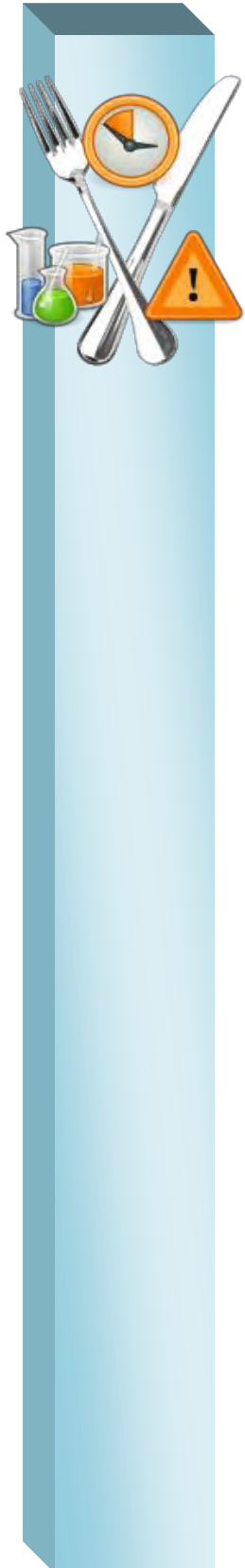




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ποιοτικές αλλαγές και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων τσιπούρας
(*Sparus aurata*) μαριναρισμένων με κιτρικό οξύ συντηρούμενων σε
συσκευασία κενού υπό ψύξη»**

ΠΑΠΑΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΒΟΛΟΣ, 2017

«Ποιοτικές αλλαγές και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*) μαριναρισμένων με κιτρικό οξύ συντηρούμενων σε συσκευασία κενού υπό ψύξη»

Διμελή 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 Πολύμερος (M.Sc., Δρ.)**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εμπορία και Πολιτική Αγροτικών και Αλιευτικών Προϊόντων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα μεγάλο, επίπονο, κοπιαστικό μα συνάμα εντυπωσιακό, ευχάριστο και βαθυστόχαστο ταξίδι στο χώρο της γνώσης και στο ναό της ελευθερίας της έκφρασης τελειώνει με την ολοκλήρωση, εκπόνηση και παρουσίαση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, μα ένα άλλο, πιο σημαντικό αρχίζει. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς 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. Κωνσταντίνος Πολύμερος, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους, καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ Σωτήρη Οικονόμου, για την άμεση και αμειωμένη βοήθειά του, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την αμέριστη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, 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.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλλοίωση στα νωπά αλιευτικά προϊόντα οφείλεται στη μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Ο βαθμός αλλοίωσης των προϊόντων προσδιορίζεται με οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεθόδους.

Σε φιλέτα ψαριού που έχουν μεταχειριστεί με κιτρικό οξύ και αποθηκεύονται σε χαμηλή θερμοκρασία, η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνεται. Φιλέτα τσιπούρας (*Sparus aurata*), από υδατοκαλλιέργεια ελληνικών υδάτων, συλλέχθηκαν για οργανοληπτικές, και μικροβιολογικές αναλύσεις κατά τη διάρκεια των 40 ημερών αποθήκευσης υπό συνθήκες κενού και ψύξης στους $2 \pm 1^{\circ}\text{C}$ αφού είχαν μαριναριστεί. Οι τιμές του pH παρουσίασαν μείωση λόγω του μαριναρίσματος φθάνοντας στην τιμή 4.35 ενώ αυξήθηκαν ελάχιστα στην τιμή 4.5 μέχρι το τέλος του πειράματος. Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί όπου πιθανών είναι και οι υπαίτιοι για την αλλοίωση των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας, κατά το πέρας της περιόδου αποθήκευσης. Τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H_2S), καθώς και τα *Pseudomonas* spp, αποτέλεσαν μέρος του βακτηριακού πληθυσμού, αλλά οι πληθυσμοί τους ήταν μικρότεροι από τα οξυγαλακτικά. Τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδωσε τον βαθμό 5, δηλαδή 'άριστο' την 1η ημέρα. Την 8η και την 17η ημέρα έδωσε τους βαθμούς 4,6 και 4,2 αντίστοιχα, δηλαδή 'πολύ καλό', την 24η ημέρα έδωσε βαθμό 3,2, δηλαδή 'μέτριο-αποδεκτό'. Τις δυο τελευταίες ημέρες, την 32η και 40η ημέρα, έδωσε τον βαθμό 1,8 και για τις δυο, δηλαδή 'μη αποδεκτό'. Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας, που είχαν μαριναριστεί με κιτρικό οξύαποθηκευμένα υπό ψύξη, είναι 24 ημέρες, ενώ ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης είναι 32 ημέρες.

Λέξεις-κλειδιά: Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), Εμπορικός χρόνος ζωής, μαρινάρισμα, Κιτρικό Οξύ

ABSTRACT



The spoilage of fresh fishery products is due to the metabolic activity of the spoilage microorganisms. The degree of spoilage is determined by organoleptic, microbiological and chemical methods.

In fish fillets that have been marinated in citric acid and stored at low temperature, under vacuum microbial growth is inhibited. Gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) from a Greek aquaculture company were harvested and the marinated fillets were analyzed for organoleptic and microbiological parameters during 40 days of vacuum storage under refrigeration conditions at 2 ± 1 ° C. The pH values decreased due to marination, down to 4.35. The pH was slightly increased up to 4.5 at the end of the experiment. Lactic acid bacteria (MRS) were the predominant microorganisms and presumably spoiled the product at the end of the storage period. Hydrogen sulfide-producing bacteria (H_2S), as well as *Pseudomonas* spp, were also part of the dominant bacterial population, but their populations were lower than the previous bacteria. Bacteria of the Enterobacteriaceae family were below the limit of detection throughout experiment.

The organoleptic assessment gave grade 5, 'excellent' on the first day. On the 8th and 17th day he scored points 4,6 and 4,2 respectively, ('very good'), on the 24th day he gave a grade of 3.2, (acceptable)'. In the last two days, 32 and 40 days, he gave the grade 1.8 for both, meaning 'non-acceptable'. The results of the study show that commercial shelf-life of marinated fillets of sea bream, stored under vacuum and refrigeration was 24 days, while the organoleptic rejection time was 32 days.

Keywords: *Sparus aurata*, Specific spoilage organisms (SSO), shelf- life, margination, citric acid

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
 ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Γενικά στοιχεία για τις υδατοκαλλιέργειες.....	8
1.2 Στοιχεία βιολογίας ιχθύων τσιπούρας	9
1.3 Διατροφική αξία ιχθύων.....	9
1.4 Διατήρηση και παράταση της διάρκειας ζωής	10
1.4.1 Γενικά.....	10
1.4.2 Βάσεις για την συντήρηση τροφίμων.....	11
1.4.3 Βασικές τεχνικές διατήρησης τροφίμων	11
1.4.4 Μικροβιακή αλλοίωση.....	13
1.4.5 Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί.....	17
1.5 Συντήρηση ιχθύων υπό κιτρικό οξύ.....	20
1.6 Σκοπός εργασίας.....	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Γενικά.....	23
2.2 Μικροβιολογική αξιολόγηση.....	24

2.3	Μέτρηση pH.....	31
2.4	Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	32
2.5	Παρασκευή μαρινάδας και μαρινάρισμα φιλέτου.....	32
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
3.1	Οργανοληπτική ανάλυση.....	34
3.2	Μικροβιολογική σύνθεση.....	37
3.3	Ανάλυση pH.....	39
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	46
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47
6.1	Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	47
6.2	Ελληνική βιβλιογραφία.....	50
6.3	Ηλεκτρονική βιβλιογραφία.....	50

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τις υδατοκαλλιέργειες

Σύμφωνα με τον FAO (2010) οι υδατοκαλλιέργειες είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος παραγωγικός τομέας τροφίμων στον κόσμο: από το 1 εκατομμύριο τόνους ετήσια παραγωγή το 1950, έφτασε τους 52,5 εκατομμύρια τόνους το 2008, αξίας 98,4 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Η συνεισφορά τους στην κατά κεφαλήν κατανάλωση υδρόβιων ζωικών τροφίμων αυξήθηκε από τα 0,7 kg/m³ το 1970 στα 7,8 kg/m³ το 2008, που αντιστοιχεί σε ετήσια αύξηση 6,6 %. Στην παράγωγή αυτή επικεφαλής είναι οι χώρες της Ασίας και του Ειρηνικού με ποσοστό που φθίνει σε τόνους το 89% της ολικής παράγωγης και σε αξία το 79%. Το μεγαλύτερο ποσοστό κατέχει η Κίνα, που παράγει το 62% της συνολικής παράγωγης σε τόνους και το 59% της συνολικής αξίας (FAO, 2010a).

Μια μεγάλη ποικιλία φυτών και ζώων παράγονται σήμερα από τις υδατοκαλλιέργειες. Πιο αναλυτικά, οι υδατοκαλλιέργειες περιλαμβάνουν την εκτροφή ψαριών, καρκινοειδών, μαλακίων και άλλων υδρόβιων ζωικών οργανισμών καθώς και την καλλιέργεια υδρόβιων φυτών.

Ο ορός θαλασσοκαλλιέργεια αναφέρεται στην υδατοκαλλιέργεια, η οποία εφαρμόζεται αποκλειστικά στο θαλασσίνο περιβάλλον. Σε αντίθεση με την αλιεία οι υδατοκαλλιέργειες υποδηλώνουν την εκτροφή υδρόβιων οργανισμών κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.

Η παράγωγή των καλλιεργούμενων υδρόβιων φυτών είναι σχετικά πρόσφατη, παρουσιάζει, όμως, σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια. Σύμφωνα με τον FAO το 2008 έφτασε τους 5,8 εκατομμύρια τόνους αξίας 7,4 δισεκατομμυρίων δολαρίων, επιβεβαιώνοντας και αυτή την ανοδική της πορεία που από το 1970 αυξήθηκε κατά 7,7% ετησίως.

Η Ελλάδα ξεκίνησε νωρίς την προσπάθεια ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών από το 1951. Τη χρονιά αυτή πραγματοποιήθηκε εισαγωγή αυγών γιός εκκόλαψη της ιριδίζουσα πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) στον ιχθυογενετικό σταθμό του ποταμού Λούρου, στο Χάνι του Τερόβου, με σκοπό τον εμπλουτισμό των ορεινών προϊόντων υδάτων και τη διάδοση της τεχνολογίας της εκτροφής.

1.2 Στοιχεία βιολογίας ιχθύων τσιπούρας

Οι ιχθύες παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατροφή του ανθρώπου δια μέσου των αιώνων. Οι ιχθύς παρουσιάζονται με διάφορους τρόπους, όπως ως θεότητες, θρησκευτικά σύμβολα ακόμα και ως αντικείμενα τέχνης, σε βιβλία και σε ταινίες.

Οι ιχθύες αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ομοταξίες σπονδυλωτών ζώων που μπορούμε να συναντήσουμε στο υδάτινο οικοσύστημα. Ο όρος "ψάρι" περιγράφει με ακρίβεια κάθε μη τετράποδο με κρανίο (δηλαδή ένα ζώο με κρανίο και στις περισσότερες περιπτώσεις σπονδυλική στήλη) που έχει βράγχια καθ' όλη τη ζωή και των οποίων τα άκρα, αν υπάρχουν, έχουν σχήμα πτερυγίων (Nelson et al. 2006).

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (**Εικόνα 1.2.1**) είναι είδος που συναντάται κυρίως στην Μεσογείου θάλασσα και ένα από τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές και ελληνικές υδατοκαλλιέργειες (Κλαουδάτος Σ. Δ. και Κλαουδάτος Δ. Σ., 2012). Είναι ίσως από τα πρώτα θαλάσσια είδη των ιχθύων της Μεσογείου στα οποία έχει εφαρμοστεί επιτυχώς η εντατική ελεγχόμενη μαζική εκτροφή, της οποίας η έναρξη χρονολογείται από τις αρχές περίπου της δεκαετίας του 1989 στην Ιταλία, στη Γαλλία και στην Ισπανία (Παπουτσόγλου, 2008).



Εικόνα 1.2.1 Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

1.3 Διατροφική αξία ιχθύων

Η πρόσληψη της τροφής είναι μια βιοτική διαδικασία για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Με τον τρόπο αυτόν ο οργανισμός αποκομίζει την απαιτούμενη ενέργεια που χρειάζεται για την επιβίωση του. Την ενέργεια αυτή, την αποκομίζει από την διάσπαση των θρεπτικών στοιχείων που περιέχει το τρόφιμο. Τα τρόφιμα μπορεί να είναι προϊόντα πρωτογενούς παράγωγης ή προϊόντα που προέχονται από την επεξεργασία τους. Τα θρεπτικά στοιχεία των τροφίμων αποτελούνται από τις

πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες, τις βιταμίνες, τα λίπη και τα ανόργανα στοιχεία. Πιο συγκεκριμένα η ενέργεια που χρειάζεται ο οργανισμός λαμβάνεται με τη διάσπαση των λιπών και των υδατανθράκων. Ένα μέρος της ενέργειας, την χρησιμοποιεί για την ανάπτυξη και τη συντήρηση του οργανισμού καθώς επίσης και για την ρύθμιση βασικών λειτουργιών του με τη συμβολή των πρωτεϊνών, των αλάτων και των βιταμινών (Μπλούκας, 2004).

Οι ιχθύες θεωρούνται μια πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών στη διατροφή του ανθρώπου. Η σημασία της αλυσίδας των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, την οποία την συναντάμε μόνο σε αλιευτικά προϊόντα, έχει κερδίσει την προσοχή των ανθρώπων λόγω της πρόληψης που μπορεί να παρέχει τόσο σε καρδιολογικές ασθένειες όσο και σε εγκεφαλικά επεισόδια (Domingo, 2007). Εκτός από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, των οποίων τα οφέλη είναι γνωστά στο ευρύ κοινό, περιέχουν και μια ποικιλία βιταμινών (B₁₂ και D), καθώς και ιχνοστοιχεία (Ιώδιο, I και Σελήνιο, Se) που είναι αναγκαία για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού (Leduc *et al.*, 2012).

1.4 Διατήρηση και παράταση της διάρκειας ζωής

1.4.1 Γενικά

Όλα τα τρόφιμα που υπάρχουν γύρω μας διατίθενται με μια συγκεκριμένη διάρκεια ζωής όπου μπορούν να καταναλωθούν δίχως να προκαλέσουν κάποιο πρόβλημα στον καταναλωτή. Ο χρόνος αυτός μπορεί να κυμαίνεται από ώρες, μέχρι και δεκαετίες ανάλογα την σύσταση τους και φυσικά τον τρόπο συντήρησής τους.

Σε όλα τα τρόφιμα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους υποβαθμίζονται με τον χρόνο συντήρησης. Η αλλοίωση ή οι άλλες αλλαγές που υπόκεινται οι οποίες οδηγούν σε απώλεια του χρόνου ζωής μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε από τα πολλά στάδια μεταξύ της απόκτησης πρώτων υλών μέχρι και την κατανάλωσης του τελικού προϊόντος. Αυτό μπορεί να εξαρτηθεί σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο τροφής, την σύνθεση (για τα παρασκευασμένα τρόφιμα), τις συνθήκες συσκευασίας και κυρίως αποθήκευσης-συντήρησης. Οι κύριες αντιδράσεις που οδηγούν στην αλλοίωση, είναι γνωστές και σχετικά λίγες. Αυτές είναι χημικές, ενζυμικές μικροβιολογικές (Huis in't Veld, 1996).

Οι περισσότερες τεχνικές συντήρησης στοχεύουν στον έλεγχο όλων των μορφών αλλοίωσης που μπορεί να συμβούν, ωστόσο στα νωπά ή ελαφρά επεξεργασμένα

τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως τα αλιευτικά προϊόντα, προτεραιότητα είναι πάντα η ελαχιστοποίηση οποιασδήποτε ανάπτυξης μικροοργανισμών.

1.4.2. Βάσεις για την συντήρηση τροφίμων

Η διατήρηση βασίζεται στην καθυστέρηση ή στην πρόληψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να κατανοήσουμε τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Αυτοί οι παράγοντες δεν είναι πολυάριθμοι. Περιλαμβάνουν έναν αριθμό ουσιαστικά φυσικών παραγόντων. Αυτοί οι παράγοντες έχουν κατηγοριοποιηθεί με ποικίλους τρόπους, αλλά οι πιο διαδεδομένες ευρέως κατηγοριοποιήσεις (Mossel 1983, Huis in't Veld, 1996) διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: εγγενείς, εξωγενείς, επεξεργασίας, και σιωπηρούς.

1.4.3 Βασικές τεχνικές διατήρησης τροφίμων

Όλες οι βασικές τεχνικές συντήρησης τροφίμων που χρησιμοποιούνται βασίζονται σε ένα σχετικά περιορισμένο σύνολο παραγόντων, έτσι ώστε η περιοχή τους να είναι αναγκαστικά περιορισμένη, επίσης. Συνοψίζονται στον Πίνακα 1 με τέτοιο τρόπο ώστε να υπογραμμίζεται το γεγονός ότι οι περισσότερες από τις τεχνικές λειτουργούν κυρίως με παραμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης ή με πλήρη αδρανοποίηση (θανάτωση) των μικροοργανισμών.

Οι νεότερες τεχνικές, ανταποκρινόμενες στις ανάγκες των καταναλωτών, που περιλαμβάνουν πιο φυσικές προσεγγίσεις (π.χ. συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, χρήση προστατευτικών καλλιεργειών, χρήση βακτηριοκινών και άλλων προϊόντων καλλιέργειας και ενζύμων). Σε αντίθεση με τις τεχνικές παρεμπόδισης, μερικές από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες δρουν κυρίως με αδρανοποίηση των μικροοργανισμών-στόχων. Εντούτοις, είναι ενδιαφέρον ότι, οι περισσότερες από τις νεότερες ή αναδυόμενες τεχνικές δρουν με άμεση αδρανοποίηση των μικροοργανισμών, π.χ. α) ακτινοβολία β) εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης, γ) ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης (ηλεκτροδιάτρηση), δ) υπερήχους σε συνδυασμό με αυξημένη θερμοκρασία και ελαφρώς αυξημένη πίεση (μανοθερμοσονίαση) και ε) προσθήκη βακτηριολυτικών ενζύμων (π.χ. λυσοζύμη) ή άλλων αντιμικροβιακών (π.χ. νισίνη).

Πίνακας 1 Υπάρχουσες και αναδυόμενες αντιμικροβιακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση των τροφίμων και την επίτευξη των επιθυμητών χρόνων ζωής.

Τρόπος δράσης	Παράγοντας διατήρησης	Μέθοδος
Μείωση ή αναστολή της αύξησης	Χαμηλή θερμοκρασία	Ψύξη και κατεψυγμένη αποθήκευση
	Χαμηλή ενεργότητα νερού	Ξήρανση, σκλήρυνση και συντήρηση
	Περιορισμός της διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών	Διαμερισματοποίηση σε γαλακτώματα νερού σε λάδι
	Χαμηλό οξυγόνο	Συσκευασία κενού και αζώτου
	Αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα	Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας
	Οξύνιση	Προσθήκη οξέων: ζύμωση
	Αλκοολική μαρμαρυγή	Ζυθοποιία, Οινοποιία, Οχύρωση
	Χρήση συντηρητικών	Προσθήκη συντηρητικών: ανόργανα (θειώδη, νιτρώδη) Οργανικά (προπιονικά, σορβικά, βενζοϊκά, παραμπέν). Αντιβιοτικό (νισίνη, ναταμυκίνη)
Απενεργοποίηση μικροοργανισμών	Θέρμανση	Παστερίωση και αποστείρωση
	Ακτινοβολία	Ιονίζουσα ακτινοβολία
	Πίεση	Εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης
	Ηλεκτροδιάτρηση	Ηλεκτρική εκφόρτιση υψηλής τάσης
	Μανοθεραπεία	Θέρμανση με υπερήχους σε ελαφρώς αυξημένη πίεση
	Λύση κυττάρων	Η προσθήκη βακτηριολυτικών ενζύμων (λυσοζύμης)

Προσαρμογή από Gould (1989)

Οι κύριες και πιο συνηθισμένες τεχνικές διατήρησης που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την πρόληψη ή την καθυστέρηση της αλλοίωσης είναι η μείωση της θερμοκρασίας, η μείωση του pH, η μείωση της ενεργότητας νερού και η εφαρμογή θερμότητας. Αυτές όπως και άλλες τεχνικές χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε συνδυασμό με την καλύτερη χρήση της τεχνολογίας συντήρησης ή εμποδίων (Leistner, 1995). Οι τεχνολογίες αυτές αναμένεται ευρέως ότι θα βρουν αυξανόμενη εφαρμογή στο μέλλον. Η ανάπτυξη πολλών από τα πλέον χρησιμοποιούμενα συνδυαστικά εμπόδια έγινε βάση της εμπειρίας, η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους έχει επεξεργαστεί μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις και οδηγεί ήδη σε μια πιο ορθολογική προσέγγιση της διατήρησης των τροφίμων, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

1.4.4 Μικροβιακή αλλοίωση

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες (Gram & Dalgaard, 2002). Η μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα εκδηλώνεται με αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (όσφρηση, γεύση και γενική εμφάνιση) εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών (Gill, 1986). Η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών (Ashie *et al.*, 1996), καθώς και άλλες αντιδράσεις (οξειδωση-τάγγιση λιπών, αντιδράσεις ενδογενών ενζύμων, αυτόλυση μυϊκών κυττάρων) είναι υπεύθυνες για την αρχική απώλεια της νωπότητας (Li *et al.*, 2012). Οι μικροοργανισμοί αυτοί που λαμβάνουν μέρος στην αλλοίωση προέρχονται από την αρχική μικροβιακή σύνθεση καθώς επίσης και από την επιμόλυνση (μίανση).

Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσής τους. Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix thermosphacta* (Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996). Η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της τροπικής ζώνης, αποτελείται κυρίως από θετικά κατά

Gram βακτήρια (*coryneforms*, *Micrococcaceae*) και *Enterobacteriaceae* (Wood 1953, Gillespie & Macrae 1975, Shewan 1977, Liston 1980, Gram 1990), αλλά σε αρκετές περιπτώσεις είναι παρόμοια με τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων των εύκρατων κλιμάτων (Colwell & Liston 1962, Gram et al. 1990).

Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ποικιλομορφία και η αφθονία του βακτηριακού πληθυσμού ενός ιχθύος εξαρτάται από το περιβάλλον στο οποίο έχει αλιευθεί και όχι από το είδος, ενώ η αρχική ποιότητα των αλιευμάτων επηρεάζεται από το είδος, τις εποχιακές-βιολογικές αλλαγές, τις συνθήκες εκτροφής και τις τεχνικές αλίευσης (Erkan & Özden, 2008).

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που συμβάλλουν στην μικροβιακή πολυπλοκότητα των αλιευμάτων είναι (Gram and Huss, 1996):

1. Ειδική ή μη μόλυνση του ψαριού από το περιβάλλον ή την επεξεργασία,
2. Συνθήκες που οφείλονται σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (T, pH, Eh, a_w , μικροβιακές αλληλεπιδράσεις),
3. Ποικιλόθερμη φύση των ιχθύων,
4. Υψηλό pH (>6.0) της μεταθανάτιας σάρκας,
5. Ποσοστό μη πρωτεϊνικού αζώτου,
6. Παρουσία οξειδίου τριμεθυλαμίνης (TMAO).

Όταν οι οσμές και το άρωμα του ψαριού περιγράφονται ως ουδέτερα έχουμε τις πρώτες ενδείξεις. Αυτό σταδιακά θα γίνει πιο έντονο και θα οδηγήσει σε απόρριψη. Ο χρόνος για την αλλοίωση εξαρτάται από τη θερμοκρασία αποθήκευσης και το είδος του ψαριού (**Πίνακας 1.4.4.1**). Μετά το πέρας του χρόνου, το μικροβιακό φορτίο οξύνεται με αποτέλεσμα οι μεταβολές που προκαλούν οι μικροοργανισμοί να είναι πλέον αντιληπτές και έτσι η υποβάθμιση της ποιότητας να οφείλεται κυρίως σε αυτές. (**Σχήμα 2.1**)

Πίνακας 1.4.4.1.Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων

Μικροβιακή δραστηριότητα	Οργανοληπτική εκδήλωση
Αποικοδόμηση συστατικών του τροφίμου	Παραγωγή δυσάρεστων οσμών
Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαρτικού υλικού	Σχηματισμός “βλέννας”
Ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων	Ορατές οσμές ή άχρωμες αποικίες
Διοξείδιο του άνθρακα CO ₂ από υδατάνθρακες ή αμινοξέα	Παραγωγή αερίου
Παραγωγή χρωστικών που διαχέονται	Αποχρωματισμός-Αλλαγή χρώματος

(Προσαρμογή από Gram and Huss, 1996).

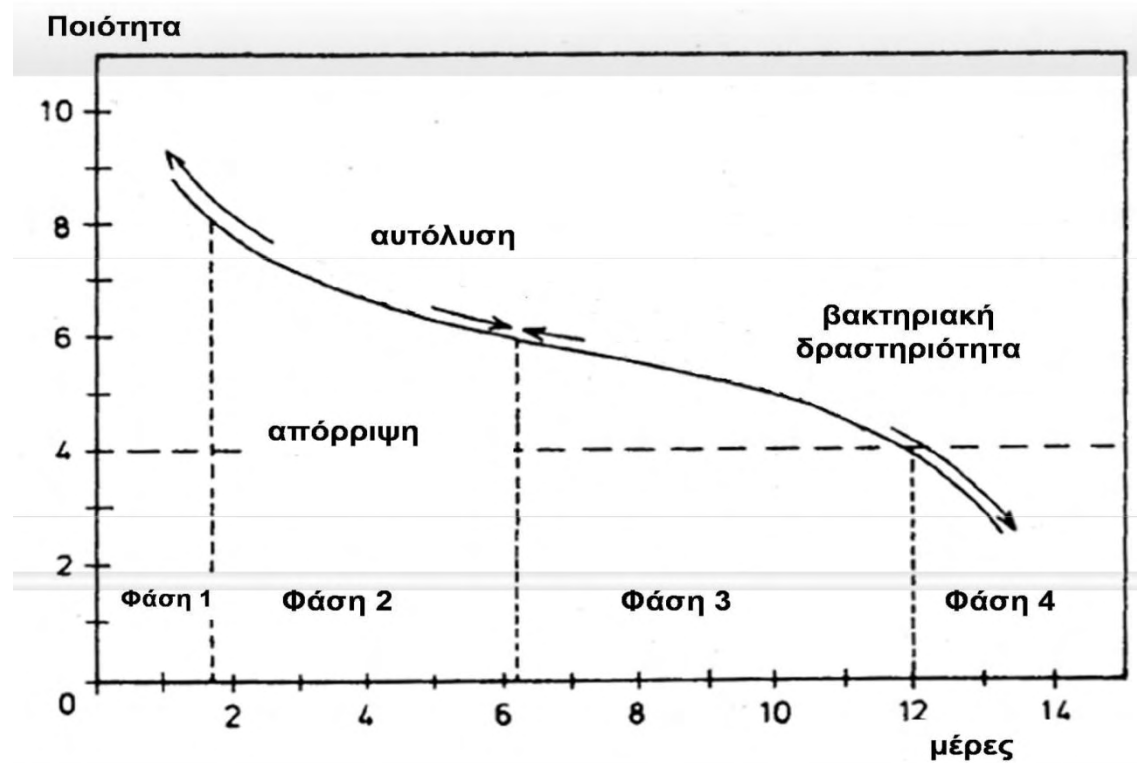
Ο χρόνος ζωής ενός νωπού ιχθύος, όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 4 φάσεις (Huss, 1995): **(Σχήμα2.1)**

Φάση1: Ο ιχθύς είναι πολύ φρέσκος, μυρίζει θάλασσα και έχει μια σχετικά γλυκιά, μεταλλική και εκλεπτυσμένη γεύση.

Φάση2: Πραγματοποιείται απώλεια της εκλεπτυσμένης γεύσης και του αρώματος του ,δεν υπάρχουν όμως άσχημες οσμές, ενώ η υφή του είναι καλή.

Φάση3: Αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές διάφορες οσμές, λόγω της παραγωγής τριμεθυλαμίνης (TMA). Κατόπιν αρχίζουν να αναπτύσσονται οσμές αμμωνιακές,

Φάση4: Τα ψάρια μπορούν να χαρακτηριστούν ως αλλοιωμένα και απορρίπτονται.



Σχήμα 2.1. Στάδια υποβάθμισης της ποιότητας των νωπών ιχθύων συντηρημένων σε πάγο. Το επίπεδο απόρριψης ορίζεται με την οριζόντια διακεκομμένη γραμμή που περνά από τις 4 φάσεις του κατακόρυφου άξονα (προσαρμοσμένο από Huss 1995).

Τα φρέσκα ψάρια μπορούν να επιμολυνθούν από μια ποικιλία μικροοργανισμών που μπορεί να προέρχονται τόσο από περιοχές της διαβίωσής τους όσο και της μεταποίησης τους. Οι πηγές που μπορούν να επιμολυνθούν αποτελούνται από το φυσικό τους περιβάλλον, τον άνθρωπο, τον εξοπλισμό και τις επιφάνειες επεξεργασίας (Jay *et al.*, 2010). Οι ιχθύες οι οποίοι προέρχονται από μολυσμένα ύδατα φέρουν μεγάλους αριθμούς βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (Huss, 1995). Ο άνθρωπος μπορεί να επιμολύνει τα τρόφιμα με παθογόνα βακτήρια όπως το *Staphylococcus aureus* του οποίου πολλές φορές είναι φορέας και με εντερικά παθογόνα λόγω έλλειψης ορθής υγιεινής πρακτικής. Επιπλέον, άλλοι μικροοργανισμοί όπως είναι το *Listeria monocytogenes* έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται στις επιφάνειες επεξεργασίας και να δημιουργούν βιοϋμένια.

Η επαφή των προϊόντων με τις επιφάνειες αυτές κατά την επεξεργασία τους έχει ως αποτέλεσμα την επιμόλυνση τους. Κατά τη συντήρηση, μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση τους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως Ειδικοί

Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη. Η επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν το μικρό αυτό κλάσμα εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα (Leisner & Gram 1999, Dalgaard 2003).

Το μη πρωτεϊνικό-άζωτο (NPN) από ένα κομμάτι της σάρκας του ψαριού που αποτελείται από χαμηλού μοριακού βάρους υδατοδιαλυτές ενώσεις που περιέχουν άζωτο όπως ελεύθερα αμινοξέα και νουκλεοτίδια και είναι άμεσα διαθέσιμο για βακτηριακό υπόστρωμα ανάπτυξης. Η αποσύνθεση του θείου που περιέχει αμινοξέα κυστεΐνη και η μεθειονίνη είναι ιδιαίτερα σημαντική στην αποσύνθεση, δεδομένου ότι προκαλεί οσμές και γεύσεις λόγω σχηματισμού υδρογόνου σουλφίδια (Herbert και Shewan, 1975, 1976).

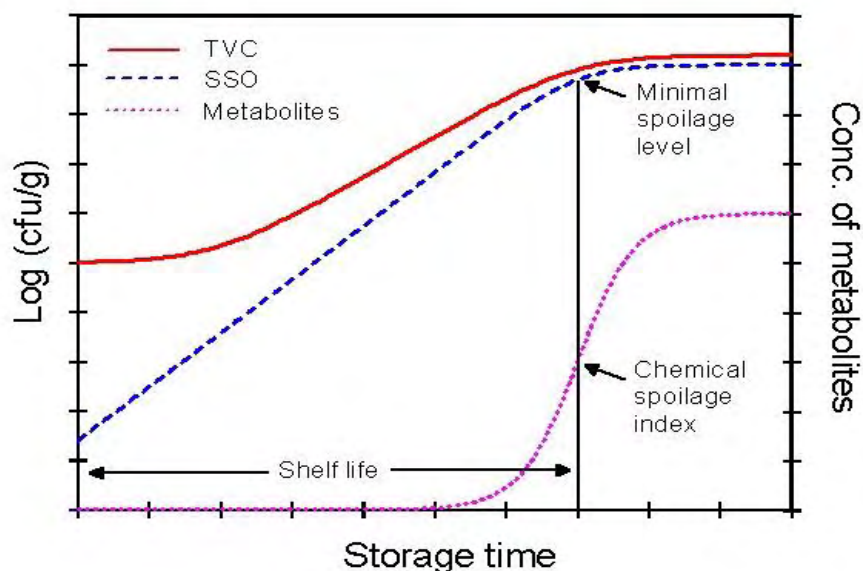
Επιπλέον, το τριμεθυλαμινοξειδίο (TMAO) αποτελεί μέρος του μη πρωτεϊνικού αζώτου όπου παρουσιάζεται σε πολλά είδη ιχθύων (Hebard *et al.*, 1982, Gram *et al.*, 1989, Anthoni *et al.*, 1990). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το TMAO επηρεάζει την αλλοίωση στο φρέσκο ψάρι, όπου μερικά βακτήρια το χρησιμοποιούν ως δέκτη ηλεκτρονίων (*Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrionaceae*), με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των οσμών και γεύσεων λόγω σχηματισμού τριμεθυλαμίνης (TMA) (Gram *et al.*, 1987, 1990, Dalgaard *et al.*, 1993)

Τέλος, η ανάπτυξη της τριμεθυλαμίνης (TMA) σε ορισμένα είδη ιχθύων σχετίζεται με την παραγωγή της υποξανθίνης. Η υποξανθίνη, που προκαλεί πικρή γεύση στα ψάρια, μπορεί να προέρχεται από την αυτολυτική αποσύνθεση των νουκλεοτιδίων ή από τα βακτήρια. Βέβαια ο ρυθμός σχηματισμού από τα βακτήρια είναι πιο υψηλός σε σύγκριση με τον ρυθμό αυτόλυσης (Gram & Huss, 1996).

1.4.5 Ειδικό Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί

Οι Ειδικό Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard 2002). Οι EAM (EAM, Ειδικό Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί) αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Όταν ο

πληθυσμός τους πλησιάσει το επίπεδο αλλοίωσης των 10^7 - 10^9 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) (Εικόνα 1.4.5)



Εικόνα 1.4.5.1. Μεταβολές στον Ολικό Μικροβιακό Πληθυσμό (ΟΜΧ), στους Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς (ΕΑΜ), καθώς και στους Χημικούς Δείκτες Μικροβιακής αλλοίωσης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης (Προσαρμοσμένο από Huisin'tVeld, 1996).

Στους ιχθύες που προέρχονται από τα ύδατα των εύκρατων κλιμάτων και αποθηκεύονται σε πάγο στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, τα γένη *Pseudomonas* και *S. putrefaciens* αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού των αλλοιωμένων ιχθύων (Liston 1960, Gram et al. 1987, Gram et al. 1990). Οι μικροοργανισμοί αυτοί επικρατούν λόγω του μικρού χρόνου διπλασιασμού που παρουσιάζουν στις χαμηλές θερμοκρασίες (Morita, 1975). Το *S. Putrefaciens* αποτελεί κυρίως τον ΕΑΜ σε ιχθύες που αλιεύονται από τα ύδατα της Β. Ευρώπης και συντηρούνται σε πάγο, λόγω του υψηλότερου δυναμικού αλλοίωσης που παρουσιάζει εξαιτίας της ικανότητάς του να μετατρέπει το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (ΤΜΑΟ) σε τριμεθυλαμίνη (ΤΜΑ) και να προσδίδει στο προϊόν την

έντονη μυρωδιά της αλλοιωμένης οσμής η οποία προκαλεί και την οργανοληπτική απόρριψη (Gram *et al.*, 1987).

Στα αλιεύματα της Μεσογείου, αν και οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί είναι οι ίδιοι με αυτούς που επικρατούν στα αλιεύματα της Β. Ευρώπης, ως ΕΑΜ έχουν χαρακτηριστεί τα *Pseudomonas spp.* διότι φθάνουν σε υψηλότερους πληθυσμούς από τα *S.putrefaciens*, ενώ οι κύριοι μεταβολίτες που προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη είναι κυρίως αζωτούχα παραπροϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων (Dainty, 1996). Τα *Pseudomonas spp.* επικρατούν έναντι του *S.putrefaciens* στους ιχθύες της Μεσογείου κυρίως λόγω της αδυναμίας των τελευταίων να παράγουν επαρκή ενέργεια από την αναγωγή του ΤΜΑΟ σε ΤΜΑ.

Η πρόδρομη ουσία για την παραγωγή του ΤΜΑ είναι το ΤΜΑΟ απαντάται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους ιχθύες της Μεσογείου (Kyraia & Lougonois 2002). Έτσι, τα *Pseudomonas spp.* και κατά δεύτερον το *S.putrefaciens* αποτελούν τους πιο επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε αλιεύματα που προέρχονται από Ελληνικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou *et al.* 2007, Boziaris *et al.* 2011, Parlapani and Boziaris 2016).

Είναι πλέον γνωστό ότι διάφορες αλλαγές στις συνθήκες επεξεργασίας, συσκευασίας και αποθήκευσης είναι δυνατόν να δώσουν μία τελείως διαφορετική μικροβιακή σύνθεση και κατά συνέπεια και τύπο αλλοίωσης (Gram & Huss, 1996). Η συντήρηση των ιχθύων σε ατμόσφαιρα διαφορετικής συνθέσεως αερίων από αυτή του αέρα, όπως γίνεται η αποθήκευση σε συσκευασία MAP, ευνοεί την επικράτηση διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών.

Έχει παρατηρηθεί ότι η συσκευασία των ιχθυηρών σε MAP (μειωμένο ή καθόλου οξυγόνο, υψηλό διοξείδιο του άνθρακα) παρεμποδίζει πολλές φορές την αύξηση τόσο των *Pseudomonas spp.* όσο και του *S.putrefaciens*. Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι οι συσκευασίες αυτές ευνοούν την αύξηση μικροοργανισμών με ζυμωτικό μεταβολισμό όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το *B.thermosphacta* στους ιχθύες της Μεσογείου (Drosinos & Nychas 1996, Drosinos *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, Taoukis *et al.* 1999, Koutsoumanis *et al.* 2000, Parlapani *et al.*, 2015), όπως και τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το *Photobacterium phosphoreum* στους ιχθύες των βόρειων κλιμάτων (Lannelonque *et al.* 1982, Dalgaard 1995a, Dalgaard *et al.* 1997).

Στους ιχθύες της Β. Ευρώπης σε συνθήκες ΜΑΡ επικρατεί κυρίως το *P. phosphoreum* έναντι του *S.putrefaciens* διότι είναι περισσότερο ανθεκτικό στο διοξείδιο του άνθρακα και παράγει 10-100 φορές περισσότερο ΤΜΑ ανά κύτταρο σε σχέση με το *S. putrefaciens* (Dalgaard, 1995b). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι πληθυσμοί του *S.putrefaciens*, οι οποίοι είναι μικρότεροι του 108 δεν είναι ικανοί να προκαλέσουν αλλοίωση, λόγω του μικρού ποσού ΤΜΑ που παράγουν (Dalgaard, 1995a).

1.5 Συντήρηση ιχθύων υπό κιτρικό οξύ

Συντήρηση τροφίμων (*food preservation*) ορίζεται η λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση των αιτιών που προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση ή την αλλοίωση των τροφίμων, έτσι ώστε αυτά να είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή και ασφαλή για την υγεία του για καθορισμένο χρονικό διάστημα, όταν διατηρούνται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Μπλούκας, 2004).

Το κιτρικό οξύ είναι ένα ασθενές οργανικό τρικαρβοξυλικό οξύ (Εικόνα 2). Είναι διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο, κυρίως στα λεμόνια και τα άλλα εσπεριδοειδή, το ακτινίδιο, τις φράουλες και πολλά άλλα φρούτα. Είναι εξαιρετικό φυσικό συντηρητικό, ενώ χρησιμοποιείται και ως ρυθμιστής οξύτητας καθώς και σαν αρωματικό συστατικό. Είναι ενδιάμεσο ενός κύκλου μεταβολισμού των σακχάρων στους ζωντανούς οργανισμούς, μεγάλης βιολογικής σημασίας (κύκλος κιτρικού οξέος – κύκλος του Krebs), μέρος της διαδικασίας κατά την οποία οι ζωντανοί οργανισμοί μετατρέπουν την τροφή σε ενέργεια.

Υπό κανονικές συνθήκες είναι σε μορφή άχρωμης κρυσταλλικής σκόνης. Συναντάται είτε σε άνυδρη μορφή είτε σε ένυδρη, η οποία περιέχει ένα μόριο νερού για κάθε μόριο κιτρικού οξέος. Το άνυδρο κιτρικό οξύ κρυσταλλώνεται από διάλυμα ζεστού νερού ενώ η ένυδρη μορφή από διάλυμα κρύου νερού. Το τελευταίο μετατρέπεται στην άνυδρη μορφή με θέρμανση πάνω από τους 74 °C.

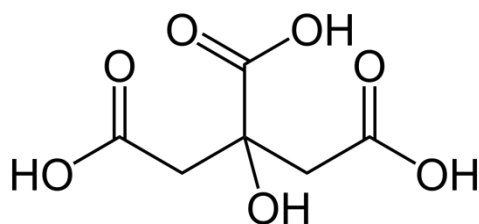
Διαλύεται εύκολα στο νερό, στην αλκοόλη και στον αιθέρα. Ανήκει στην οικογένεια των καρβοξυλικών οξέων και έχει τις χημικές ιδιότητες των καρβοξυλικών οξέων και των υδροξυενώσεων.

Η ανακάλυψη του κιτρικού οξέος αποδίδεται στον αλχημιστή Jabir Ibn Hayyan κατά τον 8ο αιώνα. Για πρώτη φορά απομονώθηκε το 1784 από τον Σουηδό χημικό Carl Wilhelm Scheele κατά τη διάρκεια ενός πειράματος με χυμό λεμονιού. Το

κιτρικό οξύ παρασκευάζεται βιομηχανικά είτε από το χυμό των λεμονιών κατά την κατακρήμνιση με ανθρακικό ασβέστιο υπό μορφή αδιάλυτου κιτρικού ασβεστίου, είτε κυρίως κατά τη ζύμωση σακχάρων με μύκητες.

Στη δεύτερη μέθοδο, το σάκχαρο υφίσταται ζύμωση μέχρι 50% προς κιτρικό οξύ. Στο φιλτραρισμένο αραιό διάλυμα κιτρικού οξέος προστίθεται υδροξείδιο του ασβεστίου οδηγώντας στην κατακρήμνιση αδιάλυτου κιτρικού ασβεστίου, το οποίο στη συνέχεια κατεργάζεται μεθειικό οξύ για να δώσει κιτρικό οξύ καιθειικό ασβέστιο ως παραπροϊόν. Το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται ως αρωματικό και συντηρητικό στις τροφές και τα ποτά, κυρίως τα μη αλκοολούχα (π.χ. λεμονάδες). Ως πρόσθετο τροφίμων επισημαίνεται με τον κωδικό E330.

Το κιτρικό οξύ θεωρείται ασφαλές για χρήση στα τρόφιμα καθώς δεν είναι καρκινογόνο. Είναι κανονικό συστατικό των κυττάρων, αποικοδομείται και χρησιμοποιείται από το σώμα χωρίς παρενέργειες. Έχουν αναφερθεί, ωστόσο, ψευδοαλλεργικές αντιδράσεις (δυσανεξία), οι οποίες όμως είναι σπάνιες. Επαφή με σκόνη κιτρικού οξέος ή πυκνού διαλύματος αυτού, μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα ερεθισμό των ματιών και του δέρματος. Γι' αυτό το λόγο κατά τη διαχείριση του είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλης προστατευτικής ενδυμασίας, γαντιών και προστατευτικών γυαλιών.



Εικόνα 1.5.1. Χημικός τύπος του κιτρικού οξέως

Ο μηχανισμός δράσης των οργανικών οξέων ως προς τους μικροοργανισμούς βασίζεται στη δραστική αλλαγή του pH του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται οι μικροοργανισμοί. Η θεμελιώδης αρχή αυτής της επίδρασης είναι ότι τα μη ιονισμένα οργανικά οξέα μπορούν να διαχέονται στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών και να διαταράξουν τη φυσιολογική λειτουργία και ομοιόστασή τους, αλλάζοντας το pH. Μετά την παθητική διάχυση οργανικών οξέων

στο εσωτερικό των μικροοργανισμών, όπου το pH είναι ουδέτερο ή ελαφρώς βασικό, τα οξέα θα απελευθερώσουν ιόντα υδρογόνου και θα μειώσουν το εσωτερικό pH, οδηγώντας σε περιορισμό ή παύση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Επίσης, το ανιοντικό μέρος των οργανικών οξέων, που δεν μπορεί να βγει έξω από τα βακτήρια στην ιοντική του μορφή, θα συσσωρευθεί στο εσωτερικό τους και θα σταματήσει πολλές μεταβολικές λειτουργίες τους, με αποτέλεσμα την αύξηση της οσμωτικής πίεσης και τελικώς τον θάνατο των μικροοργανισμών (Hall et al., 1995; Hill et al., 1995).

1.6 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν η διερεύνηση των μικροβιολογικών και οργανοληπτικών μεταβολών για τον προσδιορισμό της ποιότητας και την τεκμηρίωση του εναπομείναντος εμπορικού χρόνου ζωής φιλέτων τσιπούρας, μαριναρισμένου με κιτρικό οξύ και αποθηκευμένου σε συσκευασία κενού στους 2°C.

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Γενικά

Ολόκληροι απεντερωμένοι ιχθύες του είδους τσιπούρας *Sparusaurata* καθαρού βάρους 500 g μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος από τον ιχθυοκαλλιεργητικό σταθμό ΣΕΛΟΝΤΑ στις 21/10/17 περίπου 5 ώρες μετά από την αλίευση τους με ιδιωτικό αυτοκίνητο. Κατά την διάρκεια της μεταφοράς τα ιχθύδια είχαν τοποθετηθεί σε ισοθερμικά κιβώτια με πάγο για να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες αλλοίωσής τους. Κατόπιν αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

Την ίδια μέρα ξεκίνησε η φιλετοποίηση των ιχθύων με αποστειρωμένα μαχαίρια και λαβίδες. Οι λαβίδες χρησιμοποιήθηκαν για να απομακρύνουν τα κόκκαλα τους ώστε να μην υπάρχει πρόβλημα στις περεταίρω αναλύσεις και στην αποθήκευση του φιλέτου. Η αποθήκευση των φιλέτων έγινε μέσα σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher. Τα φιλέτα ψαριού που πάρθηκαν είχαν βάρος περίπου 40 gr το καθένα. Κατόπιν τα φιλέτα μαριναρίστηκαν και συσκευάστηκαν υπό κενό σε πλαστικές σακούλες και αποθηκεύθηκαν στους 2°C.

Οι μετρήσεις γινόντουσαν ανά 8 ημέρες, εις διπλούν, για να υπάρχει μια γενική εικόνα της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Σε κάθε μέτρηση γινόταν η παρακολούθηση του μικροβιακού πληθυσμού των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων σε Iron agar, της ολικής μεσόφιλης χλωρίδος (OMX) σε TSA, *Pseudomonas* spp, σε CFC, *Enterobacteriaceae* σε VRBGA, και οξυγαλακτικών σε MRS. Το pH των ψαριών ορίστηκε σε αυτό που μετρούνταν κατά την πρώτη αραίωση στο ομογενοποιημένο δείγμα.

Επιπλέον αξιολογήθηκαν μια σειρά από οργανοληπτικά στοιχεία (γεύση, χρώμα, οσμή, εμφάνιση, κτλ) προκειμένου να προσδιοριστεί ο εμπορικός χρόνος ζωής των προϊόντων και να συσχετισθεί με τις μικροβιακές και φυσικοχημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

2.2 Μικροβιολογική ανάλυση

A. Μικροβιολογικά υλικά

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). Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

B. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

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

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη των 1000ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2 .

Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα deMan - Rogosa - Sharpeagar (MRS, LAB093). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) καθώς και το βασικό pH καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ενζυματική πέψη ζωϊκού 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 °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 70.0g θρεπτικού υλικού σε 1000ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό θερμάνθηκε μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και έπειτα αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45

έως 50°C, ρυθμίστηκε το pH στα 6.4 ± 0.2 και στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S)

Το Iron Agar χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H₂S). Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη, καθώς και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και βιταμίνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), τη δεξτρόζη, τη λακτόζη και την σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες (H/C) αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειικό νάτριο (Na₂S₂O₂) ανάγεται προς υδρόθειο (H₂S), 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 65.0g θρεπτικού υλικού σε 1000ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50°C, μοιράστηκε σε τρυβλία Petri

Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, LAB088). 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 38.5g θρεπτικού υλικού σε 1000ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα (δεν χρειάζεται περαιτέρω αποστείρωση). Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 °C, στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH ήταν 7.4 ± 0.2.

Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.

Το θρεπτικό μέσο (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine, 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 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

Συστατικά εκλεκτικού μέσου CFC

(κάθε φιαλίδιο περιέχει ποσότητα mg/500 ml θρεπτικού)

Cetrimide	5.0
Fucidin	5.0
Cephaloridine	25.0

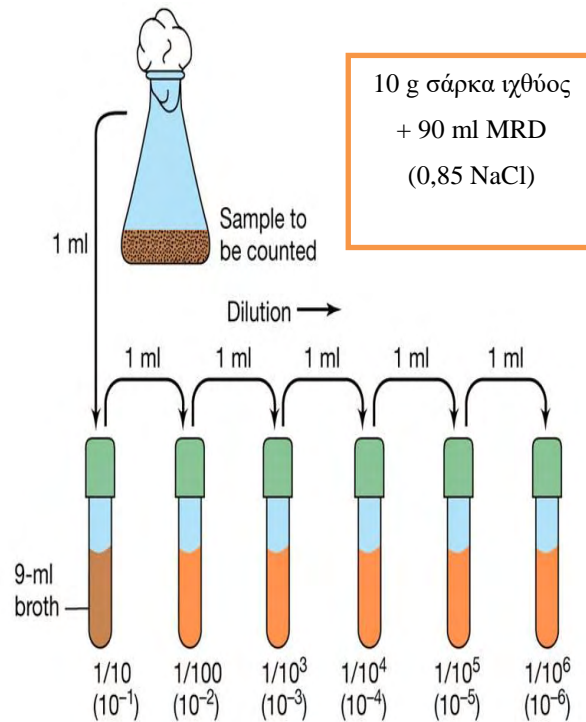
Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 25.2g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκαν 500ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 5ml γλυκερόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθεί το θρεπτικό. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121

°C για 15 min. Το τελικό pH ήταν 7.1 ± 0.2 στους 25°C. Στη συνέχεια το θρεπτικό αφέθηκε να κρυώσει σε υδατόλουτρο μέχρι τους 45 έως 50 °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. Αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 8 έως 15 °C για μελλοντική χρήση.

Προετοιμασία δειγμάτων

Ληφθέντα ασηπτικά, ανά 8 ημέρες, 10g σάρκας ιχθύων τσιπούρας εις διπλούν (n = 2) και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher. Στη συνέχεια προστέθηκαν 90ml αραιωτικού διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v peptone) και η σακούλα οδηγήθηκε σε συσκευή ομογενοποίησης (Bag Mixer 400 VW, Interscience, London, UK), όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 60sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε ορισμένα δείγματα όπου θέλαμε να μελετήσουμε το μικροβιολογικό τους φορτίο σε μεγαλύτερες αραιώσεις. Η διαδικασία της αραιώσης γίνεται, με μεταφορά 1mL από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.



Εικόνα 2.2.1. Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2007).

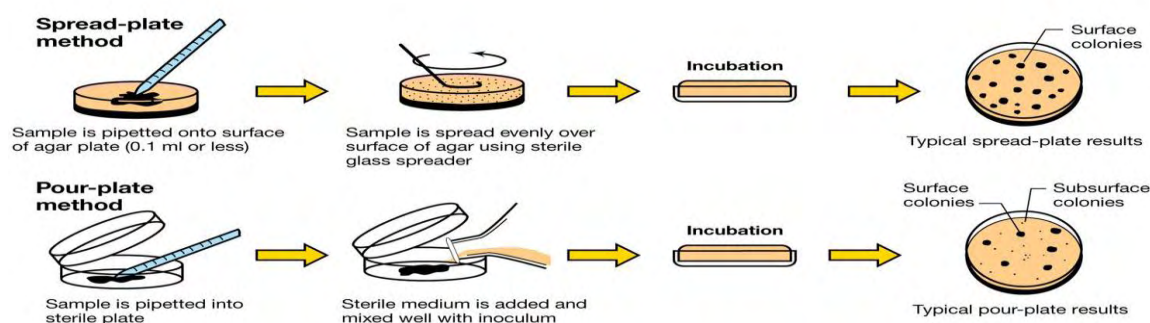
Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος από κάθε αραιώση σε θρεπτικό υπόστρωμα με 2 τεχνικές, αυτή της επίστρωσης και αυτή της ενσωμάτωσης.

Η επίστρωση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) για τα θρεπτικά υλικά TSA και CFC. Η τεχνική αυτή αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0.1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια ειδικού διανομέα. Εφαρμόζεται, γενικά, στους αερόβιους μικροοργανισμούς.

Η ενσωμάτωση έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique) για τα θρεπτικά υλικά Iron Agar, VRBGA, MRS. Αρχικά γίνεται ενοφθαλμισμός γνωστού όγκου (1 ml) από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος σε θρεπτικό υλικό και στην συνέχεια γίνεται μετάγγιση τηγμένου θρεπτικού υλικού, θερμοκρασίας 45 °C περίπου. Στη συνέχεια, και αφού το θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay). Εφαρμόζεται, γενικά, στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς

Δ. Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν: α) Ολικός Μεσόφιλος Πληθυσμός σε TSA μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 έως 72 h, β) βακτήρια που παράγουν H₂S σε IA, με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 έως 72 h, γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37 °C για 24 h, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar, με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25 °C για 48 h, ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25 °C για 48 h



Εικόνα 2.2.2. Μέθοδοι μέτρησης των ζώντων βακτηρίων με καταμέτρηση αποικιών επί τρυβλίο (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2007).

2.3 Μέτρηση pH

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH της σάρκας των ψαριών ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της λήψης των δειγμάτων. Ως μέτρηση pH ορίστηκε η μέτρηση που λαμβάνονταν από την ομογενοποίηση του δείγματος με το θρεπτικό υλικό MRS. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού πεχάμετρου, τύπου pH 730 inoLabWTW GmbH series (Weilheim, Germany), πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις κατά την πρώτη, την τρίτη, την πέμπτη και την έξιτομή που έγινε η ομογενοποίηση 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.



2.4 Οργανοληπτική ανάλυση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιούνται σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πενταβάθμια κλίμακα αρεσκείας, όπου ξεκινούσαν από το 1(αλλοιωμένο) μέχρι το 5 (άριστο). Με 4 βαθμολογήθηκε το ‘πολύ’ καλό’ με 3 το ‘μέτριο-αποδεκτό’ και με 2 το ‘μη αποδεκτό’. Έτσι ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης ήταν η χρονική στιγμή που βαθμολογήθηκαν με 2, αλλά ο εμπορικός χρόνος ζωής ήταν όταν τα φιλέτα βαθμολογήθηκαν με 3. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της νοπότητας των απεντερωμένων ιχθύων τσιπούρας, οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), βασιστήκαν στις τις αισθήσεις (όσφρηση, γεύση, ύφη και οπτική αντίληψη).

2.5 Παρασκευή μαρινάδας και μαρινάρισμα φιλέτου.

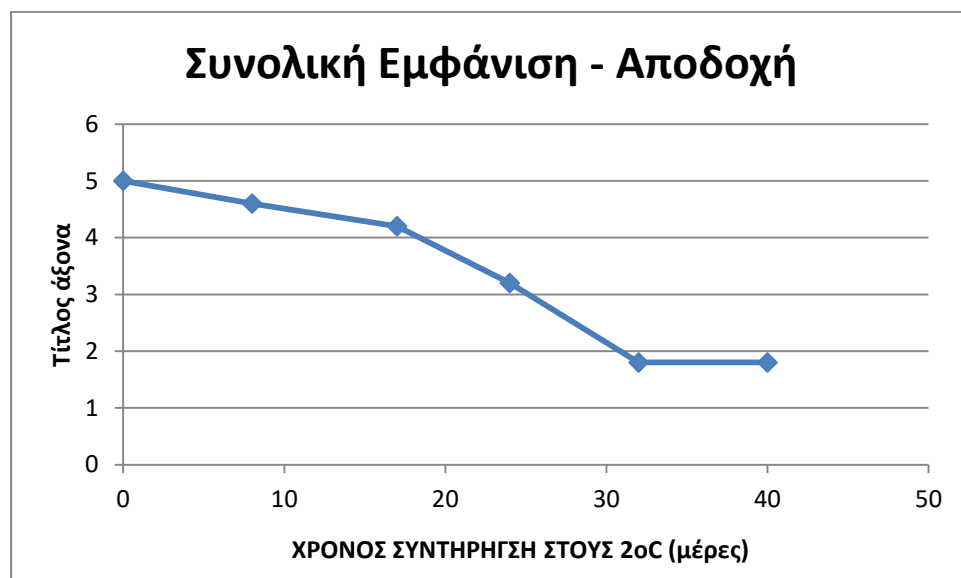
Το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε για το μαρινάρισμα των φιλέτων τσιπούρας είναι το κιτρικό οξύ. Το κιτρικό οξύ το δημιουργήσαμε με τη μείξη νερού, χυμού λεμονιού και αλατιού. Πιο συγκεκριμένα οι αναλογίες για το νερό και το λεμόνι ήταν 1 προς 1.

Στην συνέχεια προσθέσαμε αλάτι, 3% w/v το συνολικού όγκου του μείγματος και τα αναμίξαμε μέχρι να ομογενοποιηθούν. Το pH της μαρινάδας ήταν 3,5. Στο μείγμα που δημιουργήθηκε τοποθετήσαμε τα φιλέτα τσιπούρας για 20 ώρες στους 8°C με αναλογία βάρους φιλέτων προς όγκου μαρινάδας 1/1,5.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Οργανοληπτική ανάλυση

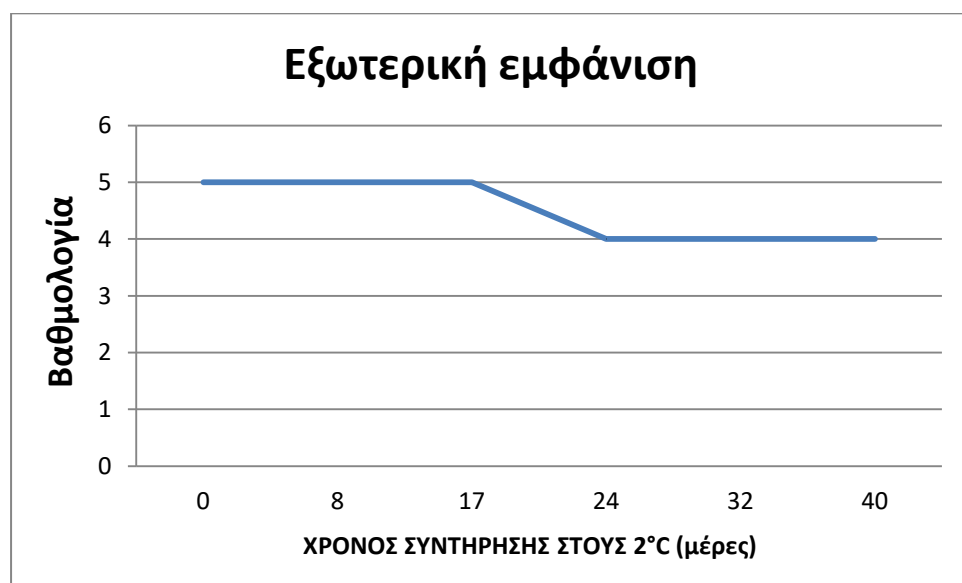
Μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση, τα φιλέτα ιχθύων τσιπούρας που είχαν αποθηκευθεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), την ημέρα 0 αξιολογήθηκαν ως “Άριστα”, με βαθμό 5,0. Κατά την διάρκεια της συντήρησης όμως η συνολική εμφάνιση των φιλέτων άρχισε να μειώνεται σταδιακά. Την 8 ημέρα έχουμε ακόμα αρκετά καλή συνολική εικόνα από τα φιλέτα με βαθμό 4,6. Μετά από 17 ημέρες, στην τρίτη μέτρηση δηλαδή, το φιλέτο τσιπούρας παραμένει σε πολύ καλή κατάσταση, με βαθμό 4 στην συνολική του εικόνα. Όταν πραγματοποιήσαμε την τέταρτη μέτρηση, μετά από εικοσιτέσσερις μέρες από την έναρξη του πειράματος, διαπιστώσαμε μια απότομη μείωση της συνολικής εμφάνισης του φιλέτου. Εκείνη την ημέρα η βαθμολογία που είχαμε δώσει ήταν κοντά στο 3, που μας υποδεικνύει ότι η ποιότητα αξιολογήθηκε ως “μέτρια-αποδεκτή”. Σε αυτό το σημείο συνήθως το προϊόντα απορρίπτονται από τα ράφια του καταστήματος. Στις δυο τελευταίες μετρήσεις που διεξήχθησαν στο εργαστήριο, 32 και 40 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, η βαθμολογία των φιλέτων βρίσκεται στο 1,8, όπου χαρακτηρίζεται ως “μη-αποδεκτή” στη συνολική του εμφάνιση.



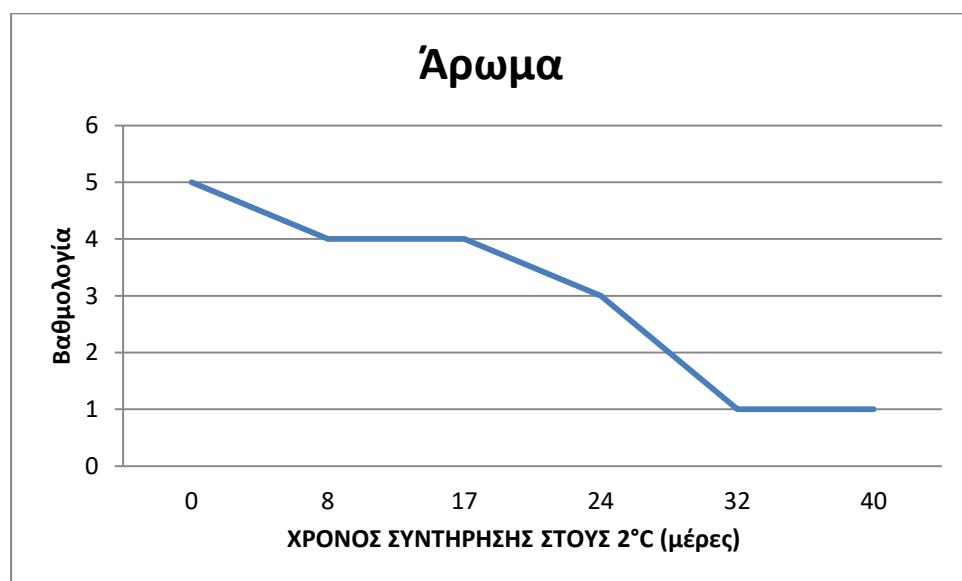
Σχήμα 3.1.1. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες (2 ± 1 °C).

Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο χρόνος που μπορούμε να απορρίψουμε τα φιλέτα τσιπούρας από το ράφι που έχουν συντηρηθεί με κιτρικό οξύ είναι 24 μέρες μετά την επεξεργασία τους.

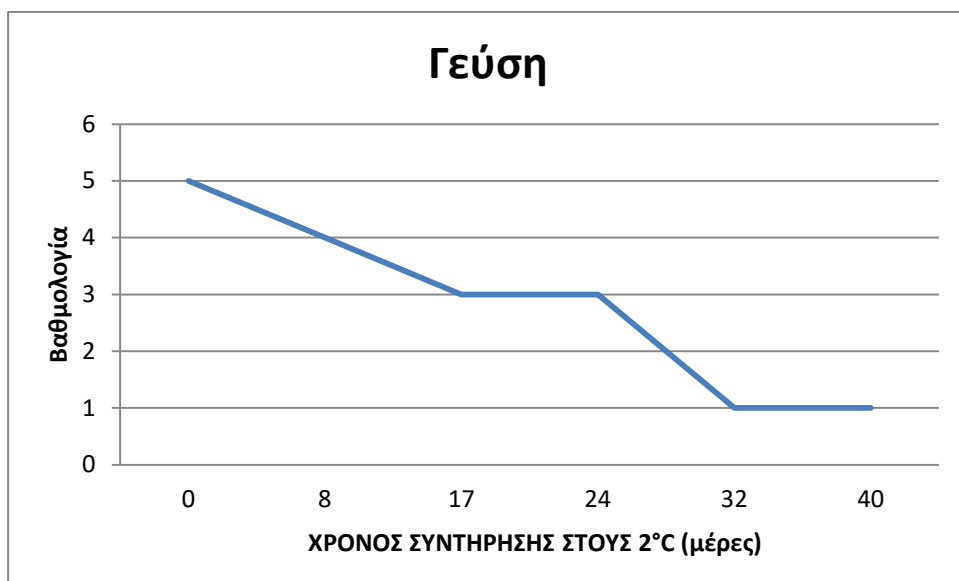
Πιο αναλυτικά μπορούμε να δούμε στα παρακάτω διαγράμματα την σταδιακή μείωση της ποιότητας των φιλέτων τσιπούρας όσον αφορά την εξωτερική εμφάνιση, το άρωμα, την γεύση, το χρώμα και την συνεκτικότητα της σάρκας των φιλέτων.



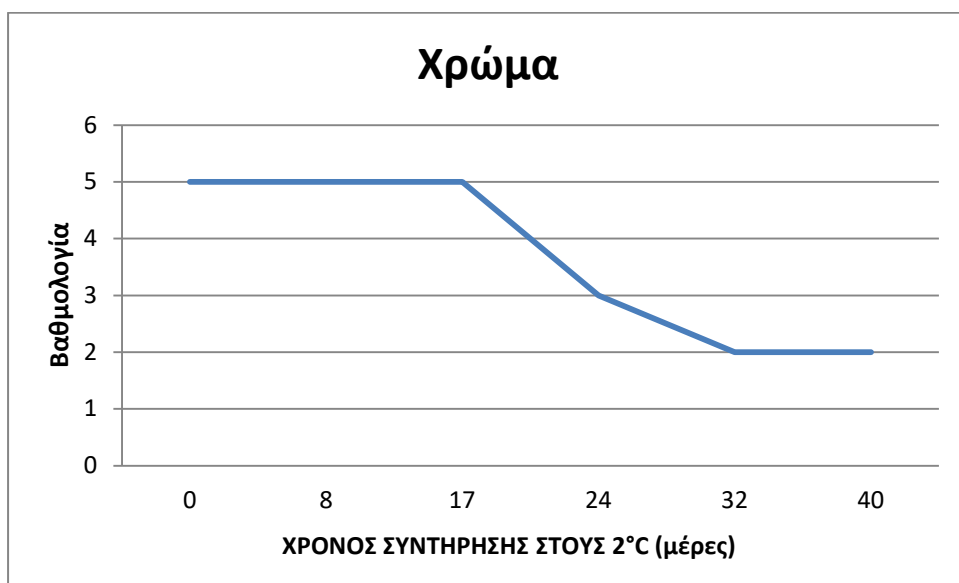
Σχήμα 3.1.2. Μεταβολές στη εξωτερική εμφάνιση των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες (2 ± 1 °C).



Σχήμα 3.1.3. Μεταβολές στο άρωμα των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες (2 ± 1 °C).



Σχήμα 3.1.4. Μεταβολές στη γεύση των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες (2 ± 1 °C).

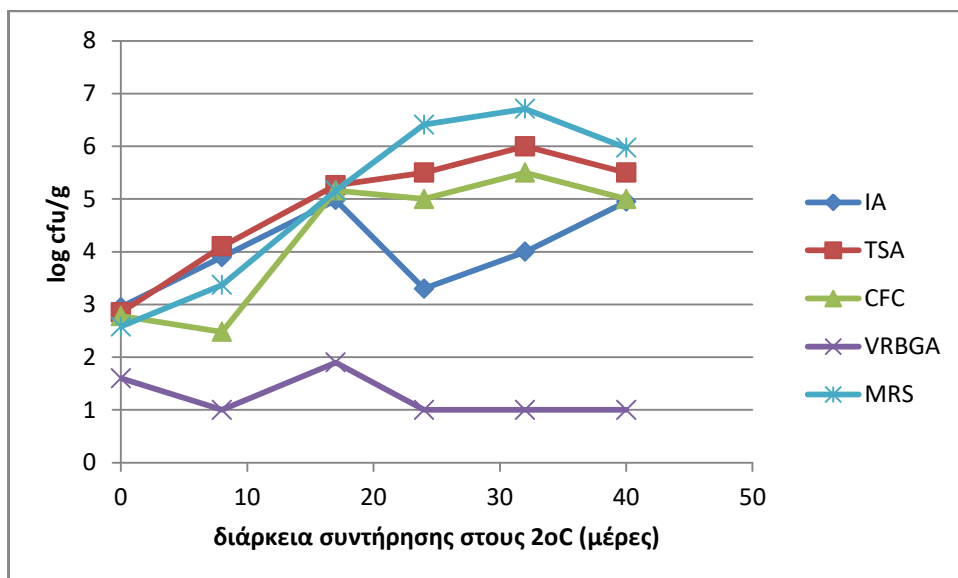


Σχήμα 3.1.5. Μεταβολές στο χρώμα των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες (2 ± 1 °C).



Σχήμα 3.1.6. Μεταβολές στη συνεκτικότητα της σάρκας των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες (2 ± 1 °C).

3.2 Μικροβιολογική αξιολόγηση



Σχήμα3.2. Πληθυσμιακές μεταβολές της TSA (OMX) αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών CFC (*Pseudomonas* spp.), IronAgar, βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H_2S), MRS (Οξυγαλακτικά βακτήρια), VRBGA (Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae) σε φιλέτο τσιπούρας (φυσική μικροβιακή σύνθεση) κατά τη διάρκειά της συντήρησής τους

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε στο παραπάνω σχήμα οι μικροοργανισμοί που έχουν την μεγαλύτερη ανάπτυξη είναι τα Οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS). Ωστόσο,

μέσω της παρατήρησης του σχεδιαγράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε από την κλίση των γραμμών ότι οι οργανισμοί που παράγουν υδρόθειο (IA) και η OMX έχουν την πιο απότομη αύξηση, εντός των πρώτων 8 ημερών. Τις υπόλοιπες ημέρες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα παρατηρούμε ότι υπάρχει μια σταδιακή αύξηση τους.

Πιο αναλυτικά, στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας οι μετρήσεις σχεδόν όλων μικροοργανισμών ξεκίνησαν από την ίδια περιεκτικότητα, δηλαδή κοντά στο 3. Πιο συγκεκριμένα η συγκέντρωση του IA είναι στα $3,04 \log_{10} \text{ cfu/g}$, το TSA έχει $3,04 \log_{10} \text{ cfu/g}$, το CFC έχει $2,815 \log_{10} \text{ cfu/g}$ και το MRS έχει $2,68 \log_{10} \text{ cfu/g}$ εκτός του VRBGA όπου η συγκέντρωση είναι $1,7 \log_{10} \text{ cfu/g}$.

Ο πληθυσμός της OMX για το χρονικό διάστημα την πρώτη μέχρι την πέμπτη φορά που διεξάχθηκαν οι μέτρησις παρατηρητή μια αύξηση, ενώ από την πέμπτη μέχρι την τελευταία μέτρηση υπάρχει μια μείωση του πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, την πιο μεγάλη αυξήσει την παρατηρούμε το διάστημα της πρώτης μέχρι την τρίτη μέτρησης, όπου ο πληθυσμός φτάνει στα $5,165 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (ήμερα 17). Από την τρίτη μέχρι την πέμπτη μέτρηση παρουσιάζετε μια αύξηση αλλά όχι τόσο έντονη όσο η πρώτη και ο πληθυσμός φτάνει στα $5,923 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (ήμερα 32). Στην τελευταία μέτρηση ο πληθυσμός της OMX μειώνετε στα $5.65 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (ήμερα 40).

Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. που συναντάμε στο θρεπτικό υλικό CFC έχει μια ιδιαίτερη ανάπτυξη. Η αύξηση του πληθυσμού παρατηρείτε την τρίτη και πέμπτη φορά που έγιναν οι μετρήσεις (ήμερα 17, 32 αντίστοιχα), με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείτε από το χρονικό διάστημα δεύτερης με τρίτης μέτρησης όπου ο πληθυσμός φτάνει από $2,43 \log_{10} \text{ cfu/g}$ στα $5.23 \log_{10} \text{ cfu/g}$. Το διάστημα ανάμεσα πέμπτη και έκτης μέτρησης υπάρχει μια μείωση του πληθυσμού από $6.02 \log_{10} \text{ cfu/g}$ στα $5.34 \log_{10} \text{ cfu/g}$.

Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, παρουσιάζει διαρκώς μια αύξηση του πληθυσμού έκτος της τελευταίας μέτρησης που παρατηρητή μια μικρή μείωση. Πιο συγκεκριμένα, την πιο μεγάλη αυξήσει την παρατηρούμε το διάστημα της δεύτερης μέχρι την τέταρτη μέτρησης, όπου ο πληθυσμός φτάνει στα $6,55 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (ήμερα 24) από τα $3,35 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (ήμερα 8). Τον μεγαλύτερο αριθμό πληθυσμού το συναντάμε την πέμπτη μέτρηση όπου το προσδιορίζουμε στα $6,72 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (ήμερα 32). Τέλος το διάστημα της πέμπτης με

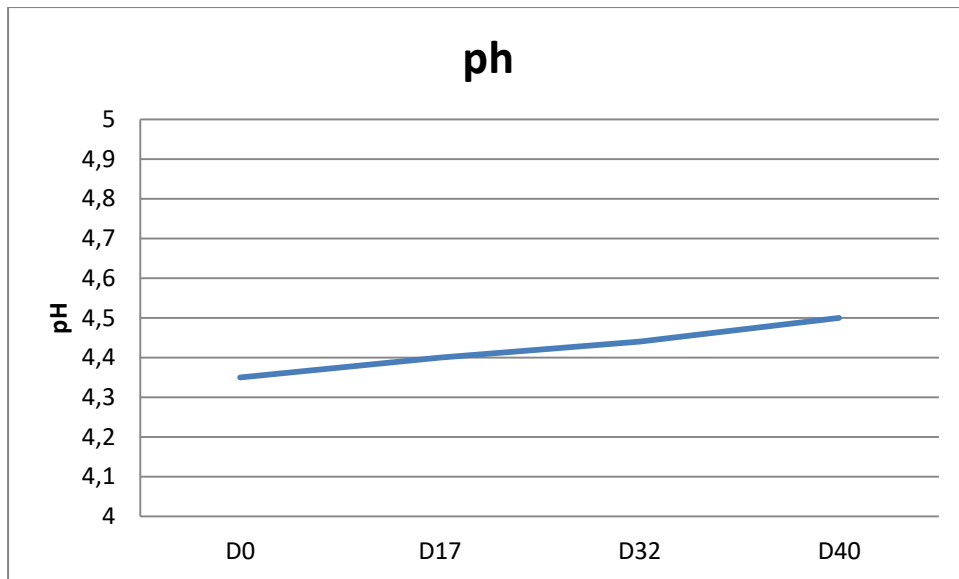
έκτης μέτρησης παρουσιάζετε μια μείωση από τα 6,72 log₁₀ cfu/g στα 6,01 log₁₀ cfu/g (ήμερα 40).

Τέλος, ο πληθυσμός των βακτηρίων που αναπτύσσονται στο Iron Agar, τα οποία είναι τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S), παρουσιάζει διακυμάνσεις. Πιο αναλυτικά, από την πρώτη μέχρι την τρίτη μέτρηση και από την τέταρτη μέχρι την τελευταία μέτρηση παρουσιάζετε μια αύξηση, από τα 3,04 log₁₀ cfu/g (ήμερα 0) στα 5,07 log₁₀ cfu/g (ήμερα 17) και από 3,14 log₁₀ cfu/g (ήμερα 24) στα 5 log₁₀ cfu/g (ήμερα 40) αντίστοιχα. Την μόνο μείωση που παρατηρητή στον πληθυσμού που αναπτύσσονται στο Iron Agar είναι το χρονικό διάστημα μεταξύ της τρίτης και τέταρτης μέτρησης όπου ο πληθυσμός πεφτει από 5,07 log₁₀ cfu/g (ήμερα 17) στα 3,14 log₁₀ cfu/g (ήμερα 24).

Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών της οικογενείας *Enterobacteriaceae*, που συναντάμε στο θρεπτικό υλικό VRBGA κατά την διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος ήταν στα 1 log₁₀ cfu/g εκτός της πρώτης μέτρησης και της τρίτης που η συγκέντρωσή τους ήταν 1,8 log₁₀ cfu/g και 1,95 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα.

3.3 Ανάλυση pH

Η διακύμανση των τιμών του pH στα φιλετα τσιπούρας που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες συντηρησης (2 ± 1 °C), παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3. Διακύμανση του pH των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες (2 ± 1 °C).

Σύμφωνα με το **Σχήμα 3.3.** οι τιμές του pH της σάρκας των μαριναρισμένων φιλέτων δεν παρουσίασε ουσιαστική μεταβολή κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η τιμή, στην έναρξη του πειράματος, ήταν 4.35 ενώ μέχρι το πέρας του πειράματος ήταν 4.5. Είναι σαφές ότι το μαρινάρισμα μείωσε την τιμή pH της σάρκας σημαντικά από την τιμή 6.2 που έχει η ωπή σάρκα στην τιμή 4.35

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ψάρι είναι ένα σημαντικό μέρος της υγιεινής διατροφής, δεδομένου του ότι περιέχουν υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη. Είναι επίσης ιδιαίτερα ευαλλοιώτα εμπορεύματα όπου είναι επιρρεπή στη μόλυνση σε διάφορα στάδια του χειρισμού και της επεξεργασίας. Η μόλυνση είναι μια πολύ σημαντική πτυχή, καθώς αυτός είναι ο τρόπος που οι περισσότεροι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί μπορεί να μεταδοθούν σε θαλασσινά και άλλα προϊόντα διατροφής. Υπάρχει ουσιαστική απόδειξη ότι τα θαλασσινά είναι ψηλά στην λίστα με τα τρόφιμα που σχετίζονται με ξεσπάσματα τροφικών ασθενειών (Huss et al., 2003). Η αλλοίωση στο ωμό ψάρι, πραγματοποιείται κυρίως λόγω της ενζυματικής, μικροβιακής και χημικής δράσης. Μεταξύ αυτών των τριών, η αλλοίωση των ψαριών λόγω βακτηρίων είναι ο επικρατέστερος μηχανισμός.

Ο πιο κοινός τρόπος για να γίνει η αξιολόγηση των ψαριών είναι βάση των οργανοληπτικών τους αλλαγών (οσμή, χρώμα, υφή) που πραγματοποιείται στην σάρκα τους (Gram and Huss, 1996). Η οσμή αποτελεί τον κυριότερο δείκτη αξιολόγησης της φρεσκότητας (Selli and Cayhan, 2009), ενώ μικροβιολογικοί, βιοχημικοί και οργανοληπτικοί μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της φρεσκότητας και της ποιότητας κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης και της αποθήκευσης των ιχθύων. Σε συνθήκες αέρα, όπου τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους πιο επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, παρατηρείται παραγωγή πτητικών αζωτούχων βάσεων, πτητικών οξέων, αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων, παραγωγή υδρόθειου και άλλων ουσιών (Parlapani et al, 2014).

Έχει αναφερθεί πως τα οργανικά οξέα δρουν έναντι της αύξησης του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής στους ιχθύες (Sallam, 2007). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία του Sallam, (2007) κατά την οποία τα άλατα του κιτρικού οξέος επιδρούν σημαντικά στους πληθυσμούς των *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H_2S σε φέτες σολομού που εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα άλατος κιτρικού οξέος 2,5% v/w για 10 min και αποθηκεύθηκαν στους $1^{\circ}C$. Οι πληθυσμοί των πιο σημαντικών μικροοργανισμών βρέθηκε να είναι περίπου 2 φορές μικρότεροι (σε λογαριθμική κλίμακα) στις φέτες σολομού με κιτρικό οξύ, σε σχέση με τις φέτες χωρίς κιτρικό, ενώ ο πληθυσμός τους δεν ξεπέρασε τα επίπεδα των 7 και 6 log,

αντίστοιχα. Ακόμη, στο τέλος της συντήρησης ο εμπορικός χρόνος ζωής του προϊόντος σολομού επιμηκύνθηκε για 4 ημέρες (Sallam, 2007).

Στην παρούσα μελέτη, οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί που οφείλονται για την αλλοίωση των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας, μαριναρισμένων με κιτρικό και αποθηκευμένων υπό συνθήκες κενού ήταν τα Οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS) με πληθυσμούς, την ημέρα απόρριψης το MRS ήταν $6,55 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ενώ στο TSA (OMX) ήταν $5,25 \log_{10} \text{ cfu/g}$. Η μικρότερη τιμή στο υλικό γενικής χρήσης σε σχέση με το εκλεκτικό πιθανόν οφείλετε στην αδυναμία των οξυγαλακτικών να αναπτυχθούν καλά στο TSA. Επομένως, τα Οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS) έχουν χαρακτηριστεί ως οι ΕΑΜ των μαριναρισμένων ιχθύων που προέρχονται από εύκρατα ύδατα και συντηρούνται υπό κενό σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Πιο συγκεκριμένα η OMX για την 1 ημέρα του δείγματος ήταν $3,04 \log_{10} \text{ cfu/g}$, που υποδηλώνει σύμφωνα με τους Papadopoulos *et al.*, (2003), καλή ποιότητα σάρκας για τους φρέσκους ιχθύες που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες. Όμως, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλιεύοντες ιχθύες έχουν διαφορετικούς βακτηριακούς πληθυσμούς σε σχέση με τους καλλιεργημένους ενώστο σημείο οργανοληπτικής απόρριψης με την OMX να κυμαίνεται από 7 έως $8 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (Gram and Huss, 1996; Ólafsdóttir *et al.*, 2006). Οι Kyra and Lougonois, (2002) αναφέρουν πως η OMX ξεπέρασε τους $7,00 \log_{10} \text{ cfu/g}$ μετά από 9 ημέρες, για απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Οι Cakli *et al.*, (2006), υποστηρίζουν πως η OMX υπερέβη τα $7,00 \log_{10} \text{ cfu/g}$ μετά από 9 ημέρες, για απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού που είχαν αποθηκευτεί στους $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, για την τσιπούρα και το λαβράκι. Με βάση τους Gram and Huss, (1996), και με τα αποτελέσματα του πειράματος μας μπορούμε να πούμε ότι η αποθήκευση των ιχθύων στην συντήρηση, είχε τα ίδια αποτελέσματα όσον αφορά τον τελικό μικροβιακό πληθυσμό με την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός του μεγαλύτερου εμπορικού χρόνου ζωής που προκύπτει λόγω του μαριναρίσματος οι ιχθύες έχουν επίσης διαφορετικές κατηγορίες βακτηριακών πληθυσμών αλλά στο σημείο οργανοληπτικής απόρριψης, η OMX κυμαίνεται από 7 έως $8 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (Gram and Huss, 1996). Με αυτόν τον τρόπο συμπεραίνουμε ότι η OMX αποτελεί έναν τρόπο εκτίμησης της ποιότητας των τροφίμων.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τους ΕΑΜ στους ιχθύες της παρούσας εργασίας, με την σταδιακή αύξησή της καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός της τελευταία μέτρησης. Η αρχική τιμή τους για το δείγμα ήταν $2,68 \log_{10} \text{ cfu/g}$. Την

32 ημέρα όπου το δείγμα απορρίφθηκε από οργανοληπτικά χαρακτηριστικά η συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν $5,92 \log_{10}\text{cfu/g}$ για το δείγμαόπως και την 24 ημέρα που απορρίφθηκαν η συγκέντρωση του ήταν $5,56 \log_{10}\text{cfu/g}$. Σε συνθήκες όμως ψύξης τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται βραδέως σε αερόβιες συνθήκες ψύξης (Huisin'tVeld, 1996), ενώ κυριαρχούν υπό συνθήκες κενού σε ιχθύες που έχουν υποστεί κάπνιση κατά το τέλος της περιόδου αποθήκευσης (Leroi *et al.*, 1998).

Η αλλοίωση των φιλέτων δεν προέρχεται μόνο από τους δύο παραπάνω παράγοντες αλλά και από άλλους, όπως είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. και από υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια ανάλογα με τον τόπο προέλευσης όπως και από τον τρόπο αποθήκευσης τους (Gram and Huss, 1996). Όπως προαναφέραμε παραπάνω, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι ιχθύς που προέρχονται από εύκρατα και τροπικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες, εντοπίζουμε την ποσότητα των *Pseudomonas* spp σε υψηλούς πληθυσμούς (Gram *et al.*, 1990, Papadopoulou *et al.*, 2003, Taliadourou *et al.*, 2003, Parlapani *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα, τα *Pseudomonas* spp αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς σε ιχθύες όπως η τσιπούρα και το λαβράκι σύμφωνα με τους Papadopoulos *et al.*, (2003) Taliadourou *et al.*, (2003), Paleologos *et al.*, (2004), Koutsoumanis, (2002), Tryfinopoulou *et al.*, (2007), Parlapani *et al.*, (2014, 2015b).

Επιπρόσθετα, στο θρεπτικό υλικό ΙΑ που αναπτύσσονται τα υδροθειούχα βακτήρια (H_2S) με πληθυσμούς, την ημέρα απόρριψης, λόγω οργανοληπτικών μετρήσεων, ήταν $4,01 \log_{10}\text{cfu/g}$ για το δείγμα και την 24 ημέρα $3,14 \log_{10}\text{cfu/g}$. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε οι συγκεντρώσεις των *Pseudomonas* spp ήταν μεγαλύτερες από τα υδροθειούχα βακτήρια. Αυτή η διάφορα έγινε και αντίστοιχα στην εργασία των Taliadourou *et al.*, (2003) που αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των συγκεκριμένων βακτηρίων άγγιξε τους $7,00 \log_{10}\text{cfu/g}$ σε φιλέτα λαβρακιού αποθηκευμένα στους 0°C , ενώ προτείνεται πως εμπλέκονται στην αλλοίωση ιχθύων λαβρακιού, χωρίς να έχουν ταυτοποιηθεί οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (Kyra and Lougonois, 2002).

Για να ολοκληρώσουμε με τους μικροοργανισμούς που παρατηρήθηκαν στο πείραμα αυτό, επισημαίνουμε και τα βακτήρια τους γένους Enterobacteriaceae. Οι πληθυσμιακές συγκεντρώσεις των βακτηρίων, την ημέρα απόρριψης, λόγω οργανοληπτικών μετρήσεων, ήταν $1,95 \log_{10}\text{cfu/g}$ για το δείγμα και την 24 ημέρα $1 \log_{10}\text{cfu/g}$. Τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae έχουν αναφερθεί πως

αποτελούν μέρος του βακτηριακού πληθυσμού αλλοίωσης των ιχθύων που προέρχονται από εύκρατα ύδατα (συμπεριλαμβανομένης και της Μεσογείου), αλλά οι πληθυσμοί τους καταγράφονται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα (Papadopoulos *et al.*, 2003, Paleologos *et al.*, 2004).

Τέλος όσο αναφορά τις τιμές του pH δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η τιμή του pH στους ζωντανούς ιχθύες είναι κοντά στο 6.5, ενώ ύστερα από τη συλλογή και αποθήκευσή τους το pH μπορεί να διαφέρει σημαντικά εφόσον διότι εξαρτάται από την εποχή, το είδος και άλλους παράγοντες (Cakli *et al.*, 2006). Το μαρινάρισμα μείωσε το pH στην τιμή 4.35 ενώ την ημέρα απόρριψης, λόγω οργανοληπτικών μετρήσεων, ήταν 4.4 ενώ στο πέρας της περιόδου αποθήκευσης αυξήθηκε αλλά όχι ιδιαίτερα πολύ, καταγράφοντας τιμές 4.5.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με την βιβλιογραφία που συναντήσαμε διαφέρει σημαντικά. Η συντήρηση των φιλέτων υπό κενό οξύ και με την αποθήκευση στην συντήρηση του ψυγείου, μας έδειξε ότι οι επικρατέστεροι αλλοιωμένοι μικροοργανισμοί ήταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS) σε αντίθεση με τα νωπά αλιευμάτα, όπου οι επικρατέστεροι αλλοιωμένοι μικροοργανισμοί είναι τα βακτήρια *Pseudomonas spp.* και δευτερευόντως τα υδροθειούχα (H_2S) βακτήρια. Αυτό οφείλεται προφανώς στο γεγονός ότι οι συνθήκες χαμηλού pH της σάρκας λόγω του μαρινάρισματος ευνοεί την αύξηση μικροοργανισμών που ανθίστανται σε αυτό όπως είναι τα οξυγαλακτικά (Bozaris *et al.*, 2013).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση, λοιπόν, τις μικροβιακές έρευνες και της οργανοληπτικής αξιολόγησης, ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων είναι στις 24 ημέρες, ενώ ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης είναι στις 32 ημέρες.

Επιπρόσθετα, η ψύξη και το κιτρικό οξύ είναι ένα μέσο για τη διατήρηση των ιχθύων πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση. Όταν ένας ιχθύς αποθηκεύεται σε κιτρικό οξύ και μετά τοποθετείται το ψυγείο, τόσο οι ενζυμικές όσο και η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνονται. Αυτός ο συνδυασμός είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος συντήρησης και παράτασης της διάρκειας ζωής.

Τέλος, λόγω της επιθυμίας των καταναλωτών για έτοιμα μεταποιημένα προϊόντα, τα όποια δεν χρειάζονται περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού ή μαγειρέματος, με εκτεταμένη διάρκεια ζωής έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες (συμπεριλαμβανομένης και της παρούσης) με σκοπό διαφορετικές στρατηγικές συντήρησης για να διατηρήσουν ή να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των νωπών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των αλιευτικών, για να εξασφαλισθεί η ασφάλειά τους.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K. (1996).** Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36 (1 & 2): 87-121
2. **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.
3. **Boziaris I.S. , A. Stamatiou, K. and G.-J. E. Nychas (2013).** Microbiological aspects and shelf life of processed seafood products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1184-1193
4. **Cakli, S., Kilinc, B., Cadum, A., Tolasa, S. (2007).** Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control* 18. 391-397.
5. **Cakli, S., Kilinc, B., Dincer, T., Tolasa, S. (2006).** Effect of uncutting on (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 719-726.
6. **Colwell, R. R., & Liston, J. (1960).** Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied microbiology*, 8(2), 104.
7. **Dainty, R. H. (1996).** Chemical/biochemical detection of spoilage. *International journal of food microbiology*, 33(1), 19-33.
8. **Dalgaard, P., Mejlholm, O., Christiansen, T. J., & Huss, H. H. (1997).** Importance of Photobacterium phosphoreum in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 24(5), 373-378.
9. **Domingo, J. L. (2007).** Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold?. *Environment International* 33. 993-998.
10. **Drosinos, E. H., Lambropoulou, K., Mitre, E., Nychas, G. J. E. (1997).** Attributes of fresh gilt-head seabream (*Sparus aurata*) fillets treated with potassium sorbate, sodium gluconate and stored under a modified atmosphere at 0±1 °C. *Journal of Applied Microbiology* 83. 569-575.

11. **Erkan, N., & Özden, Ö. (2008).** Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *International journal of food science & technology*, 43(9), 1549-1559.
12. **FAO, 2007.** Future prospects for fish and fishery products. 4. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030. Part 1. European overview, FAO Fisheries Circular No. 972/4, Part 1, Food and Aquaculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
13. **FAO, 2012.** The state of world fisheries and aquaculture 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Aquaculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
14. **Gill, C. O. (1996).** Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats. *Meat Science*. Vol. 43, No. S, S99-S109
15. **Gillespie, N. C., & Macrae, I. C. (1975).** The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, 39(2), 91-100.
16. **Gould, G. W. (1989).** *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Elsevier Applied Science.
17. **Gram, L. (1992).** Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *International Journal of Food Microbiology* 16. 25-39.
18. **Gram, L. and Dalgaard, P. (2002).** Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13. 262-266.
19. **Gram, L. and Huss, H. H. (1996).** Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33. 121-137.
20. **Gram, L., Trolle, G., Huss, H. H. (1987).** Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 4. 65-72.
21. **Gram, L., Wedell-Neergaard, C., Huss, H. H. (1990).** The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology* 10. 303-316.
22. **Herbert, R. A., & Shewan, J. M. (1975).** Precursors of the volatile sulphides in spoiling North Sea cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(8), 1195-1202.
23. **Herbert, R. A., & Shewan, J. M. (1976).** Roles played by bacterial and autolytic enzymes in the production of volatile sulphides in spoiling North Sea

- cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(1), 89-94.
24. **Huis in't Veld, J. H. J. (1996)**. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33. 1-18.
 25. **Jay, J. M. (2000)**. *Modern Food Microbiology-Sixth Edition*. Part III: Microorganisms in Foods. Sea Foods. 101-113. Part V: Indicators of Food Safety and Quality-Principles of Quality Control and Microbial Criteria. 387-442.
 26. **Koutsoumanis, K., Giannakourou, M. C., Taoukis, P. S., Nychas, G. J. E. (2002)**. Application of shelf-life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *International Journal of Food Microbiology* 73. 375-382.
 27. **Kyranas, V. R., & Lougovois, V. P. (2002)**. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International journal of food science & technology*, 37(3), 319-328.
 28. **Leduc, F., Tournaye, P., Kondjoyan, N., Mercier, F., Malle, P., Kol, P., Berdagué, J. L., Duflos, G. (2012)**. Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry* 131. 1304-1311.
 29. **Leisner, J. J., Pot, B., Christensen, H., Rusul, G., Olsen, J. E., Wee, B. W., & Ghazali, H. M. (1999)**. Identification of lactic acid bacteria from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 599-605.
 30. **Leistner, L., & Gorris, L. G. (1995)**. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 41-46.
 31. **Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998)**. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 °C. *International Journal of Food Microbiology* 39. 111-121.
 32. **Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X., Li, X., Zhao, J. (2012)**. Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chemistry* 135. 140-145.
 33. **Liston, J. (1980)**. Microbiology in fishery science. In *Advances in fish science and technology: papers presented at the Jubilee conference of the Torry Research Station, Aberdeen, Scotland, 23-27 July 1979*, edited by JJ Connell

- and staff of Torry Research Station. Farnham, Surrey, England, Fishing News Books, 1980..*
34. **Morita, R. Y. (1975).** Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39(2), 144.
 35. **Mossel, D. A. A. (1983).** Seventy-five years of longitudinally integrated microbiological safety assurance in the dairy industry in the Netherlands. *Netherlands milk and dairy journal*.
 36. **Ólafsdóttir, G., Lauzon, H. L., Martinsdóttir, E., Kristbergsson, K. (2006).** Influence of storage temperature on microbial spoilage characteristics of haddock fillets (*Melanogrammus aeglefinus*) evaluated by multivariate quality prediction. *International Journal of Food Microbiology* 111. 112-125.
 37. **Paleologos, E. K., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2004).** Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiology* 21. 549-557.
 38. **Parlapani Foteini, F. and Ioannis S. Boziaris (2016).** Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT-Food Science and Technology*, 553–55
 39. **Parlapani Foteini, F., Konstantinos Ar. Kormas and Ioannis S. Boziaris (2015a).** Microbiological changes, shelf-life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2386-2394
 40. **Parlapani Foteini F., Serkos A. Haroutounian, George-John E. Nychas, Ioannis S. Boziaris (2015b).** Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 20C. *Food Microbiology*, 50, 44-53
 41. **Parlapani F. F., Malouchos A., Haroutounian S. A. & I. S. Boziaris (2014).** Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189, 153–163.

42. **Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2003).** Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology* 20. 411-420.
43. **Sallam, K. I. (2007).** Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry* 101. 592-600
44. **Selli, S., & Cayhan, G. G. (2009).** Analysis of volatile compounds of wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by simultaneous distillation–extraction (SDE) and GC–MS. *Microchemical Journal*, 93(2), 232-235.
45. **Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. (2001).** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022.
46. **Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Domvridou, E., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2003).** Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83. 1373-1379
47. **Taoukis, P. S., Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. E. (1999).** Use of time–temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1), 21-31.
48. **Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Vancanneyt, M., Koste, B., Swings, J., Nychas, G. J. E. (2007).** Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. *Journal of Applied Microbiology* 103. 711-721.

6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

1. **Κλαουδάτος, Σ. Α. και Κλαουδάτος, Δ. Σ. (2012).** Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφή υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Εισαγωγή. σελ. 13. Κεφάλαιο 3: Αναπαραγωγή – εκτροφή ιχθύων θαλασσίων υδάτων. Εκτροφή ευρύαλων ειδών ιχθύων. 228-260. Εκδόσεις Προπομπός.
2. **Μπλούκας, Ι. Γ. (2004).** Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή. Σελ. 21-43. Κεφάλαιο 9: Ψύξη. 219-246. Εκδόσεις Σταμούλη.
3. **Μποζιάρης, Ι. Σ. (2010).** Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Έκδοση 2.. Κεφάλαιο 2: Μεταθανάτιες μεταβολές. 36. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.
4. **Παπουτσόγλου, Σ. Ε. (2008).** Διατροφή Ιχθύων. Κεφάλαιο 10: Προτεινόμενες προδιαγραφές σιτηρεσίων-τροφών εκτρεφόμενων ειδών ιχθύων. 824-845 και 846-870. Εκδόσεις Σταμούλης.

6.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

https://www.google.gr/search?q=sparus+aurata&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=pcThU8myI8G47AbHvoCwDw&sqi=2&ved=0CAYQ_AUoAQ&biw=1366&bih=667#facrc=_&imgdii=KTW0g2jGBxXzZM%3A%3BDnWEUYQemUyWdM%3BKTW0g2jGBxXzZM%3A&imgrc=KTW0g2jGBxXzZM%253A%3BjMGRHKBc0VNt0M%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.murre.nl%252Fimages%252Ftranslator%252F1%252Fsparus_aurata_bon.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.murre.nl%252Fenglish%252Ftranslator.asp%3B300%3B143

<http://www.fishbase.org/summary/Sparus-aurata.html>

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es