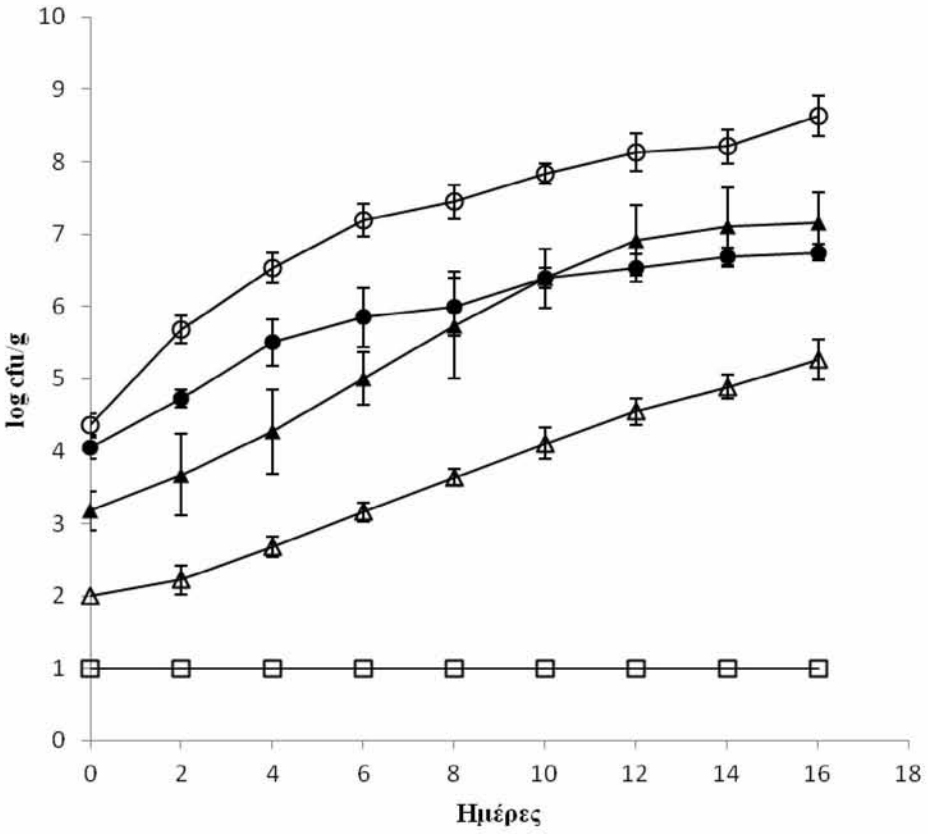
Σχήμα 3.1 Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των καβουριών κατά τη διάρκεια της συντήρησης (10 ^{o}C) ανά 24ωρο
(Με ευθεία και κάθετη γραμμή παρουσιάζεται ο εμπορικός χρόνος ζωής των καβουριών)

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, ο εμπορικός χρόνος ζωής των καβουριών αποθηκευμένων στους 10 ^{o}C προσδιορίστηκε στις 6 ημέρες (144 h).

3.2 Μικροβιολογική ανάλυση

Στο **διάγραμμα 3.2** παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές της ΟΜΧ αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (*Pseudomonas* spp., υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια, Enterobacteriaceae και οξυγαλακτικά βακτήρια) του κρέατος των καβουριών, αποθηκευμένων στους10^{o}C.Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν ταχύτερα έως την 8^{η}ημέρα είναι τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. και δευτερευόντως τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanellaputrefaciens*). Από την 9^{η}ημέρα παρατηρείται μία ραγδαία ανάπτυξη των υδροθειούχων, τα οποία και επικρατούν τελικά έναντι των *Pseudomonas* spp από την 10^{η}ημέρα και μετά. Παρόλα αυτά, στο τέλος του εμπορικού χρόνος ζωής (6^{η} ημέρα), ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. βρέθηκε υψηλότερος από όλους τους υπόλοιπους, γεγονός που καθιστά τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό επικρατέστερο.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 0) ήταν 4.37, 4.05 και 3.18 log_{10} cfu/g για την ΟΜΧ, τα *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια, αντίστοιχα, τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμό 2 log_{10} cfu/g, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρέμειναν κάτω του ορίου ανίχνευσης του 1.00 log_{10} cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.



Διάγραμμα 3.2. Πληθυσμιακές μεταβολές της ΟΜΧ και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε σάρκα καβουριού, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 10°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2X2=4) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών. Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H_2S (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια(□) και *Enterobacteriaceae* (Δ).

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη συντήρηση των καβουριών, και στο πέρας του εμπορικού χρόνου, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, με πληθυσμό 5.85 $\log_{10}$cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής (ημέρα 6 ή 144h) και 6.53$\log_{10}$ cfu/g στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 16, 384 h).

Τον πληθυσμό των *Pseudomonas* spp. ακολούθησε ο πληθυσμός των υδροθειούχων (H_2S) βακτηρίων, με 3.18 $\log_{10}$ cfu/g στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 0), 5 $\log_{10}$ cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής (ημέρα 6 ή 144 h) και 6.92 $\log_{10}$ cfu/g στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

Τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμό 2 log_{10} cfu/g, στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής έφτασαν τα 3.16 log_{10} cfu/g, ενώ στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας ο πληθυσμός εκτοξεύθηκε στα 4.55 log_{10} cfu/g.

Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης του1.00 log_{10} cfu/g.

Τέλος, η ΟΜΧ στην αρχή του πειράματος ήταν στους 4.37log_{10} cfu/g, έφτασε τους 7.19 log_{10} cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, ενώ στο πέρας του πειράματος άγγιξε τους 8.13 log_{10} cfu/g.

3.3Χημική ανάλυση

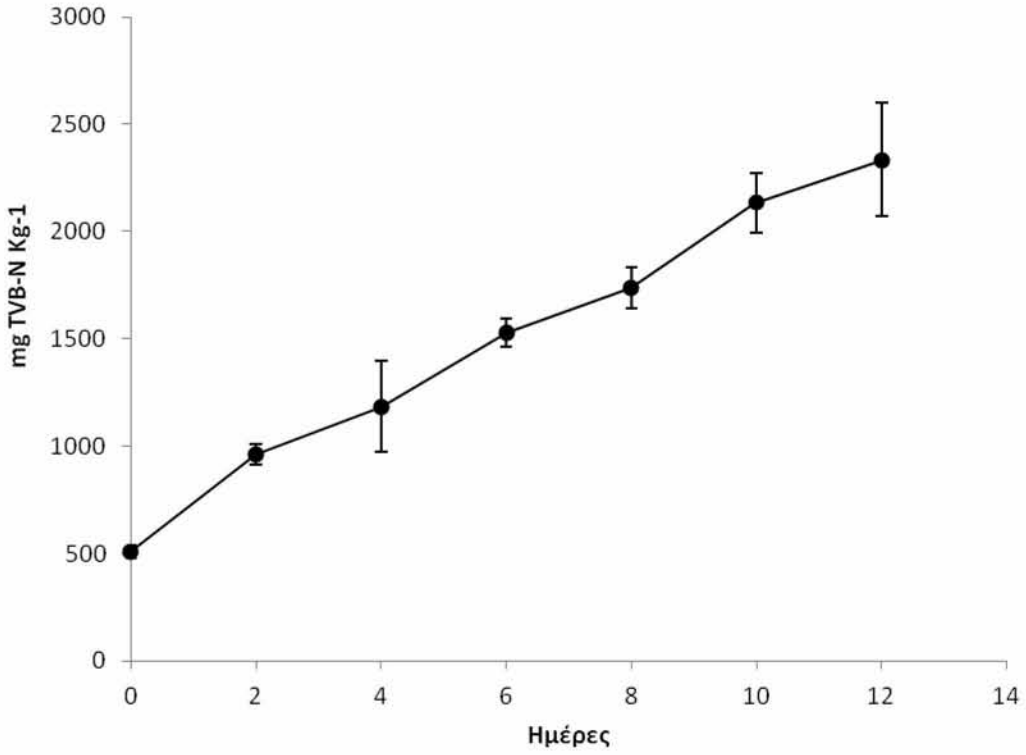
3.3.1Προσδιορισμός του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)

Η συγκέντρωση του TVB-N ($mgKg^{-1}$ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) της σάρκας των καβουριών που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 10^oC, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.2.1**

Πίνακας 3.3.1. Μεταβολές στοTVB-N (μ.ο. ± τυπ.αποκλ., $mgKg^{-1}$ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης καβουριού υπό συνθήκες αέρα στους 10 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Χρόνος (Ημέρες)	TVB-N
0	507.9±28.82
2	961.0±48.22
4	1185.0±212.6
6	**1528.0±63.71**
8	1734.0±95.73
10	2134.2±141.0
12	2335.7±265.0

Η ποσότητα του TVB-N στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής των καβουριών ήταν 507.9±28.82 $mgKg^{-1}$ κρέατος. Η ποσότητα του TVB-N στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής ήταν 1528.0±63.71 $mgKg^{-1}$, ενώ στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, η τιμή κυμάνθηκε στα 2335.7±265.0 $mgKg^{-1}$ (**Διάγραμμα 3.2.1**)



Διάγραμμα 3.3.1 Μεταβολές στοTVB-N (μ.ο. ± τυπ.αποκλ., $mgKg^{-1}$ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης καβουριού υπό συνθήκες αέρα στους 10 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

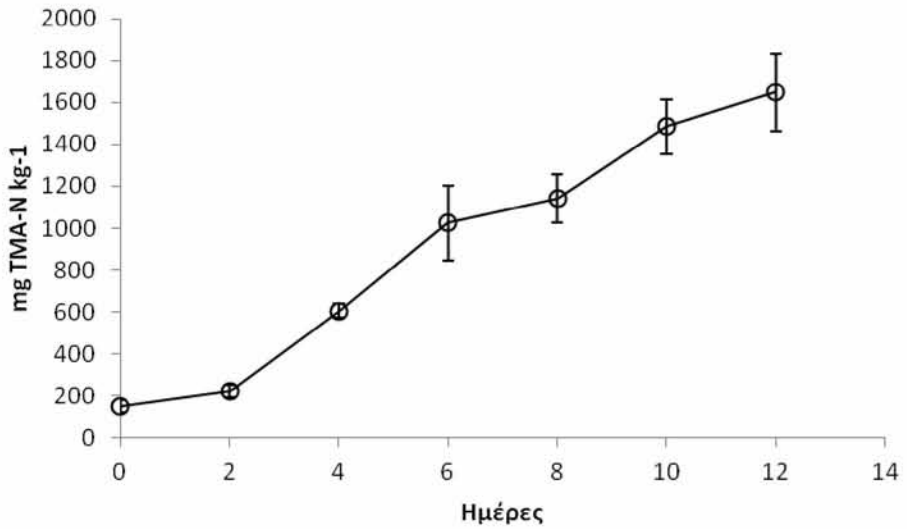
3.3.2 Προσδιορισμός του αζώτου της τριμεθυλαμίνης

Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής το TMA-N ήταν 146.9±30.14 mg Kg^{-1}. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης παρουσίασε ραγδαία αύξηση, φθάνοντας τα επίπεδα των 1024.9±179.1mg Kg^{-1} στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Οι τιμές

του TMA-Νκατά τη διάρκεια της συντήρησης των καβουριών υπό τις συνθήκες αποθήκευσης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2.2.**

Πίνακας 3.3.2 Μεταβολές του TMA-N (μ.ο. ± τυπ.απ., $mgKg^{-1}$ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης καβουριού υπό συνθήκες αέρα στους 10 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Χρόνος (Ημέρες)	TMA-N
0	146.9±30.14
2	221.1±30.62
4	605.0±33.45
6	**1024.9±179.1**
8	1142.1±114.7
10	1482.4±130.4
12	1647.6±186.1



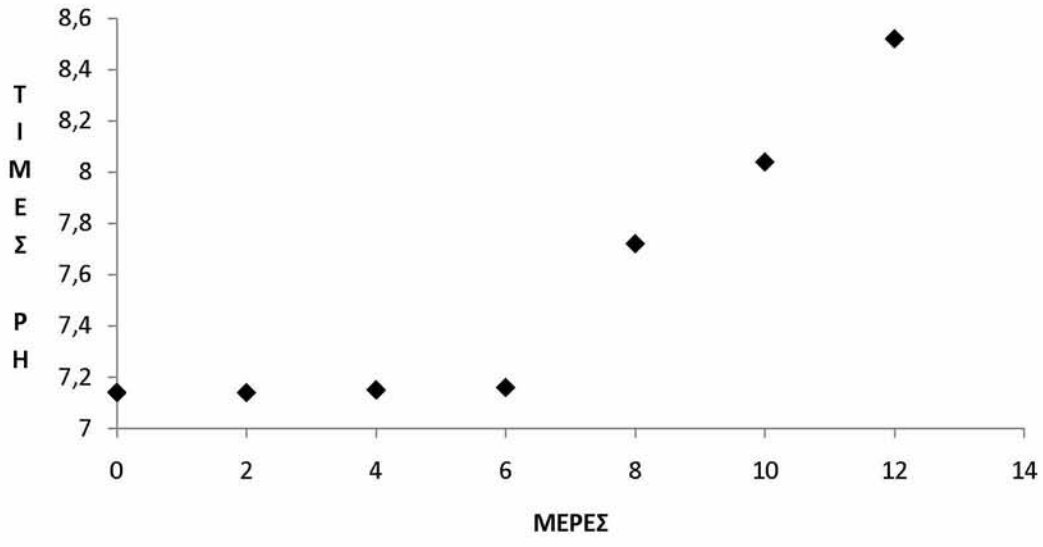
Διάγραμμα 3.3.2 Μεταβολές του TMA-N (μ.ο. ± τυπ. απ., $mgKg^{-1}$ σάρκας καβουριού, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης καβουριού υπό συνθήκες αέρα στους 10 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

3.4 Προσδιορισμός pH

Η ποσότητα του pHτης σάρκας των καβουριών που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες 10°C, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.4.**

Πίνακας 3.4:Μέτρηση των τιμών του phτης σάρκας του καβουριού. Με έντονα μαύρα γράμματα παρατίθεται η τιμή του pHστο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Μέρες	pH
0	7,14
2	7,14
4	7,15
6	**7,16**
8	7,72
10	8,04
12	8,52



Διάγραμμα 3.4: Προσδιορισμός τιμών pHκατά τις ημέρες συντήρησης.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, την πρώτη ημέρα της συντήρησης η τιμή του pHτης σάρκας του καβουριού ήταν κατά μέσο όρο 7.14, ενώ στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής υπήρχε μία ελάχιστη αύξηση της τιμής στα 7.16. Από την

6^{η}ημέρα και μετά, υπήρχε μία ραγδαία αύξηση της τιμής, φτάνοντας στα επίπεδα 8.52 στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έγινε προσδιορισμός των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών με σκοπό την εκτίμηση της ποιότητας και του εμπορικού χρόνου ζωής των μπλε καβουριών αποθηκευμένων στους 10°C.

Μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση των καβουριών, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες στους 10 ^{o}C, ο εμπορικός χρόνος ζωής αυτών προσδιορίστηκε στις έξι (6) ημέρες (144 h). Πράγματι οι Sarnoski et al. (2010), στο πείραμά τους βρήκαν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής του μπλε καβουριού υπό συνθήκες συντήρησης 2°C, ήταν εφτά (7) ημέρες, λόγω της δυσάρεστης οσμής των δειγμάτων τις επόμενες ημέρες. Επιπλέον οι Losada et al. (2006) και οι Aubourg et al. (2007) αναφέρουν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής της καραβίδας υπό συνθήκες ψύξης (0 ^{o}C) ήταν εφτά (7) ημέρες, λόγω απόρριψης με βάση την οσμή και το χρώμα (ανάπτυξη μελανομάτων). Ωστόσο σύμφωνα με τους Boziaris et al. (2011), ο εμπορικός χρόνος ζωής της καραβίδας Νορβηγίας (*Nephropsnorvegicus*) υπό συνθήκες ψύξης (0 ^{o}C), εκτιμήθηκε στις τέσσερις (4) ημέρες, πιθανώς λόγω της ταχύτερης ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και της εντονότερης ενζυμικής δράσης κυρίως αυτών που προκαλούν την ενζυμική αμαύρωση στο κέλυφος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους Early et al. (1982), τα καρκινοειδή φαίνεται να αλλοιώνονται ταχύτερα σε σύγκριση με τα ψάρια και συνεπώς να έχουν μικρότερο εμπορικό χρόνο ζωής, με πιθανή αιτία το ότι ο εμπορικός χρόνος των καβουριών εξαρτάται από το πόσο θα παραμείνουν ζωντανά υπό συνθήκες συντήρησης. Πράγματι, συγκρίνοντας τον εμπορικό χρόνο ζωής των καβουριών και των ψαριών θα μπορούσε να βγει το συμπέρασμα ότι η παραπάνω παρατήρηση ισχύει. Για παράδειγμα, οι Gram et al. (1987) αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής

απεντερωμένων φιλέτων αλλά και ολόκληρων ιχθύων γάδου (*Gadusmorhua*) αποθηκευμένων στους 0 και στους 20 ^{o}C ήταν 9 - 10 ημέρες και 1 ημέρα, αντίστοιχα, ενώ οι Kyrana et al. (1997), αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (meltingice, 0 ^{o}C), ήταν 17 ημέρες, όπου τα προϊόντα βαθμολογήθηκαν με B → C.Επίσης, σύμφωνα με τους Alasalvar et al. (2001), το όριο αποδοχής των ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (0 ^{o}C), ήταν 17 έως 18 ημέρες, ενώ οι Kyrana&Lougovois (2002) προσδιόρισαν τον χρόνο απόρριψης για ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (0 ^{o}C), στις 15 ημέρες. Ακόμη, μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση που πραγματοποίησαν οι Taliadourou et al. (2003), κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι ολόκληροι ιχθύες λαβρακιού, αποθηκευμένοι υπό αερόβιες συνθήκες στον πάγο (0 ^{o}C), είχαν διάρκεια ζωής 12 έως 13 ημέρες.

Όσο αναφορά τους μικροοργανισμούς, η ανάπτυξη των οποίων οδηγεί στην αλλοίωση των καβουριών, στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι οι επικρατέστεροι είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.και τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Ειδικότερα, οι κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί των προαναφερθέντων καβουριών ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., με δεύτερα επικρατέστερα τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), με πληθυσμούς, την ημέρα απόρριψης των καβουριών (ημέρα 6, 144h), 5.85 log_{10}cfu/g και 5 log_{10}cfu/g αντίστοιχα, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης (ημέρα 12, 288h), τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια ξεπέρασαν σε πληθυσμό αυτά των *Pseudomonas* spp με τις τιμές να κυμαίνονται σε 6.92 και 6.53 log_{10} cfu/g αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τους Boziaris et al.(2011), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp είναι ο επικρατέστερος αλλοιογόνος μικροοργανισμός και στις καραβίδες Νορβηγίας υπό συνθήκες ψύξης (0°C), με τιμή της τάξης των $5x10^3$ cfu g^{-1}, ενώ ακολουθούν τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S). Περαιτέρω, η μικροβιακή αλλοίωσηστα ψάρια από εύκρατα νερά της Βόρειας Θάλασσας, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες, προκαλείται από τα *S. putrefaciens* και τα *Pseudomonas* sp. (Gram et al., 1996). Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* sp έχει αναφερθεί ότι είναι ο κύριος μικροοργανισμός αλλοίωσης των ψαριών που αλιεύονται στα ελληνικά εύκρατα νερά (Koutsoumanis & Νυχάς 1999, Koutsoumanis & Νυχάς 2000, Koutsoumanis et al 2000. Παπαδόπουλος et al. 2003, Parlapani et al. 2013, 2014, 2015a, b,). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με την εν λόγω εργασία. Οι παραπάνω ερευνητές αναφέρουν ότι τα υδροθειούχο – παραγωγά βακτήρια και τα *Enterobacteriaceae* είναι συνήθως οι δεύτεροι και τρίτοι, πιο σημαντικοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με την παρούσα εργασία. Εν αντιθέσει με τους Boziaris et al.(2008), όπου παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια που παράγουν H_2S και τα *Enterobacteriaceae* δεν διέφεραν σε όλη τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης.

Επιπλέον, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. έχουν χαρακτηριστεί ως οι ΕΑΜ των ιχθύων που προέρχονται από εύκρατα και τροπικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gram et al. 1990,Papadopoulos et al. 2003, Taliadourou et al. 2003, Chytiri et al. 2004,Paleologos et al. 2004, Parlapani et al. 2013, 2014, 2015a, b, c), ενώ τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια αποτελούν τους ΕΑΜ σε ιχθύες όπως ο γάδος, που προέρχονται από Βόρειες θάλασσες και συντηρούνται στους 0 °C (Grametal. 1987,Jørgensen&Huss 1998). Συγκεκριμένα, τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους κυρίαρχους

μικροοργανισμός και κατ' επέκταση τους ΕΑΜ σε ιχθύες όπως η τσιπούρα και το λαβράκι (Papadopoulos et al. 2003,Taliadourou et al. 2003, Paleologos et al. 2004,Tryfinopoulou et al. 2007,Koutsoumanis 2002, Parlapani et al. 2013, 2014, 2015a, b, c, Tryfinopoulou et al. 2007).Επιπλέον, οι ουσίες που δίνουν τις χαρακτηριστικές οσμές στην τσιπούρα που αποθηκεύεται υπό αερόβιες συνθήκες, είναι αμμωνιακής φύσης, κυρίως προϊόντα μεταβολισμού των *Pseudomonas* spp. (Dainty 1996).

Ενώ, όμως τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια αποτελούν τους ΕΑΜ στους ιχθύες που προέρχονται από Βόρειες θάλασσες και συντηρούνται στους 0 ^oC (Gram et al. 1987,Jørgensen&Huss 1998), αποτελούν τους δεύτερους επικρατέστερους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς στα αλιεύματα που προέρχονται από τη Μεσόγειο (Papadopoulos et al. 2003,Taliadourou et al. 2003,Paleologos et al. 2004,Tryfinopoulou et al. 2007), ενώ αποτελούνται κυρίως από *Shewanella spp.* και στις δυο περιπτώσεις (Grametal. 1987,Jørgensen&Huss 1998,Dalgaard et al. 1993,Tryfinopoulou et al. 2007,Parlapani et al. 2014). Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, ο πληθυσμός των υδροθειούχων (H_2S) βακτηρίων (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*) ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο των *Pseudomonas* spp., με τον πληθυσμό να φτάνει τους 7.16 και, στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας. Οι χαμηλές τιμές έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, για παράδειγμα οι Taliadourou et al.(2003) αναφέρουν πως ο πληθυσμός των συγκεκριμένων βακτηρίων άγγιξε τους 7.00 log_{10}cfu/g (ημέρα 13) σε φιλέτα λαβρακιού αποθηκευμένα στους 0 ^oC, ενώ προτείνεται πως εμπλέκονται στην αλλοίωση ιχθύων λαβρακιού, χωρίς να έχουν ταυτοποιηθεί οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (Kyrana&Lougovois 2002). Τέλος, τα βακτήρια *Shewanella putrefaciens* θεωρούνται ως δυναμικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί σε ψυχρά και

εύκρατα ύδατα και ανήκουν στα είδη εκείνα τα οποία παράγουν σουλφίδια. Όταν ο αριθμός του πληθυσμού τους υπερβαίνει τους 6.00 log_{10}cfu/g, ποσότητες θείου (S) αρχίζουν να παράγονται και εν τέλει εμφανίζονται οι πρώτες ενδείξεις αλλοίωσης (Grametal. 1987).

Το Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N) έχει προταθεί ως χημικός δείκτης αλλοίωσης στους ιχθύες (Ólafsdóttir et al. 1997) και αναμένεται να σχετίζεται με διάφορες οργανοληπτικές ιδιότητες όπως η γεύση, ενώ είναι πιο αξιόπιστο από τα προαναφερόμενα (Antoine et al. 2007). Η μέτρησή του περιλαμβάνει ουσίες όπως η TMA-N, η DMA-N, η NH_3 αλλά και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις που παράγονται από την βακτηριακή αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων, ενώ είναι ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης μέσω του προσδιορισμού της μεταβολικής τους δραστηριότητας (Gram & Huss 1996, Ólafsdóttir et al. 1997). Στην παρούσα μελέτη, το TVB-N στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, κατέγραψε 507.92 mg/ kg σάρκας καβουριού, την ημέρα απόρριψης η τιμή αυξήθηκε στα 1527.96 mg/ kg , ενώ στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας η ποσότητα αυτή έφτασε τα 2335.76 mg/ kg σάρκας καβουριού. Παρόμοιο προφίλ αύξησης παρουσίασε και το TMA-N καθ'όλη τη διάρκεια της συντήρησης, φθάνοντας τα επίπεδα των 1024.9±179.1mgKg^{-1} στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το TVB-Nκαι το TMA-Nμπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης των καβουριών. Αντίθετα, σύμφωνα με τους Sidhu et al.(1974) οι τιμές του TVB-N για τις καραβίδες υπό συνθήκες ψύξης (0^oc) κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, φτάνοντας στα 500 mg/kg την ένατη ($9^η$) ημέρα. Σε άλλο πείραμα των Sidhu et al.(1974), η τιμή του TVB-N σε καραβίδες αποθηκευμένες σε υψηλή θερμοκρασία (20^oc) ήταν πολύ υψηλή μόλις την τρίτη ($3^η$) ημέρα αποθήκευσης (3000 mg/kg). Άλλες μελέτες

(Losada et al. 2006, Aubourg et al. 2007) έδειξαν ότι η τιμή του TVB-N σε καρκινοειδή που συντηρούνται κάτω από 5°C, δεν ξεπερνά τα 500 mg/kg μετά από εννέα (9) ημέρες, ενώ σε συνθήκες συντήρησης υψηλών θερμοκρασιών, η τιμή του TVB-N είναι πολύ υψηλή από τις πρώτες μέρες συντήρησης (Boziaris et al. 2011, Losada et al. 2006).

Σε μελέτες που αφορούν τον προσδιορισμό του TVB-N στους ιχθύες, οι τιμές του TVB-N δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση, καταγράφοντας τιμές μέχρι και 20.16 mg N/100 g σάρκας ιχθύος (ημέρα 18), για ολόκληρους ιχθύες ιριδίζουσας πέστροφας, αποθηκευμένων στους 0 ^{o}C (Chytiri et al. 2004). Επίσης, το TVB-N που καταγράφηκε στη σάρκα των απεντερωμένων ιχθύων κουτσομούρας και ειδών μπαρμπουνιού, αποθηκευμένων στους 0 ^{o}C, είχε τιμές 12.23 και 19.49 mg N/100 g σάρκας ιχθύος για την κουτσομούρα και το μπαρμπούνι αντίστοιχα, ενώ στο πέρας της αποθήκευσης οι τιμές έφτασαν τα 47.19 και 43.97 mg N/100 g σάρκας ιχθύος, αντίστοιχα (Özyurt et al. 2009). Σε μια άλλη μελέτη, οι Papadopoulos et al. (2003) αναφέρουν πως το TVB-N δεν παρουσίασε σημαντική αύξηση για τους ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού που είχαν αποθηκευτεί στους 0 ^{o}C, μέχρι την ημέρα 16, ενώ για τους απεντερωμένους ήταν μεταβλητό.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. σχετίζονται με την παραγωγή TVB-N ως πρωτεολυτικά ψυχρότροφα που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες στα θαλασσινά, παράγοντας πτητικές ενώσεις αμμωνιακής φύσεως, που προκύπτουν από την απαμίνωση των αμινοξέων και άλλων πρωτεϊνικών ενώσεων (Dainty 1996). Οι Özyurt et al. (2009) υποστηρίζουν πως το TVB-N σχετίζεται θετικά με την αλλοίωση των ιχθύων (κουτσομούρα και κάποια είδη μπαρμπουνιού) και αποτελεί έναν καλό δείκτη ποιότητας, ενώ από τους Papadopoulos et al. (2003) και Castro et al. (2006) θεωρείται αναξιόπιστος δείκτης

ποιότητας, διότι δεν παρατηρείται καμιά μεταβολή στις τιμές του πριν τον χρόνο απόρριψης για ιχθύες όπως το λαβράκι το οποίο έχει αποθηκευτεί σε συνθήκες πάγου (0 ^{o}C). Το γεγονός αυτό συμφωνεί απόλυτα με την παρούσα εργασία.

Επιπρόσθετα, το pH, στην παρούσα μελέτη, κατέγραψε τιμή 7.14±0.02 στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, 7.35±0.10 την ημέρα απόρριψης ενώ δεν αυξήθηκε σημαντικά με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας καταγράφοντας τιμή 7.98±0.09. Η αύξηση του pH κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του καβουριού μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή TVB-N. Η ταχεία αύξηση και τα υψηλά επίπεδα του pH στους 10°C προκαλείται από την ταχύτερη παραγωγή TVB-N που συμβαίνει σε αυτή τη θερμοκρασία σε σχέση με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Cakli et al. (2006) σε απεντερωμένους ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού αποθηκευμένους στους 0 ^{o}C, αναφέρουν πως οι τιμές του pH στην έναρξη του πειράματος ήταν 6.41 ± 0.01 και 6.50 ± 0.02, αντίστοιχα, ενώ στο τέλος τους 14 ημερών οι τιμές έφτασαν τα 6.52 ± 0.02 και 6.57 ± 0.02, αντίστοιχα. Επίσης, οι Kyranaetal. (1997) αναφέρουν πως σε ολόκληρους ιχθύες τσιπούρας αποθηκευμένους σε συνθήκες πάγου (0 ^{o}C), η τιμή στην έναρξη του πειράματος ήταν 6.20 ± 0.05 και την ημέρα 24 η τιμή αυτή έφτασε τα 6.60 ± 0.03, ενώ οι Kyrana&Lougovois (2002) υποστηρίζουν πως το pH για ολόκληρους ιχθύες λαβρακιού υπό πάγο, ήταν 6.39 ± 0.04 (ημέρα 1) και στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης (ημέρα 12) η τιμή αυτή έφτασε τα 6.69 ± 0.04.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι προφανές ότι τα καβούρια και γενικότερα τα καρκινοειδή, καταγράφουν υψηλότερες τιμές TVB-N-άρα και pH- από τους ιχθύες καθ όλη την διάρκεια της συντήρησης γεγονός που οφείλεται στο γεγονός ότι στα καρκινοειδή, όταν πεθαίνουν, λαμβάνει χώρα μία ραγδαία αλλοίωση σε συντομότερο χρονικό διάστημα από ότι στα ψάρια.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αλλά και η υπάρχουσα βιβλιογραφία καταδεικνύουν πως υπό αερόβιες συνθήκες συντήρησης (10°c), οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν στα καβούρια, είναι τα Gram^{-} ψυχρότροφα, μη ζυμωτικά ραβδόμορφα βακτήρια. Έτσι, ο βακτηριακός πληθυσμός των καβουριών αποτελείται από βακτήρια *Pseudomonas spp.* και δευτερευόντως από υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια (Gram&Huss 1996), ενώ η παρουσία των Gram^{+} βακτηρίων, όπως τα *Brochothrixt hermosphacta* και τα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae,* είναι λιγότερο εμφανής ή και αμελητέα (Papadopoulos et al. 2003). Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία και παρατηρώντας το διάγραμμα 3.2 στο κεφάλαιο 3, κάθε μικροοργανισμός που αναλύθηκε, δεν συμβαδίζει σε κανένα σημείο των ημερών συντήρησης με την ΟΜΧ. Ο πλησιέστερος στην ΟΜΧ μικροοργανισμός (*Pseudomonas* spp) καταγράφει μία διαφορά της τάξης περίπου των 2 λογαρίθμων, γεγονός που οφείλεται πιθανών στην ύπαρξη και άλλων αλλοιογόνων μικροοργανισμών που δεν εξετάστηκαν. Συμπερασματικά η έρευνα χρήζει περαιτέρω εμβάθυνσης και επέκτασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση, λοιπόν τις μικροβιακές απαριθμήσεις και την οργανοληπτική αξιολόγηση, ο εμπορικός χρόνος ζωής των καβουριών του είδους *Callinectes Sapidus* αποθηκεύθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες συντήρησης των $10^{o}C$ είναι 6 ημέρες (144 h). Οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στη σάρκα του υπό εξέταση καρκινοειδούς είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., ακολουθούμενα από τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae, ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλότερους πληθυσμούς, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν ξεπέρασαν το όριο ανίχνευσης του1 log_{10} cfu/g, όντας σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Ως εκ τούτου, τα *Pseudomonas* spp. μπορούν να θεωρηθούν ως οι Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ) των καβουριών που προέρχονται από εύκρατα μεσογειακά ύδατα και έχουν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες συντήρησης.

Επιπλέον, η παραγωγή του Ολικού Βασικού Πτητικού Αζώτου (TVB-N) και του αζώτου της Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) στα πρώτα στάδια της αποθήκευσης είναι σχετικά χαμηλή, ενώ αυξάνεται ουσιαστικά από τα μέσα της αποθήκευσης, έχοντας πολύ υψηλή τιμή στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Συνεπώς το TVB-N και το TMA-N αποτελούν αξιόλογους δείκτες για την αποδοχή ή μη των μπλε καβουριών και επαρκούν για να χαρακτηρίσουν την νωπότητα των προϊόντων αυτών και να βοηθήσουν στην αξιολόγησή της. Αυτό, οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι οι τιμές τους μεταβάλλονται κατά το πρώτο ήμισυ του εμπορικού χρόνου ζωής, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δείκτες αλλοίωσης –απόρριψης, είτε ως δείκτες αξιολόγησης της νωπότητας στα μπλε καβούρια.

Επιπρόσθετα, η συντήρηση των καβουριών σε θερμοκρασία $10^{o}C$ δεν φαίνεται να είναι ένα μέσο για τη διατήρηση αυτών σε βάθος ημερών πριν την

επεξεργασία ή την κατανάλωση, ή τουλάχιστον δεν είναι η καλύτερη επιλογή. Ίσως αν τα καβούρια αποθηκεύονταν σε χαμηλή θερμοκρασία ή και ψύξη, να είχαν περισσότερο εμπορικό χρόνο ζωής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τόσο οι ενζυμικές όσο και οι χημικές αντιδράσεις, καθώς και η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνονται.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι γενικότερα τα καρκινοειδή και ειδικότερα τα καβούρια, σε υψηλές θερμοκρασίες (όπως στην παρούσα εργασία) έχουν εμπορικό χρόνο ζωής και είναι κατάλληλα για κατανάλωση όσο βρίσκονται εν ζωή κατά την διάρκεια της συντήρησης, διότι από τα πρώτα στάδια της θνησιμότητάς τους έχει παρατηρηθεί ραγδαία ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, που καθιστούν το προϊόν ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΒΙΒΙΟΓΡΑΦΙΑ

❖ ΈΝΤΥΠΗ

- **Akpan, E. J. 1997**. Proximate composition of edible blue crab Callinectus sapidus. J. Food Sci. Technol., 34, (1), 59-60.
- **Ashie I. N. A., Smith J. P., Simpson B. K. 1996** Spoilage and self-life extension of fresh fish and shelfish. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36 (1–2): 87– 121.
- **Baird-Parker A. C. and Davenport E., 1965**, J. Appl. Bacteriol., 28:390.
- **Bonzek C., Fegley L., Hoenig J., Miller T., O'Reilly R., Orner D., Sharov A., Terceiro M., and Vaughan D. 2005**. Chesapeake Bay Blue Crab Advisory Report. Chesapeake Bay Stock Assessment Committee.
- **Boziaris, I. S. and Parlapani, F. F. 2014**. Microbiological examination of seafood. In: Seafood Processing. Technology, Quality & Safety. Edited by BoziarisI.S. IFST Advances in Food Science Series Wiley-Blackwell. 387-418
- **Boziaris, I., Kordila, A., Neofitou, C. 2011**. Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures. International Journal of Food Science and Technology 46. 887-895.
- **Brylawski, B.J., Miller, T.J., 2006**. Temperature-dependent growth of the blue crab (Callinectes sapidus): a molt process approach. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic sciences, 63: 1298-1308.
- **Bunnell, D.B, T.J. Miller., 2005.**An individual-based modeling approach to spawning-potential pre-recruit models: an application to blue crab (Callinectes sapidus) in Chesapeake Bay. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 62: 2560–2572.

- **Churchill, E.P., Jr., 1919**. Life history of the blue crab. Bulletin of the Bureau of Fisheries, 36: 95-128
- **Dalgaard P. 1995** Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. International Journal of Food Microbiology, 26: 319-333.
- **Enzeross, R., Enzeross, L., & Bingel, F., 1997**. Occurrence of the blue crab, Callinectes sapidus (Rathbun, 1896) (Crustacea, Brachyura) on the Turkish Mediterranean and the adjacent Aegean coast and its size distribution in the bay of Iskenderun. Turkish Journal of Zoology, 21: 113-1222.
- **Ferreira, L.S., D'Incao, F., 2008**. Growth of Callinectes sapidus (Crustacea, Decapoda, Portunidae) in the estuary of the Patos Lagoon, RS, Brazil. Iheringia Serie Zoologia, 98: 70-77.
- **Farragut, R. N.1965**,, Proximate composition of Chesapeake Bay blue crab (Callinectes sapidus). J. Food Sci. 30, 538-544
- **Gennari, M., and F. Dragotto 1992.** A study of the incidence of different fluorescent Pseudomonas species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. J. Appl. Bacteriol. 72:281–288.
- **Gill C. D., Molin G. 1991**. Modified atmospheres and vacuum packaging. In: Russell N.S., Gould G.W. (eds.) Food preservatives. Blackie and Son Limited, Glasgow, London, pp. 172-199.
- **Gram L., Huss H.H. 1996**. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology, 33: 121-137
- **Gram L., Dalgaard P. 2002**. Fish spoilage bacteria: Problems and solutions. Current Opinion in Microbiology, 13: 262-266

- **Grigorakis K., Alexis M., 2005**, Effects of fasting on the meat quality and fat deposition of commercial-size farmed gilt-head bream (Sparus aurata L.) fed different dietary regimes., Aquaculture Nutrition, 11(5): 341-344
- **Grodner, R.M. and Andrews, L.S. 1991**. Irradiation, Ch. 17 in Microbiology of Marine Food Products, D.R.Ward and C. Hackney (Ed.), p. 429–440.
- **Harper W.J. 2001**. The strengths and weaknesses of the electronic nose. Adv. Exp. Med. Biol. 488: 59-71.
- **Holthuis, L.B., 1961**. Report on a collection of Crustacea Decapoda and Stomatopoda from Turkey and the Balkans. Zoologische Verhandelingen, Leiden, 47: 1-67.
- **Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. 1998**. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. Journal of Bacteriology, 180: 4765-4774.
- **Huis in't Veld J. H. J. 1996**. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology, 33: 1-18.
- **Ingham, S.C. and Moody, M.W. 1990**. Enumeration of aerobic plate counts and E. coli during blue crab processing by standard methods, Petri-film, and Redigel. J. Food Prot. Vol. 53(5): 423–424.
- **Jensen, O.P., 2004**. Spatial ecology of blue crab (Callinectes sapidus) in Chesapeake Bay. University of Maryland, 166 pp
- **Jorgensen B.R., Huss H.H. 1989**. Growth and activity of Shewanella putrefaciens isolated from spoiling fish. International Journal of Food Microbiology, 9: 51–62.
- **Lopez, A.; Williams, H. L.. Ward, D. R.1981**, Essential elements in raw, boiled, steamed, and pasteurized crabmeat. J. Food Sci., 46, 1128-1131

- **Pancucci-Papadopoulou A., Kevrekidis, K., Corsini, M. & Simboura, N., 2005.**Changes in species: invasion of exotic species. pp. 336-342. In: 'SoHelME. State of the Hellenic marine environment'. E. Papathanassiou & A. Zenetos (Eds). HCMR Publications, Athens
- **Parlapani F.F., Meziti A., Kormas Ar.K. & I.S. Boziaris (2013)**. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology* 33, 85-89.
- **Parlapani F.F., Malouchos A., HaroutounianS.A. & I.S. Boziaris (2014).** Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during**s**torage of sea bream fillets under various conditions.*International Journal of Food Microbiology* 189, 153–163.
- **Parlapani F.F., Kormas K.Ar. & I.S. Boziaris (2015).**Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis.'*Journal of the Science of Food and Agriculture*' DOI 10.1002/jsfa.6957
- **Parlapani F.F., HaroutounianS.A., Nychas G-J.E & I.S. Boziaris (2015a).** Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2°C. *Food Microbiology 50, 44-53.*
- **Parlapani F.F., Verdos G.I., Haroutounian S.A. & I.S. Boziaris (2015b)**.The dynamics of *Pseudomonas* and volatilome during the spoilage of gutted sea bream stored at 2°C. *Food Control 55, 257-265.*
- **Serbetis, C., 1959**. Un nouveau crustace comestible en Mer Egge Calinectes sapidus Rathbun (Decapoda Brach.). Proceedings General Fisheries Council Mediterranean, 5: 505-507
- **Smith, R.; Nickelson, R.; Martin, R.; Finne, G. 1984.**Bacteriology of indole production in shrimp homogenates held at different temperatures. J. Food Prot. 47, 861.

- **Spink, A.; Goodrum, A.; Veciana-Nogues, M. T.; Albala-Hurtado, M. S.; IzquierdoPulido, M. 1996.**Vidal-Carou, M. C., Validation of a gas-chromatographic method for volatile amine determination in fish samples. Food Chem., 57, 569-573.
- **Suyama, M 1987. Konosu, A.,** Postmortem changes of fish and shellfish, in Marine Food Science (Suison Shokuhin-Gaku). Koseisha, Koseikaku: Tokyo,
- **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: 65-72.
- **Ward D.M., Weller R., Bateson M. M. 1990** 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature (London), 345: 63–65.
- **Κεβρεκίδης, Κ., 2010**. Callinectes sapidus (Decapoda, Brachyura): έναλλόχθονοείδοςστονΘερμαϊκόκόλπο. ΑλιευτικάΝέα, 340: 44-49

❖ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ

- http://kpe-kastor.kas.sch.gr (http 1)
- http://www.vims.edu/ (http 2)
- http://www.ciesm.org.atlas (http 3)
- http://www.etanal.gr (http 4)
- http://www.iatronet.gr (http 5)