

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**«ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»**

**“Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής**

**φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*, L.)**

**κατά την αποθήκευσή τους σε υπερψύξη .”**

**ΜΛΑΔΕΝΗ ΣΟΦΙΑ**

**ΒΟΛΟΣ, 2017**

“ Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής  
φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*, L.)  
κατά την αποθήκευση τους σε υπερψύξη .”

**"Microbiological changes and shelf life of European sea bass  
(*Dicentrarchus labrax*, L.) fillets stored at superchilling."**

## Διμελής Εξεταστική επιτροπή

1. **Ιωάννης Μποζιάρης** (M.Sc., Ph.D.), Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινής και Συντήρησης Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων.*
2. **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης** (M.Sc., Ph.D.), Επίκουρος Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος.*

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής μελέτης, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Κ. Ιωάννη Μποζιάρη, Αναπληρωτή Καθηγητή, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, τόσο για την ανάθεση της πτυχιακής μελέτης, όσο και για την επίβλεψη και τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά την συγγραφή της, στοιχεία απαραίτητα για την περαίωση της.

Επίσης, θερμά ευχαριστώ το δεύτερο μέλος τον Κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη Επίκουρο Καθηγητή, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, που δέχθηκε να συμμετάσχει στην εξεταστική επιτροπή και να αξιολογήσει την πτυχιακή μου μελέτη.

Θερμά ευχαριστώ και την Κα Παρλαπάνη Φωτεινή Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για τη συμβολή της στην επεξήγηση των πειραματικών μου αποτελεσμάτων.

Τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω επίσης και στον Σωτήρη Οικονόμου υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για την πολύτιμη του βοήθεια του κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη αλλά και για την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νωπά ψάρια χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα ευαλοίωτα λόγω της μικρής διάρκειας ζωής τους και της υψηλής και άμεσης ευπάθειάς τους. Η αλλοίωση αυτή οφείλεται κυρίως στη μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι υπάρχουν σε αφθονία στο δέρμα/εντόσθια του ψαριού. Η δράση των ανωτέρω μικροοργανισμών συντελεί ώστε μεγάλος μέρος των αλιευμάτων να μετατρέπονται σε προϊόντα ακατάλληλα προς κατανάλωση λόγω της δυσάρεστης οσμής και γεύσης τους. Για την αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων αυτών και την προστασία τους από μικροβιακές αλλοιώσεις σήμερα χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι επεξεργασίας και αποθήκευσης, και μια από αυτές είναι η αποθήκευση σε υπερψύξη. Πιο συγκεκριμένα, όταν ένας ιχθύς αποθηκεύεται σε χαμηλή θερμοκρασία, τόσο οι ενζυμικές/ χημικές αντιδράσεις όσο και η μικροβιακή ανάπτυξη, επιβραδύνονται. Υπερψύξη είναι η αποθήκευση των ιχθύων σε θερμοκρασίες λίγο χαμηλότερα από τους 0°C, (από -0.5 έως και -2.5°C ) ώστε μόνο ένα ποσοστό του νερού των ιστών να έχει κρυσταλλωθεί.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, το πεδίο έρευνας επικεντρώθηκε στη συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων συντήρησης σε χαμηλές θερμοκρασίας ως τεχνικές συντήρησης των φιλέτων λαυρακιού [υπερψύξη (-1,5°C) και σε κανονική θερμοκρασία συντήρησης 2°C]. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε σε δύο βάσεις, πρώτα μικροβιακά, καθώς οι μικροοργανισμοί που διαβιούν πάνω στο λαβράκι, είναι οι κυρίως υπεύθυνοι για την αλλοίωση του λαβρακιού. Σε δεύτερη βάση έγινε σύγκριση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, προκειμένου να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος των διαφορετικών μεθόδων συντήρησης στο καταναλωτικό κοινό. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα *Pseudomonas spp.* δύναται να χαρακτηριστούν ως οι Ειδικόι Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) των ιχθύων λαβρακιού που προέρχονται από

εύκρατα μεσογειακά ύδατα και έχουν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης και υπερψύξης.

Σχετικά με την εφαρμοζόμενη μέθοδο συντήρησης, η έρευνα έδειξε ότι η αποθήκευση των λαβρακίων σε συνθήκες υπερψύξης είναι αποτελεσματική μέθοδος διατήρησης των ιχθύων πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωσή τους, αφού ο εμπορικός χρόνος ζωής στα συντηρούμενα φιλέτα λαβρακίου στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$  ήταν κατά μεγαλύτερος κατά 7 μέρες συγκριτικά με τον αντίστοιχο στις σύνθηκες ψύξης.

**Λέξεις κλειδιά:** μικροβιολογική αλλοίωση, λαβράκι, υπερψύξη, εμπορικός χρόνος ζωής

## ABSTRACT

Fresh fish is very perishable with short shelf-life.. Their spoilage is due mainly to the metabolic activity of spoilage microorganisms. Microorganisms contaminate the skin, gills and intestines of fish. Their activity alter fish flavour and taste making them unpleasant for consumption .

To increase shelf-life various processing methods are applied by the seafood industry, such as superchilling. Storage at low temperatures inhibits enzymic/chemical and microbial activity. Superchilling is the storage of fish at temperatures just below 0°C (form -0.5 to -2.5°C) to cause only a part of tissues water to crystallize.

In this final year dissertation, the aim was to compare storage at chilling (2°C) and superchilling (-1.5°C) temperatures on quality and shelf-life of European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets by monitoring microbiological and sensory changes.

*Pseudomonas spp.* were the dominant spoilage microorganisms. Shelf-life of superchilled fillets was extended by 7 days compared to the traditional chilling storage

**Keywords:** microbiological spoilage, shelf-life, European sea bass, superchilling



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Εισαγωγή .....   | 10 |
| 1.1.   | Το λαβράκι ( <i>Dicentrarchus labrax</i> , L.) .....                   | 10 |
| 1.1.1. | Περιγραφή είδους .....   | 10 |
| 1.1.2. | Η βιολογία του λαβρακιού .....   | 11 |
| 1.1.3. | Η εκτροφή του είδους .....   | 13 |
| 1.1.4. | Εντατική εκτροφή .....   | 14 |
| 1.2.   | Μικροβιακές αλλοιώσεις .....   | 15 |
| 1.2.1. | Αρχές μικροβιακής αλλοίωσης .....                                      | 16 |
| 1.2.2. | Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων αποθηκευμένων υπό χαμηλές θερμοκρασίες ..... | 20 |
| 1.2.3. | Προϊόντα Μικροβιακού Μεταβολισμού-Χημικοί Δείκτες Ποιότητας .....      | 23 |
| 1.2.4. | Χρόνος εμπορικής ζωής ιχθυρών .....                                    | 27 |
| 1.3.   | Υπερψύξη ιχθυρών .....   | 29 |
| 1.3.1. | Κατάψυξη .....   | 29 |
| 1.3.2. | Κρυσταλλοποίηση υγρής φάσης και σχηματισμός πυρήνων κρυστάλλωσης ..... | 31 |
| 1.3.3. | Υπερψύξη ιχθύων .....  | 32 |
| 1.3.4. | Μέθοδοι υπερψύξης .....  | 35 |
| 1.4.   | Σκοπός παρούσας εργασίας .....   | 38 |
| 2.     | Υλικά και Μέθοδοι .....  | 39 |
| 2.1.   | Πειραματικός σχεδιασμός .....  | 39 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.2. Μικροβιακές αναλύσεις.....</b>           | <b>39</b> |
| <b>2.2.1. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών.....</b> | <b>39</b> |
| <b>2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων .....</b>       | <b>45</b> |
| <b>2.2.3. Τεχνική επίστρωσης τρυβλίων.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>2.2.4. Επώαση δειγμάτων .....</b>             | <b>46</b> |
| <b>2.3. Οργανοληπτική ανάλυση.....</b>           | <b>47</b> |
| Ελαφριά έλλειψη λαμπρότητας.....                 | 48        |
| <b>3. Αποτελέσματα .....</b>                     | <b>49</b> |
| <b>3.1. Μικροβιολογική αξιολόγηση.....</b>       | <b>49</b> |
| <b>3.2. Οργανοληπτικές αναλύσεις.....</b>        | <b>52</b> |
| <b>4. Συζήτηση .....</b>                         | <b>56</b> |
| <b>5. Συμπεράσματα .....</b>                     | <b>62</b> |
| <b>6. Βιβλιογραφία .....</b>                     | <b>63</b> |

## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*, L.)

#### 1.1.1. Περιγραφή είδους

Το λαβράκι είναι οστεϊχθύς της τάξης Perciformes, της οικογένειας Serranidae και του γένους *Dicentrarchus*. Στο γένος αυτό ανήκουν τα είδη *Dicentrarchus labrax* Linneus 1758 και *Dicentrarchus punctatus* Bloch 1792. Το εκτρεφόμενο λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*, διαφοροποιείται από το *Dicentrarchus punctatus* με βάση τα παρακάτω στοιχεία (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

Αρχικώς το *D. punctatus* παρουσιάζει σκοτεινές κηλίδες στη ράχη και στα πλευρά, οι οποίες είναι μόνιμες καθ' όλη τη ζωή του. Αντίθετα, το *D. labrax* παρουσιάζει τέτοιες κηλίδες μόνο κατά το πρώτο και σπάνια κατά το δεύτερο έτος της ζωής του, ενώ από το τρίτο έτος και μετά οι κηλίδες αυτές εκλείπουν (Εικόνα 1). Επίσης τα δόντια της ινιακής περιοχής του ουρανίσκου του *D. Punctatus* καταλαμβάνουν όλη την περιοχή, σχηματίζοντας ένα είδος κλειστού τόξου, ενώ στο *D. labrax* εμφανίζονται μόνο στο πρόσθιο μέρος του ουρανίσκου, σχηματίζοντας ένα τμήμα ανοιχτού τόξου.

Τέλος στο *D. punctatus* η διάμετρος του ματιού σε σχέση με τη μεσοκογχική απόσταση είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του *D. Labrax*. Το λαβράκι είναι ένας ευρύαλος ιχθύς μεσαίου μεγέθους με επίμηκες σώμα. Το μήκος του είναι περίπου 50 cm, ενώ μπορεί να φτάσει μέχρι το 1 μέτρο. Στο επάνω μέρος της κεφαλής φέρει κυκλοειδή λέπια. Το στόμα του είναι αιχμηρό και προεξέχει ελαφρά. Παρουσιάζει μικρά δόντια στις σιαγόνες και στον ουρανίσκο και δεν έχει κυνόδοντες. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι διπλό και το πρώτο τμήμα του φέρει 8-10 σκληρές ακτίνες, ενώ το δεύτερο 1 σκληρή και 11-14 μαλακές ακτίνες. Το ουραίο πτερύγιο είναι μέτρια διχαλωτό. Το σώμα του

λαβρακιού καλύπτεται από μικρά λέπια και στην πλευρική γραμμή, η οποία είναι εκτεταμένη δίχως να φτάνει στην ουρά, υπάρχουν 71-72 λέπια.



**Εικόνα 1.** Το ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

([https://en.wikipedia.org/wiki/European\\_bass](https://en.wikipedia.org/wiki/European_bass))

### **1.1.2. Η βιολογία του λαβρακιού**

Το λαβράκι συναντάται στον Ατλαντικό ωκεανό, από τις ακτές του Μαρόκου ως τη Βαλτική θάλασσα (Εικόνα 2). Επίσης συναντάται σε κάθε περιοχή της Μεσόγειου και των γύρω θαλασσών, εισχωρώντας στις εκβολές των ποταμών και στις λιμνοθάλασσες. Ζει γενικά κατά μήκος των βραχωδών περιοχών, συχνά όμως, και ιδίως σε περιπτώσεις κακοκαιρίας, καταφεύγει σε αμμώδεις περιοχές. Προσαρμόζεται και αναπτύσσεται εύκολα ακόμα και σε γλυκά νερά. Οι ιδανικές συνθήκες αλατότητας για άριστη ανάπτυξη είναι 20–30‰. Η θερμοκρασία στην οποία διατρέφεται είναι 7-30°C με ιδανικό εύρος τους 14-28°C. Σε θερμοκρασίες κάτω των 7°C παύει να τρέφεται, ενώ κάτω των 2°C πεθαίνει (Χώτος και Ρογδάκης 1992). Αυτοί άλλωστε είναι και οι λόγοι για τους οποίους αναγκάζεται να μεταναστεύει όταν παρουσιάζονται μεγάλες μεταβολές θερμοκρασίας και αλατότητας.

Το λαβράκι είναι σαρκοφάγο και αρπακτικό είδος. Τα χαρακτηριστικά αυτά υποδεικνύονται από τον τύπο πέψης, τα είδη των ενζύμων που εκκρίνονται στον

πεπτικό σωλήνα και τον τύπο των δοντιών. Το λαβράκι κυνηγά ατομικά στο επιφανειακό υδάτινο στρώμα και, αφού επιλέξει τη λεία του, της επιτίθεται από κάτω, την αρπάζει και απομακρύνεται.



**Εικόνα 2:** Γεωγραφική εξάπλωση του λαβρακιού (<http://www.fao.org/fishery/species/2291/en>)

Στο φυσικό περιβάλλον τους, τα νεαρά λαβράκια τρέφονται κυρίως με αμφίποδα αλλά και διάφορες προνύμφες εντόμων (χειρονομίδες) και άλλα ασπόνδυλα, ενώ, όσο αυξάνεται η ηλικία τους, τρέφονται όλο και περισσότερο με μικρού μεγέθους ιχθύς, όπως αθερίνες (*Atherina boyeri*), σαρδέλες (*Sardina pilchardus*) και μικρά κεφαλόπουλα (*Mugil cephalus*), αλλά και καρκινοειδή και μαλάκια. Έρευνες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφής είναι μεγαλύτερη κατά τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Αύγουστο (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

Το λαβράκι είναι γονοχωριστικό είδος. Τα ώριμα γεννητικώς αρσενικά άτομα έχουν ηλικία 2-3 έτη και μήκος σώματος 23-24 cm, ενώ τα θηλυκά έχουν ηλικία 3-5 έτη και μήκος σώματος 31-40 cm. Η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Το θηλυκό ελευθερώνει τα αυγά του, τα οποία γονιμοποιούνται από το σπέρμα του αρσενικού. Η σεξουαλική συμπεριφορά είναι ίδια στο φυσικό περιβάλλον και σε δεξαμενές (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

Η αναπαραγωγή του λαβρακιού γίνεται κοντά στις εκβολές των ποταμών, σε βραχώδεις παράκτιες περιοχές. Στη Μεσόγειο, η ωρίμανση των γονάδων αρχίζει το Δεκέμβριο και ολοκληρώνεται τον Ιανουάριο, με θερμοκρασία νερού περίπου 12°C. Στο στάδιο αυτό αρχίζει η αναπαραγωγή, η οποία ολοκληρώνεται στις αρχές Απριλίου. Αντίθετα, στον Ατλαντικό ωκεανό η περίοδος αναπαραγωγής είναι κατά 2-3 μήνες αργότερα (Χώτος και Ρογδάκης 1992). Από τα αυγά εκκολάπτονται οι νύμφες, οι οποίες, μετά από μερικές ημέρες, μεταμορφώνονται σε ιχθύδια. Την άνοιξη τα ιχθύδια καταφεύγουν κυρίως σε εκβολές ποταμών ή λιμνοθάλασσες, όπου η θερμοκρασία του νερού είναι κατά κανόνα μεγαλύτερη εκείνης της θάλασσας, η αλατότητα μικρότερη και το νερό περισσότερο εύτροφο. Στη συνέχεια, μετακινούνται προς την ανοικτή θάλασσα, κυρίως λόγω καλύτερης δυνατότητας ανεύρεσης τροφής και μεγαλύτερης σταθερότητας των συνθηκών του περιβάλλοντος (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

### **1.1.3. Η εκτροφή του είδους**

Κατά το πρώτο έτος της ζωής τους στις λιμνοθάλασσες, τα νεαρά ιχθύδια αποκτούν βάρος 60-90 g, ενώ κατά το τρίτο έτος φθάνουν το εμπορεύσιμο βάρος των 350-400 g. Η συλλογή των ιχθύων αυτών γίνεται κατά την κάθοδό τους προς την ανοικτή θάλασσα με χρήση ιχθυοπαγίδων, οι οποίες τοποθετούνται κατάλληλα στο στόμιο επικοινωνίας της λιμνοθάλασσας με τη θάλασσα.

Η διαχείριση των λιμνοθαλασσών και η παραγωγή ιχθύων με τον τρόπο αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί ιχθυοκαλλιέργεια με την αυστηρή σημασία του όρου, επειδή ο εμπλουτισμός σε γόνιο είναι φυσικός, δεν χορηγείται τροφή άμεσα ή έμμεσα και δεν ελέγχονται οι συνθήκες του περιβάλλοντος. Εξέλιξη αυτού του συστήματος είναι η εκτατική, η ημιεντατική και η εντατική εκτροφή, δηλαδή η ανάπτυξη των ιχθυδίων σε

ελεγχόμενους χώρους χωρίς χορήγηση τροφής (εκτατική εκτροφή) ή με άμεση ή έμμεση χορήγηση τροφής τουλάχιστον σε κάποιο στάδιο της ζωής τους (ημιεντατική εκτροφή) ή με χορήγηση τροφής καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους (εντατική εκτροφή) (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

#### **1.1.4 Εντατική εκτροφή**

Το λαβράκι, όπως και η τσιπούρα, εκτρέφεται εδώ και πολλά έτη με παραδοσιακές εκτατικές μεθόδους, κατά τις οποίες τα ψάρια επιτρέπεται να εισέλθουν σε λιμνοθάλασσες. Ωστόσο, κατά τη δεκαετία του '60, οι επιστήμονες της Μεσογείου άρχισαν να αναπτύσσουν εντατικές μεθόδους εκτροφής βάσει πολύπλοκων τεχνικών εκκολαπτηρίου. Στα τέλη της δεκαετίας του '70, οι τεχνικές αυτές ήταν αρκετά αναπτυγμένες στις περισσότερες μεσογειακές χώρες.

Η λειτουργία ενός εκκολαπτηρίου είναι αρκετά τεχνική και απαιτεί ιδιαίτερος εκπαιδευμένο προσωπικό. Τα εκκολαπτήρια είναι συχνά ανεξάρτητα και πωλούν νεαρά ψάρια σε εκμεταλλεύσεις πάχυνσης.

Η αναπαραγωγή του λαβρακιού ελέγχεται πλήρως στην εγκατάσταση. Τα γονιμοποιημένα αυγά συλλέγονται στην επιφάνεια της δεξαμενής ωοτοκίας και τοποθετούνται σε δεξαμενές επώασης, όπου εκκολάπτονται. Στη συνέχεια, οι γόνοι μεταφέρονται σε δεξαμενές εκτροφής. Μόλις οι γόνοι απορροφήσουν το λεκιθικό σάκο τους, ακολουθούν μια πολύ συγκεκριμένη διατροφή που βασίζεται αρχικά σε μικροφύκια και ζωοπλαγκτόν και στη συνέχεια, καθώς μεγαλώνουν, στην αρτέμια (ένα μικρό οστρακοειδές). Αυτή η ζωντανή τροφή παράγεται πάντα στο εκκολαπτήριο. Μετά από έναν ή δύο μήνες, οι γόνοι μεταφέρονται στη μονάδα «απογαλακτισμού» όπου εξοικειώνονται σε τεχνητή διατροφή. Στη συνέχεια οι γόνοι μεταφέρονται στη

μονάδα ιχθυδίων, όπου τρέφονται με σβώλους. Μετά από δύο μήνες μπορούν να μετακινηθούν στη μονάδα πάχυνσης.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα ψάρια εκτρέφονται σε πλωτούς κλωβούς (ήτοι στη Μεσόγειο και τις Κανάριες Νήσους). Σε άλλες εκμεταλλεύσεις εκτρέφονται λαβράκια σε χερσαίες δεξαμενές χρησιμοποιώντας γενικά ένα σύστημα ανακυκλοφορίας που ελέγχει τη θερμοκρασία του νερού. Μερικές εκμεταλλεύσεις χρησιμοποιούν παραδοσιακές εκτατικές και ημι-εντατικές μεθόδους.

Τα εκτρεφόμενα λαβράκια αλιεύονται γενικά όταν ζυγίζουν από 300 έως 500 γραμμάρια, βάρος για το οποίο χρειάζονται από ενάμιση έως δύο χρόνια ανάλογα με τη θερμοκρασία του νερού (Χώτος και Ρογδάκης, 1992).

## 1.2. Μικροβιακές αλλοιώσεις

Η μικροβιολογική αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να πάρει ποικίλες μορφές, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών, η οποία τελικά γίνεται αντιληπτή μέσω των μεταβολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων (Gram and Huss 1996) (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1:** Μικροβιολογική αλλοίωση των ιχθυηρών (Gram and Huss 1996)

| <b>Μικροβιακή δραστηριότητα</b>                | <b>Οργανοληπτική εκδήλωση</b>   |
|--|---------------------------------|
| Αποικοδόμηση συστατικών του τροφίμου           | Παραγωγή δυσάρεστων οσμών       |
| Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαριτικού υλικού | Σχηματισμός “βλέννας”           |
| Ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων          | Ορατές οσμές ή άχρωμες αποικίες |



|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| Διοξείδιο του άνθρακα CO <sub>2</sub> από υδατάνθρακες<br>ή αμινοξέα | Παραγωγή αερίου                   |
| Παραγωγή χρωστικών που διαχέονται                                    | Αποχρωματισμός-Αλλαγή<br>χρώματος |

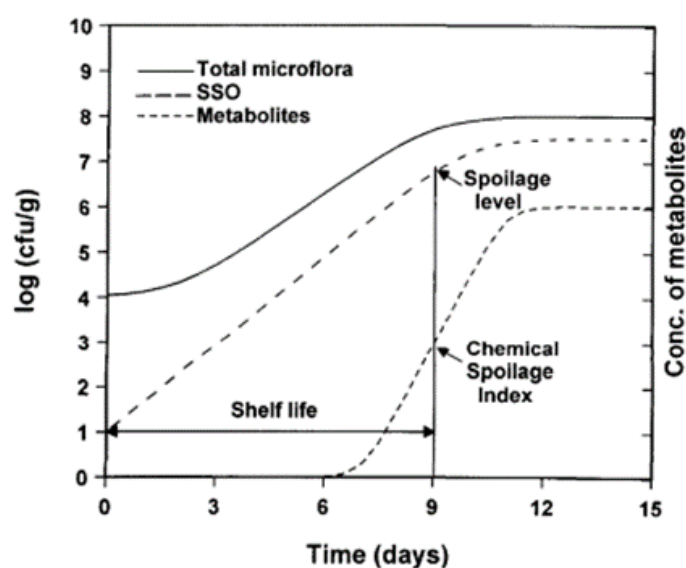
Η αρχική φυσική μικροχλωρίδα των νωπών τροφίμων αποτελείται από μια ποικιλία μικροοργανισμών. Ωστόσο, μόνο ένα μέρος από τους μικροοργανισμούς αυτούς είναι ικανό να αναπτυχθεί στα τρόφιμα και να φτάσει σε σχετικά μεγάλους πληθυσμούς. Ο όρος «ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί» (specific spoilage organisms-SSO) έχει υιοθετηθεί για τον χαρακτηρισμό του κλάσματος της συνολικής μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση (Gram and Huss 1996).

Ο ακριβής μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο μια ομάδα μικροβίων κυριαρχεί σε σχέση με μια άλλη δεν έχει γίνει ακόμα απόλυτα κατανοητός. Παρόλα αυτά, είναι γενικώς παραδεκτό, ότι έστω και μικρές αλλαγές στην επεξεργασία ή την συσκευασία των προϊόντων αλειίας είναι ικανές να προκαλέσουν δραματική μεταβολή της σύστασης και ανάπτυξης των SSO και κατά συνέπεια μια τελείως διαφορετική διαδικασία αλλοίωσης. Ακόμα και σε ίδιου τύπου προϊόντα, η αλλοίωση μπορεί να αναπτυχθεί διαφορετικά ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση του προϊόντος και άλλους άγνωστους παράγοντες που μπορεί να επιδρούν στην ανάπτυξη και μεταβολική δράση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Gram and Dalgaard 2002).

### 1.2.1. Αρχές μικροβιακής αλλοίωσης

Μια απλή μορφή αλλοίωσης είναι η περίπτωση όπου η ανάπτυξη των μικροοργανισμών έχει ως αποτέλεσμα ορατές οργανοληπτικές μεταβολές (μύκητες, παραγωγή χρωστικών

ουσιών, εμφανή βακτηριακές αποικίες). Στις περιπτώσεις αυτές υπάρχει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ του συνολικού αριθμού των μικροοργανισμών και του βαθμού αλλοίωσης. Τις περισσότερες φορές όμως η αλλοίωση είναι αποτέλεσμα μεταβολών στην οσμή και γεύση των τροφίμων. Οι μεταβολές αυτές συνήθως προέρχονται από την παραγωγή ουσιών (chemical spoilage index-CSI) οι οποίες είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των βακτηρίων. Ωστόσο, οι ουσίες που οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη (CSI) παράγονται μόνο από ένα μέρος της συνολικής μικροχλωρίδας, τους ειδικούς αλλοιογόνους οργανισμούς. Ως εκ τούτου οι ουσίες που παράγονται από την δράση των βακτηρίων δεν συμβάλλουν στην αλλοίωση των ιχθυηρών (Gram and Huss 1996). Μια γραφική απεικόνιση της έννοιας της μικροβιακής αλλοίωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1: Γενική περιγραφή της αλλοίωσης των ιχθυηρών (Gram and Huss, 1996).

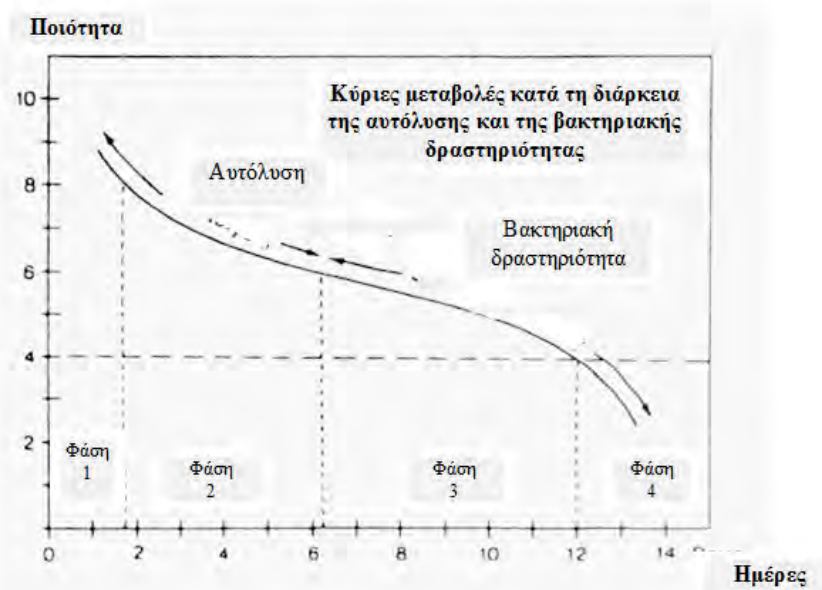
Πρέπει να τονιστεί ότι είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστεί ποια από τα βακτήρια που παρευρίσκονται σε ένα αλλοιωμένο προϊόν είναι αυτά που έχουν προκαλέσει την

αλλοίωση. Για τον σκοπό αυτό απαιτούνται εκτεταμένες αναλύσεις των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και φυσικοχημικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στο προϊόν κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Διάφοροι τύποι μικροοργανισμών θα πρέπει να απομονωθούν από το αλλοιωμένο τρόφιμο και να εμβολιαστούν σε στείρο ιστό ή μοντέλο υπόστρωμα για τον προσδιορισμό της αλλοιογόνου δυναμικής τους, δηλαδή της ικανότητας τους να παράγουν ουσίες που οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη (Gram et al. 1987). Η παραπάνω διαδικασία αν και είναι αρκετά πολύπλοκη είναι η μόνη που μπορεί να δώσει συγκριτικά αποτελέσματα με το πραγματικό προϊόν. Τέλος, οι επιλεγμένοι μικροοργανισμοί πρέπει να ελεγχθούν ως προς την αλλοιογόνο δράση τους, δηλαδή την κινητική της ανάπτυξης τους καθώς και την ποιοτική και ποσοτική παραγωγή των αλλοιογόνων ουσιών, στο υπό εξέταση προϊόν. Το παραπάνω στάδιο είναι πολύ σημαντικό αφού ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι ικανοί να παράγουν χημικές ουσίες που σχετίζονται με την αλλοίωση σε ένα ιδανικό περιβάλλον, αλλά να μην μπορούν να το κάνουν υπό τις συνθήκες που επικρατούν στο προϊόν (Gram et al. 1987). Έπίσης, ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να μην είναι ικανοί να παράγουν τέτοιες ουσίες σε στείρο ιστό παρά μόνο όταν ορισμένα συστατικά διασπαστούν από άλλα μέλη της φυσικής χλωρίδας του τροφίμου. Για το λόγο αυτό, σε μερικά προϊόντα η δυναμική αλλοίωσης και η δράση συγκεκριμένων στελεχών θα πρέπει να προσδιορίζεται και κατά τη συμβίωση του με τα υπόλοιπα μέλη της μικροχλωρίδας.

Η αρχική απώλεια της ποιότητας προκαλείται κατά κύριο λόγο από αυτολυτικές αλλαγές (π.χ. αποικοδόμηση ATP), ενώ η αποικοδόμηση του ενδιάμεσου νουκλεοτιδίου της μονοφωσφορικής ινοσίνης (IMP) είναι υπεύθυνη για την απώλεια της νοπής γεύσης. Οι αυτολυτικές διαδικασίες καθιστούν τους καταβολίτες διαθέσιμους για την

βακτηριακή ανάπτυξη (Gram and Huss, 1996). Η αυτολυτική, καθώς και η βακτηριακή δραστηριότητα, αυξάνουν τους καταβολίτες, δημιουργώντας αμίνες, αμμωνία ( $\text{NH}_3$ ), αλδεΐδες, υδρόθειο ( $\text{H}_2\text{S}$ ), μερκαπτάνες, ινδόλη, πτητικές βάσεις και οξέα. Δεδομένου ότι η δραστηριότητα εντείνεται, δημιουργούνται δύσοσμες ενώσεις και αυτές αντιλαμβάνεται ο καταναλωτής ως ενδεικτικό σημείο σήψης (Antoine *et al.*, 2007). Σύμφωνα με τους Gram and Huss, (1996), οι οσμές και οι γεύσεις σε έναν ιχθύ εξαρτώνται από το είδος και τη γεωγραφική προέλευση, με την αλλοίωση των ιχθύων από ύδατα της εύκρατης ζώνης να χαρακτηρίζεται από υδροθειούχες ( $\text{H}_2\text{S}$ ) οσμές. Ο χρόνος ζωής ενός νωπού ιχθύος, όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Εικόνα 3), μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 4 φάσεις (Huss, 1995):

- ΦΑΣΗ 1: Ο ιχθύς είναι πολύ φρέσκος, μυρίζει “θάλασσα” και έχει σχετικά γλυκιά, μεταλλική και εκλεπτυσμένη γεύση.
- ΦΑΣΗ 2: Υπάρχει απώλεια εκλεπτυσμένης γεύσης, δεν υπάρχουν όμως άσχημες οσμές, ενώ η υφή είναι ακόμα καλή.
- ΦΑΣΗ 3: Αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές διάφορες οσμές, λόγω παραγωγής τριμεθυλαμίνης (TMA). Κατόπιν, αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές οσμές αμμωνιακής φύσεως.
- ΦΑΣΗ 4: Οι ιχθύες χαρακτηρίζονται αλλοιωμένοι και απορρίπτονται.



**Εικόνα 3.** Στάδια υποβάθμισης της ποιότητας νωπών ιχθύων συντηρημένων σε πάγο (0°C). Το επίπεδο απόρριψης ορίζεται με την οριζόντια διακεκομμένη γραμμή που περνά από την τιμή 4 του κατακόρυφου άξονα (Προσαρμοσμένο από Huss, 1995).

### 1.2.2. Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων αποθηκευμένων υπό χαμηλές θερμοκρασίες

Η μικροβιακή χλωρίδα των φρέσκων ιχθυηρών εξαρτάται περισσότερο από το περιβάλλον και λιγότερο από το είδος τους (Huss, 1995). Η ενδογενής μικροχλωρίδα των ιχθυηρών που προέρχονται από ψυχρά και εύκρατα νερά έχει μελετηθεί για πολλά χρόνια με αποτέλεσμα να έχουν προκύψει γενικά συμπεράσματα αν και η ταξινομική κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί έχει υποστεί σημαντικές αλλαγές μέχρι σήμερα. Υπό κανονικές συνθήκες, η ενδογενής χλωρίδα των ιχθυηρών από εύκρατα κλίματα κυριαρχείται από Gram αρνητικούς βακίλους που κατά κανόνα ανήκουν στα γένη *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Vibrio* και *Aeromonas*. Gram θετικοί οργανισμοί όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Coryneforms* και *Clostridium* έχουν επίσης βρεθεί σε διάφορες αναλογίες. Η αναλογία των Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων

ποικίλει αλλά γενικά τα κατά Gram θετικά βακτήρια κυμαίνονται από 0-30% της συνολικής χλωρίδας (Huss, 1995). Ο συνολικός αριθμός των οργανισμών παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις. Ο Liston (1960) ανέφερε ότι ο αριθμός των Gram θετικών βακτηρίων μπορεί να κυμαίνεται από  $10^2$ - $10^7$  cfu/g.

Ο συνολικός πληθυσμός ιχθυηρών από εύκρατα κλίματα στο τέλος της διάρκειας ζωής τους και όταν αυτά συντηρούνται σε πάγο κυμαίνεται από  $10^7$ - $10^9$  cfu/g. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Shewanella putrefaciens* τα οποία αποτελούν το 80-100 % της συνολικής χλωρίδας των αλλοιωμένων ιχθυηρών (Huss, 1995). Αυτό πιστεύεται ότι συμβαίνει λόγω του μικρού χρόνου διπλασιασμού που παρουσιάζουν τα παραπάνω βακτήρια στις χαμηλές θερμοκρασίες (Huss, 1995).

Η *Shewanella putrefaciens* θεωρείται ότι είναι ο μικροοργανισμός που ανάγει το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) και παράγει τριμεθυλαμίνη η οποία λόγω της χαρακτηριστικής της οσμής προκαλεί την οργανοληπτική απόρριψη των ιχθυηρών (Jorgensen et al., 1988). Σύμφωνα με τα ερευνητικά αποτελέσματα των Dalgaard et al. (1993), ο ρόλος το TMA στην αλλοίωση των ιχθυηρών από τη βόρεια Ευρώπη, είναι σημαντική, ενώ ασήμαντη χαρακτηρίζεται για τα ιχθυήρα από τη Μεσόγειο (Koutsoumanis and Nychas, 2000). Το γεγονός αυτό αποδόθηκε είτε στον χαμηλό πληθυσμό της *Shewanella putrefaciens* που δεν την καθιστά ικανή να συναγωνιστεί τους μεγάλους πληθυσμούς των ανταγωνιστικών *Pseudomonas* (Gram and Melchiorson 1990) και την απουσία του *P. phosphoreum* (Koutsoumanis and Nychas 1999) είτε στην απουσία του TMAO η οποία είναι η πρόδρομη ουσία για την παραγωγή του TMA (Koutsoumanis and Nychas, 2000).

Κατά την αερόβια συντήρηση των ιχθυηρών αυτών, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν αναγνωριστεί ως οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (Koutsoumanis and Nychas 2000, Parlapani et al. 2013, Parlapani et al., 2015a; Parlapani, and Boziaris, 2016). Οι Parlapani and Boziaris, (2016) εξετάζοντας τον μικροβιακό πληθυσμό σε ιχθυηρά συντηρούμενα σε αερόβιες συνθήκες υπό θερμοκρασίες 0°C, 5°C, και 15°C, διαπίστωσαν πως η κυρίαρχη μικροβιακή χλωρίδα ήταν οι μικροοργανισμοί του γένους *Pseudomonas* sp. Ειδικότερα, στις αρχικές συνθήκες (t<sub>0</sub> ημέρα συντήρησης) το είδος *Pseudomonas fragi* ήταν το πολυπληθέστερο βακτήριο συγκριτικά με τον πληθυσμό των αντίστοιχων άλλων μικροοργανισμών (*Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter hormaechei*, *Chryseobacterium carnipullorum*). Στους συντηρούμενες ιχθύες υπό θερμοκρασίες 0° C και 5°C, οι ερευνητές παρατήρησαν πως το βακτήριο *P.fragi* ήταν επίσης επικρατές, ενώ το βακτήριο *P. fluorescens* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός σε θερμοκρασία 15 °C. Επικράτηση αυτού του είδους (*Pseudomonas fluorescens*) διαπίστωναν και οι Parlapani et al. (2015b) σε εκσπλαχνισμένη τσιπούρα. Κατά τη συντήρηση ιχθυηρών από τη Μεσόγειο σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες η σύσταση της χλωρίδας μεταβάλλεται σημαντικά. Σε προγενέστερη μελέτη οι Parlapani et al. (2014), εξετάζοντας τον μικροβιακό πληθυσμό σε φιλέτα τσιπούρας συντηρούμενες υπό διάφορες συνθήκες, διαπίστωσαν πως σε όλες τις περιπτώσεις τα είδη *Pseudomonas spp.* ήταν οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί αλλοίωσης του προϊόντος. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλα προϊόντα αλιείας που προέρχονται από θερμότερα κλίματα. Ωστόσο, σε συνθήκες συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας των φιλέτων τσιπούρας, οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ήταν σημαντικότερη η ανάπτυξη του *Brochothrix thermosphacta* και των γαλακτικών οξέων βακτηρίων (LAB)

υπό (MAP) (Parlapani et al. 2014). Σε σχετική μελέτη με φιλέτα λαυρακίου συντηρημένα σε θερμοκρασία 2 °C καθώς και σε συνθήκες MAP (CO<sub>2</sub>: 60%, O<sub>2</sub>: 10%, N<sub>2</sub>: 30%), οι Parlapani et al. (2015) διαπίστωσαν ότι τα είδη *Pseudomonas* καθώς και τα υδροθειούχα βακτήρια ήταν οι σπουδαιότεροι οργανισμοί μικροβιακής αλλοίωσης. Η ανάπτυξη των *Pseudomonas* παρεμποδίζεται και η κυρίαρχη χλωρίδα στο τέλος της διάρκειας ζωής αποτελείται κυρίως από κατά Gram θετικά βακτήρια όπως τα *Lactic acid bacteria* και *Brochothrix thermosphacta*. Η ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε διάφορα είδη Ελληνικών ιχθυηρών συσκευασμένα υπό ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> έχει διαπιστωθεί ότι συσχετίζεται άμεσα με την αλλοίωση (Koutsoumanis et al. 1997).

Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως έχει από πολλούς ερευνητές διαπιστωθεί ότι η αποθήκευση των νωπών αλιευμάτων σε ψύξη μετά την αλίευσή τους, παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ψυχρότροφου μικροβιακού πληθυσμού ο οποίος τελικά θα είναι και ο επικρατών πληθυσμός στο πέρας του χρόνου ζωής του προϊόντος (Parlapani and Boziaris.2015). Αντίθετα, σε αλιεύματα που αποθηκεύθηκαν και τελικά αλλοιώθηκαν σε υψηλότερες θερμοκρασίες η χλωρίδα στο τέλος του χρόνου ζωής τους κυριαρχείται από μεσόφιλα βακτήρια των γενών *Vibrio*, *Aeromonas* και της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (ICMSF, 2000)

### **1.2.3. Προϊόντα Μικροβιακού Μεταβολισμού-Χημικοί Δείκτες Ποιότητας**

Βάση της γενικής παραδοχής ότι η αλλοίωση των ιχθυηρών οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στη δράση των βακτηρίων, η μέτρηση του φορτίου των ειδικών αλλοιογόνων οργανισμών είναι μια χρήσιμη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ποιότητας των νωπών προϊόντων αλιείας. Ωστόσο, η χρήση των κλασσικών μικροβιολογικών μεθόδων στη βιομηχανία τροφίμων είναι περιορισμένη κυρίως λόγω



του μεγάλου χρονικού διαστήματος που απαιτείται για την παραλαβή των αποτελεσμάτων. Ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης είναι η εκτίμηση της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Στην πράξη, ο τρόπος αυτός σχετίζεται περισσότερο άμεσα με την αλλοίωση όπως την αντιλαμβάνεται ο καταναλωτής, αφού τα προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού είναι αυτά που προκαλούν τις οργανοληπτικές μεταβολές και οδηγούν στην απόρριψη του προϊόντος.

Ένας μεγάλος αριθμός μικρού μοριακού βάρους ουσιών παράγονται κατά τα τελευταία στάδια της αλλοίωσης των τροφίμων. Οι ουσίες αυτές είναι κυρίως προϊόντα βακτηριακής αποσύνθεσης του μη-πρωτεϊνικού νιτρικού κλάσματος της σάρκας των ιχθυηρών. Αυτό έχει αποδειχθεί σε ένα μεγάλο αριθμό πειραμάτων όπου οι μεταβολές στην ποιότητα στείρου ιστού συγκρίνονται με αυτές που λαμβάνουν χώρα σε δείγματα με ενδογενή χλωρίδα (Herbert et al., 1975). Στα πειράματα με τον στείρο ιστό δεν αναπτύχθηκαν οι οσμές και η γεύση που οδήγησαν στην οργανοληπτική απόρριψη των ιχθυηρών με την φυσική χλωρίδα.

Διάφορες χημικές ουσίες έχουν αναφερθεί ως σήμερα στην βιβλιογραφία ως δείκτες αλλοίωσης των τροφίμων. Για τον χαρακτηρισμό και τη χρήση μιας ουσίας ως δείκτη ποιότητας, η ουσία αυτή θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις. Μια χημική ουσία η οποία πιστοποιεί την μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να οριστεί ως το προϊόν μεταβολισμού που παράγεται από τον ειδικό αλλοιογόνο οργανισμό (SSO) ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του στο τρόφιμο. Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί ένας δείκτης ποιότητας είναι:

α) πρέπει να βρίσκεται σε μικρή ή μηδενική συγκέντρωση στο τρόφιμο όταν αυτό είναι υψηλής ποιότητας

- β) πρέπει να αυξάνεται η συγκέντρωση του όσο προχωρά η αλλοίωση
- γ) η συγκέντρωση του δεν πρέπει να επηρεάζεται από την διαδικασία επεξεργασίας
- δ) πρέπει να είναι προϊόν μεταβολισμού του ειδικού αλλοιογόνου οργανισμού
- ε) η μέθοδος προσδιορισμού πρέπει να είναι ταχεία, εύκολη και ακριβής.

Οι κυριότεροι χημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα είναι:

- το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N): Η αμμωνία, η τριμεθυλαμίνη, η διμεθυλαμίνη και κάποια αμινοξέα συνθέτουν κυρίως, το TVB-N, αναφέρεται επίσης σαν Ολικό Πτητικό Βασικό Άζωτο, αφού τα αποτελέσματα δίνονται πάντα σε ποσοστά περιεχομένου αζώτου στις βάσεις. Η αμμωνία προέρχεται στα αλλοιωμένα ψάρια από τη βακτηριακή διάσπαση των ενώσεων με μικρό MB, όπως η ουρία. Είδη που περιέχουν μεγάλες ποσότητες ουρίας (π.χ. ελασματοβράγχια) μπορεί να αναπτύξουν περισσότερη αμμωνία από άλλα θαλασσινά ψάρια σε ένα προηγούμενο στάδιο. Η ουρία σχηματίζεται σε θαλασσινά ψαριά κυρίως από τον κύκλο ορνιθίνης - ουρίας επιτρέποντας έτσι στην αμμωνία να αποτοξινοποιηθεί. Η αμμωνία μαζί με το TMA είναι υπεύθυνα για την δυσοσμία των αλλοιωμένων ψαριών. Το TVB-N παράγεται σε σημαντικές ποσότητες μόνο κατά τα στάδια της προχωρημένης αλλοίωσης των ιχθύων και δεν θεωρείται αξιόπιστη ουσία για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των ψαριών στο αρχικό στάδιο της αποθήκευσης (Oehlenschläger 1997a,b). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι οι Parlapani and Boziaris, (2016) τσιπούρες συντηρούμενες σε αερόβιες συνθήκες υπό θερμοκρασίες 0° C, 5°C, και 15°C Παρατήρησαν πως η οι τιμές του δείκτη TVB-N αρχικά ήταν  $12.49 \pm 1.83$  mg N/100 g ιχθύος, ενώ στη τελευταία μέρα συντήρησης στις 0°C, 5°C και 15°C, οι τιμές του TVB-N ήταν  $24.20 \pm 2.43$ ,  $25.30 \pm 2.59$  and  $28.67 \pm 2.74$  mg N/100 g ιχθύος αντίστοιχα. Σε συντηρούμενα φιλέτα τσιπούρας, υπό διάφορες συνθήκες οι Parplani et al (2015). διαπίστωσαν πως η

τιμή του TVB-N ήταν αρχικά  $15,29 \pm 0,31$  mg N /100 g φιλέτο τσιπούρας. Επιπροσθέτως παρατήρησαν ότι όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο πιο γρήγορα ήταν η παραγωγή TVB-N και υψηλότερη τελική συγκέντρωση του δείκτη. Δηλαδή, συμπέραναν πως οι αερόβιες συνθήκες συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας ευνοούν την παραγωγή TVB-N σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές της παραμέτρου αυτής σε συνθήκες MAP. Πράγματι, στους 0°C υπό MAP, τα επίπεδα του TVB-N ήταν ουσιαστικά αμετάβλητο μέχρι την 16η ημέρα αποθήκευσης ( $p > 0,05$ ). Στο τέλος της συντήρησης στους 0°C, η συγκέντρωση TVB-N ήταν  $24,54 \pm 0,25$  και  $16,64 \pm 0,21$  mg N/100 g για φιλέτα αποθηκευμένα υπό ατμόσφαιρα και MAP, αντιστοίχως. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνητών, η συγκέντρωση του ΟΠΒΑ παρουσίασε μεταβολή και συσχετίστηκε ικανοποιητικά με το χρόνο συντήρησης μόνο σε σχετικά προχωρημένο στάδιο αλλοίωσης. (Parplani et al, 2015). Αυτό υποδεικνύει ότι το ΟΠΒΑ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αλλοίωσης και όχι σαν δείκτης νοψότητας .

- Η τριμεθυλαμίνη (TMA) ή άζωτο της τριμεθυλαμίνης (TMA-N): Χαρακτηρίζεται ως ένα από τα κύρια συστατικά που συνεισφέρουν στην οσμή των αποσυντεθειμένων θαλασσινών ψαριών. Αυτή η πτητική αμίνη παράγεται από βακτηριακή και ενζυματική υποβάθμιση των οξειδίων της TMA (TMAO), που είναι παρόν στα ψάρια ως ένας ωσμωρυθμιστής. Η συγκέντρωση TMA στους μυς του ψαριού, εκφρασμένη ως mg TMA-N/100gr μύς ψαριών, χρησιμοποιείται ως δείκτης ποιότητας σε πολλές χώρες τόσο σε ερευνητικά όσο και σε ποιοτικού ελέγχου εργαστήρια, αν και οι συγκεντρώσεις δεν σχετίζονται άμεσα με την οργανοληπτική αξιολόγηση. Οι υψηλότερες τιμές παρουσιάζονται στους ιστούς των ελασματοβραγχίων ακολουθούμενες από τους μύες μεταναστευτικών και καλαμαριών, με τις χαμηλότερες τιμές στα πλατύψαρα και τις ενδιάμεσες τιμές στα πελαγικά ψάρια. Τα ψάρια με λευκή σάρκα περιέχουν γενικά

μεγαλύτερες ποσότητες ΤΜΑΟ από τα ψάρια με κόκκινη σάρκα (Hebart and Shewan, 1975). Επιπλέον, η τιμή του ΤΜΑ είναι χαμηλή έως και μηδαμινή σε ιχθύες τσιπούρας που έχουν αλιευθεί από ελληνικά ύδατα (Koutsoumanis and Nychas 2000). Οι Parlapani and Boziaris, (2016) εξετάζοντας τον μικροβιακό πληθυσμό σε ιχθυηρά συντηρούμενα σε αερόβιες συνθήκες διαπίστωσαν πως οι τιμές του δείκτη ΤΜΑ-N ήταν  $0.76 \pm 0.03$  mg N/100 g ενώ στη τελευταία μέρα συντήρησης αυξήθηκε ελαφρά προσεγγίζοντας τα επίπεδα των  $1.40 \pm 0.09$ ,  $1.20 \pm 0.05$  και  $1.28 \pm 0.10$  mg N / 100 g στις 0, 5 και 15 ° C, αντίστοιχα. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Parlapani et al (2015) εξετάζοντας φιλέτα λαυρακίου συντηρούμενα στους 2 °C αερόβιος και υπό συνθήκες MAP (CO<sub>2</sub>: 60%, O<sub>2</sub>: 10%, N<sub>2</sub>: 30%). Οι Koutsoumanis et al. (1999) υποστηρίζουν πως οι αμίνες γενικότερα απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους ιχθύες της Μεσογείου. Έτσι, η αδυναμία του ακριβή προσδιορισμού της αλλοίωσης (στάδιο αλλοίωσης) με την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων έχει οδηγήσει στην αναζήτηση πιο αξιόπιστων μεθόδων.

#### **1.2.4. Χρόνος εμπορικής ζωής ιχθυρών**

Η παρακολούθηση της ποιότητας των ιχθυρών κατά τη συντήρησή τους και ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής τους αποτελεί ένα από τα κυριότερα πεδία έρευνας και απασχολεί όλους όσους εμπλέκονται στην ψυκτική αλυσίδα των προϊόντων αλιείας. Ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων έχει πραγματοποιηθεί σχετικά με τις οργανοληπτικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της συντήρησης των ιχθυρών σε θερμοκρασίες ψύξης και όπως φαίνεται στους πίνακες 3 και 4 η διάρκεια ζωής τους παρουσιάζει σημαντική διακύμανση ανάλογα με το είδος τους και την προέλευσή τους.

**Πίνακας 3:** Διάρκεια ζωής ιχθυερών αλμυρού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία (Glam et al., 1987)

| Είδος  | Διάρκεια ζωής (ημέρες) |
|--|------------------------|
| <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (Chinook salmon)       | 10                     |
| <i>Mallotus villosus</i> (capelin)                     | 8-12                   |
| <i>Ghadus merlangus</i> (whiting)                      | 9-12                   |
| <i>Ghadus morhua</i> (cod)                             | 9-15                   |
| <i>Melanogrammus aeglefinus</i> (haddock)              | 12-15                  |
| <i>Micromesistius poutassou</i> (blue whiting)         | 7-9                    |
| <i>Thelagra chalcogramma</i> (walley pollock)          | 6                      |
| <i>Merluccius bilinaris</i> (Pacific hake)             | 7                      |
| <i>Merluccius merluccius</i> (hake)                    | 8-15                   |
| <i>Coryphaenoides acrolepis</i> (Pacific rattail fish) | 20                     |
| <i>Coryphaenoides rupestris</i> (roundnose grenadier)  | 18                     |
| <i>Macrourus berglax</i> (roughhead grenadier)         | 13-14                  |
| <i>Sebastes marinus</i> (ocean perch)                  | 10-14                  |
| <i>Sebastes spp.</i> (redfish)                         | 13-15                  |
| <i>Trachurus scad</i> (scad)                           | 7                      |
| <i>Scomber scombrus</i> (mackerel)                     | 4-19                   |
| <i>Scomberomorus cavalla</i> (king mackerel)           | 12                     |
| <i>Scomberomorus maculatus</i> (Spanish mackerel)      | 10                     |
| <i>Glyptocephalus cynoglossus</i> (witch flounder)     | 18                     |
| <i>Hippoglossus hippoglossus</i> (halibut)             | 19-24                  |
| <i>Limanda limanda</i> (dab)                           | 10-12                  |
| <i>Pleuronectes platessa</i> (plaice)                  | 13-18                  |
| <i>Pseudopleuronectes americanus</i> (winter flounder) | 7-11                   |

**Πίνακας 4.** Διάρκεια ζωής ιχθυερών γλυκού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία (Glam et al., 1987)

| Είδος  | Διάρκεια ζωής (ημέρες) |
|--|------------------------|
| <i>Core gams dupeaformis</i> (whitefish)     | 14-18                  |
| <i>Salmo irideus</i> (trout)                 | 9-11                   |
| <i>Iclalurus punctatus</i> (channel catfish) | 12-13                  |
| <i>Perea flavescens</i> (yellow perch)       | 8-13                   |
| <i>Perea fluciatililis</i> (perch)           | 15-17                  |
| <i>Slizosiedion vitreum</i> (yellow walley)  | 20                     |

Η αναζήτηση μιας μέσης διάρκειας ζωής των ιχθυερών αλμυρού νερού από την ψυχρή και εύκρατη ζώνη δεν θα είχε κανένα νόημα αφού όπως φαίνεται στον πίνακα 5 αυτή κυμαίνεται από 6 έως 24 ημέρες. Η διακύμανση αυτή δείχνει καθαρά την επίδραση της

ενδογενούς μικροχλωρίδας, καθώς και άλλων παραγόντων που συζητήθηκαν προηγουμένως, στη ποιότητα των ιχθυηρών και τονίζει ταυτόχρονα τονίζει την πολυπλοκότητα της διαδικασίας της αλλοίωσης. Ωστόσο, τα δεδομένα του πίνακα 5 μπορούν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι το σύνολο των δειγμάτων αλλοιώνεται μέσα σε ένα χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων και μόνο λίγα είδη παρουσιάζουν διάρκεια ζωής κοντά στις 3 εβδομάδες.

Όσον αφορά τη διάρκεια ζωής των ιχθυηρών του γλυκού νερού η διακύμανση που παρουσιάζεται είναι μικρότερη. Παρόλα αυτά η διατηρησιμότητά τους δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από αυτή των ιχθυηρών του αλμυρού νερού και κυμαίνεται από 8 έως 20 ημέρες (Πίνακας 4). Πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι ενώ η αλλοίωση των ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους υπό θερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης έχει ερευνηθεί σε ευρεία κλίμακα, πολύ λιγότερη προσοχή έχει δοθεί στη επίδραση υψηλών θερμοκρασιών συντήρησης (20-30°C). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη σχετικά καλών ψυκτικών συστημάτων διανομής στις χώρες του βόρειου ημισφαιρίου. Ωστόσο, σε πολλές μη ανεπτυγμένες περιοχές κυρίως του νότιου ημισφαιρίου δεν χρησιμοποιείται ψύξη κατά τη διάρκεια της διανομής. Γενικά, η συντήρηση των ιχθυηρών σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία αλλοίωση τους. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι η διάρκεια ζωής των διαφόρων ειδών ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασίες 9-20°C είναι μικρότερη από δύο ημέρες (Gram et al., 1987).

### **1.3. Υπερψύξη ιχθυηρών**

#### **1.3.1. Κατάψυξη**

Προκειμένου να γίνει ανάλυση της υπερψύξης, σκόπιμο θεωρείται η ανάλυση της κατάψυξης. Η κατάψυξη ως μέθοδος συντήρησης ιχθυηρών είναι ουσιαστικά η

απομάκρυνση της θερμότητας από τα ψάρια με αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοκρασίας τους και στη συνέχεια τη διατήρησή τους σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από το σημείο πήξης, γεγονός που επιφέρει τη μετατροπή του νερού σε παγοκρυστάλλους (Μπλούκας, 2004).

Η μετατροπή του νερού σε παγοκρυστάλλους κατά την κατάψυξη προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυτών στερεών στην υπόλοιπη ποσότητα νερού, γεγονός που επιφέρει μείωση της δραστηριότητας του νερού στο προϊόντος. Αξίζει να αναφερθεί ότι ενώ στους  $-5^{\circ}\text{C}$  η δραστηριότητα του νερού είναι 0,956 στους  $-10^{\circ}\text{C}$  μειώνεται σε 0,907 και στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε 0,82. Προκύπτει, λοιπόν, ότι η κατάψυξη ως μέθοδος συντήρησης τροφίμων στηρίζεται στο γεγονός ότι:

- α) προκαλεί την πλήρη αναστολή της δράσης των μικροοργανισμών και
- β) επιβραδύνει τη δράση των ενζύμων και το ρυθμό των χημικών αντιδράσεων.

Τα παραπάνω αποτελούν αποτέλεσμα:

- α) των χαμηλών θερμοκρασιών στις οποίες συντηρείται το τρόφιμο υπό κατάψυξη, κατά κανόνα σε θερμοκρασίες μικρότερες από  $-18^{\circ}\text{C}$  και
- β) των χαμηλών τιμών της δραστηριότητας του νερού, ως συνέπεια της μετατροπής του νερού σε παγοκρυστάλλους.

Όσον αφορά τις αρνητικές επιδράσεις της κατάψυξης, αυτές αφορούν αρχικώς, την υφή των ιχθυρών η οποία αλλοιώνεται λόγω σχηματισμού παγοκρυστάλλων. Επίσης, η δραστηριότητα των ενζύμων και οι χημικές αντιδράσεις συνεχίζονται και μετά την κατάψυξη, με μειωμένους ρυθμούς βέβαια, αλλά όχι τόσο μειωμένους ώστε να αποφευχθεί η υποβάθμιση της ποιότητας των κατεψυγμένων ψαριών σε σχέση με τα νωπά.

Ένα ακόμα αρνητικό της συντήρησης μέσα από τη μέθοδο της κατάψυξης είναι και η υπερβολικά μεγάλη δαπάνη ενέργειας που πραγματοποιείται, τόσο κατά τη φάση της μείωσης της θερμοκρασίας μέχρι τα επιθυμητά όρια, όσο και κατά της φάσης της συντήρησης, της διακίνησης και της εμπορίας, όπου η θερμοκρασία των προϊόντων πρέπει να διατηρείται σταθερή και αμετάβλητη (Μπλούκας, 2004).

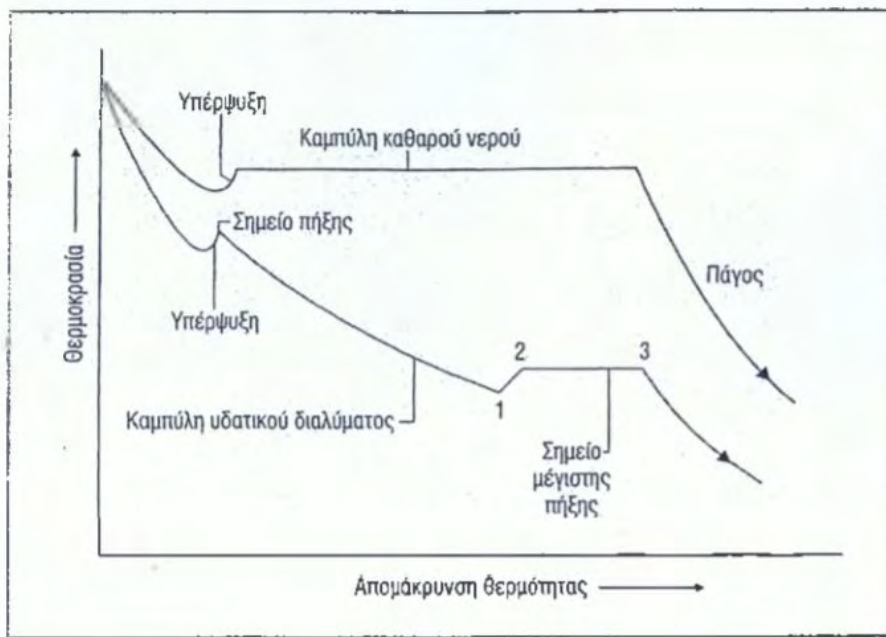
### **1.3.2. Κρυσταλλοποίηση υγρής φάσης και σχηματισμός πυρήνων κρυστάλλωσης**

Με τον όρο κρυσταλλοποίηση περιγράφεται ο σχηματισμός μιας συστηματικά οργανωμένης στερεάς φάσης μέσα σε ένα διάλυμα. Η διαδικασία της κρυσταλλοποίησης περιλαμβάνει δύο φάσεις:

- α) τη φάση σχηματισμού των πυρήνων κρυστάλλωσης και
- β) τη φάση ανάπτυξης κρυστάλλων σε μέγεθος.

Ως πυρήνας κρυστάλλωσης ορίζεται το μικρότερο σωματίδιο ύλης το οποίο αποτελεί τη βάση για τον σχηματισμό ενός κρυστάλλου. Για να σχηματισθούν οι πυρήνες κρυστάλλωσης στο καθαρό νερό πρέπει, για ένα μικρό χρονικό διάστημα, να μειωθεί η θερμοκρασία του σε τιμές σημαντικά χαμηλότερες από το σημείο πήξης του. Η μείωση της θερμοκρασίας σε αυτές τις τιμές, χωρίς να σχηματίζονται παγοκρύσταλλοι, είναι γνωστή ως υπέρψυξη (Μπλούκας, 2004).





**Σχήμα 2:** καμπύλες κατάψυξης καθαρού νερού και υδατικού διαλύματος (Μπλούκας, 2004)

### 1.3.3. Υπερψύξη ιχθύων

Η μέθοδος της υπερψύξης «Superchilling» η οποία χρησιμοποιείται για τη διατήρηση των θαλασσινών, έχει οριστεί ως η μείωση της θερμοκρασίας στην σάρκα των ιχθύων σε εύρος από  $-3^{\circ}$  έως  $-1^{\circ}\text{C}$  (Carlson, 1969, Kaale et al. 2011). Η διαδικασία αυτή είναι γνώστη και με τις ονομασίες "υπερψύξη", "ελαφριά κατάψυξη", "μερική κατάψυξη"

Το νερό παγώνει στους  $0^{\circ}\text{C}$  ( $32^{\circ}\text{F}$ ), αλλά το σημείο πήξης μειώνεται όταν περιέχει διαλυμένες ουσίες. Το νερό σε βιολογικά συστήματα (φυτά και ζώα) περιέχει ποικίλες ποσότητες διαλυμένων ουσιών. Ως εκ τούτου, η κατάψυξη των θαλασσινών εμφανίζεται κάτω από το σημείο πήξης του καθαρού νερού. Όταν η θερμοκρασία των θαλασσινών μειώνεται, η φυσική αλλαγή σε μια σκληρή μάζα εμφανίζεται σταδιακά σε ρυθμούς που είναι πιο γρήγοροι στην αρχή και πιο αργοί καθώς μειώνεται η θερμοκρασία.

Το νερό στα θαλασσινά δεν καταψύχεται αυθόρμητα σε οποιαδήποτε δεδομένη θερμοκρασία. Καθώς η θερμοκρασία της σάρκας μειώνεται, τα πρώτα μόρια νερού καταψύχονται ελαφρά κάτω από τους 0°C (32°F). Σύμφωνα με τους Power et al. (1965), καθώς η θερμοκρασία των μυών των ψαριών μειώνεται στους -1°, -2°, -3° και -4°C, (30,2° F, 28,1° F, 26,6 ° F και 24,4°F), το ποσοστό του νερού καταψύχεται είναι 19, 55, 70 και 76, αντίστοιχα. Αρχικά, ο ρυθμός ψύξης του νερού στα ψάρια είναι σχετικά γρήγορος. Ωστόσο, από τη χρονική στιγμή που η θερμοκρασία μειώνεται μόνο στους -6°C (21,2°F), περίπου το 80% του νερού καταψύχεται και η σάρκα είναι άκαμπτη, παρόλο που το υπόλοιπο 20% του νερού δεν καταψύχεται. Σε αυτό το σημείο, ο ρυθμός κατάψυξης μειώνεται δραστικά και μια περαιτέρω μείωση περίπου στους 36 °F [20°C] (θα παγώσει μόνο περίπου ένα επιπλέον 8% της ποσότητας νερού . Παρόλα αυτά όταν μειωθεί η θερμοκρασία του νερού σε περίπου -67°F (-55°C) τότε όλο το νερό φαίνεται παγωμένο. Ένα τυπικό παράδειγμα αυτής της διαδικασίας περιγράφεται από τον Charm (1971) κατά τον οποίο το «superchilling» θα περιλαμβάνει τη μετατροπή τουλάχιστον κάποιου νερού σε πάγο, το ποσό που εξαρτάται από τη θερμοκρασία ισορροπίας στην οποία τελικά το σύστημα φτάνει. Υπό την προϋπόθεση ότι η θερμοκρασία δεν επιτρέπεται να φτάσει κάτω από 26,6°F (-3°C), τα υπερψυγμένα θαλασσινά δεν θα καταστούν άκαμπτα κατεψυγμένα. Έτσι, η υπερψυχία ορίζεται με ακρίβεια ως μερική κατάψυξη. Υπό αυτές τις συνθήκες, η βακτηριακή δράση, και συνεπώς η αλλοίωση, επιβραδύνεται λίγο σε αυτή τη χαμηλότερη θερμοκρασία, έτσι ώστε τα ψάρια παραμένουν εδώδιμα και αποδεκτά περισσότερο.

Η πρώτη εφαρμογή υπερψύξης καταγράφηκε το 1935 (Carlson, 1969) και αφορούσε τη χρήση αλατόνευρου (περίπου στους 26°F (-3°C) ως ψυκτικού μέσου, με αποτέλεσμα την εκτεταμένη συντήρηση των ψαριών. Ωστόσο, μεταγενέστερες αξιολογήσεις της

διαδικασίας από ερευνητικές ομάδες από την Αγγλία και αργότερα από ομάδες από του Καναδά, της Ομοσπονδιακής Δημοκρατίας, της Γερμανίας και των Ηνωμένων Πολιτειών επισήμαναν ορισμένα μειονεκτήματα της μεθόδου όπως το μερικό πάγωμα που συμβαίνει στην πραγματικότητα κατά τη διάρκεια της υπερψύξης. (Carlson 1969),



**Εικόνα 4:** Υπερψύξη σε φιλέτα μπακαλιάρου (Ronsivalli and Baker 1981).

Σήμερα, μεγάλο μέρος των ερευνητικών μελετών επικεντρώνεται στα οφέλη της μεθοδολογίας αυτής για την αύξηση της διατηρησιμότητας των ευαλλοιώτων τροφίμων (Kaale, et al. 2011). Οι Fernandez et. al (2009) εξέτασαν την αποτελεσματικότητα της υπερψύξης σε φιλέτα σολομού και διαπίστωσαν ότι η υπερψύξη σε συνδυασμό με συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι ικανή να διατηρήσει τα ψάρια έως και 11 ημέρες παραπάνω από τον σημερινό τρόπο αποθήκευσης τους. Επιπρόσθετα, σε ένα άρθρο του ο Jones (2015), παραθέτει τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5), ο οποίος είναι ενδεικτικός στο τι δυνατότητες υπάρχουν στο θέμα της υπερψύξης.

**Πίνακας 5:** Παραδείγματα παράτασης χρόνου ζωής ιχθυρών, με τη χρήση υπερψύξης (Jones, 2015).

| Product             | Superchill temperature (°C) | Packaging atmosphere                     | Shelf life extension (days) |
|---------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|
| Salmon              | -1.5                        | 90% CO <sub>2</sub>                      | 11                          |
| Mullet              | -2.0                        | Vacuum                                   | 3                           |
| Japanese seabass    | -1.5                        | 40% CO <sub>2</sub> / 30% O <sub>2</sub> | 4                           |
| Cod muscle          | -4.0                        | Air                                      | 5                           |
| Pork roast          | -2.0                        | Air                                      | 98                          |
| Salmon              | -1.4                        | Air                                      | 17                          |
| Salted fresh salmon | -1.0                        | Air                                      | 7                           |
| Salmon              | -2.0                        | 60% CO <sub>2</sub>                      | 11                          |
| Cod fillet          | -1.5                        | Air                                      | 3                           |
| Japanese seabass    | -3.0                        | Air                                      | 14                          |
| Cod                 | -2.0                        | 50% CO <sub>2</sub> / 5% O <sub>2</sub>  | 7                           |
| Wolf fish           | -1.0                        | 60% CO <sub>2</sub>                      | 2                           |
| Arctic charr        | -2.0                        | CO <sub>2</sub>                          | 6                           |
| Shrimp              | -3.0                        | Air                                      | 6                           |

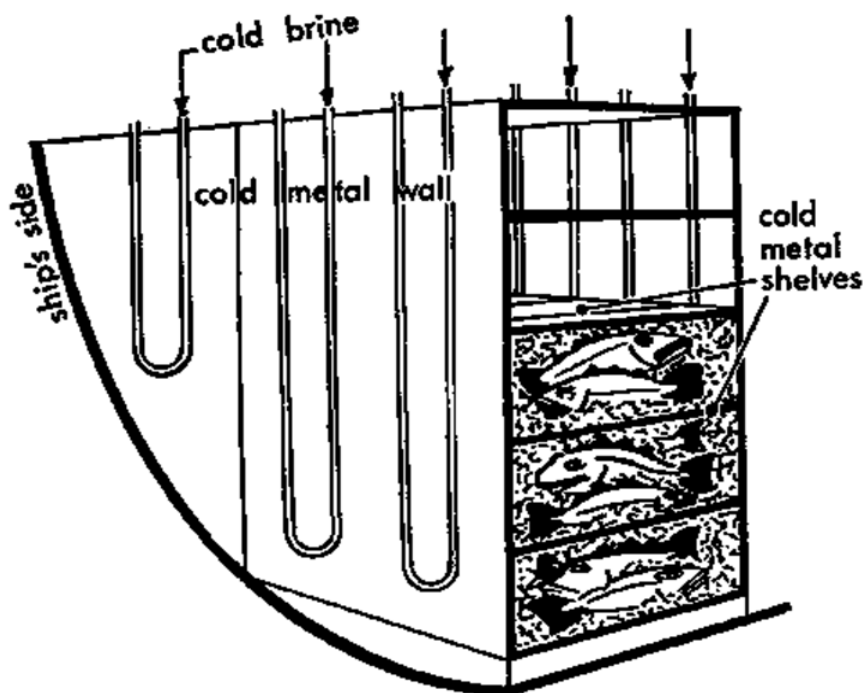
### 1.3.4. Μέθοδοι υπερψύξης

#### 1.3.4.1. Πορτογαλική μέθοδος

Αυτή πρώτη μέθοδος υπερψύξης χρησιμοποιήθηκε σε ορισμένες πορτογαλικές μηχανότρατες που εργάζονταν στα θερμότερα μέρη του Ατλαντικού και επίσης δοκιμάστηκε και σε ένα γερμανικό αλιευτικό σκάφος.

Κάθε κατακόρυφη διαίρεση του αμπαριού του αλιευτικού σκάφους είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα και έχει κοίλες διόδους εντός αυτού, μέσω των οποίων αντλείται ψυγμένο αλατόνερο

Τα ράφια είναι επίσης από μέταλλο και απέχουν περίπου 16 ίντσες μεταξύ τους, έτσι ώστε κανένα μέρος του μείγματος ψαριών και πάγου σε κάθε ράφι δεν είναι μεγαλύτερο από περίπου 8 ίντσες από μια ψυχρή επιφάνεια. Επιπλέον, η ψυκτική άλμη αντλείται μέσω δικτύων σωληνώσεων που έχουν ταφεί στη μόνωση στην οροφή, στην κορυφή της δεξαμενής και περιμετρικά του πλοίου. Σε πιο πρόσφατες πορτογαλικές εγκαταστάσεις τα ψάρια έχουν στοιβάζεται σε κουτιά ανάμεσα στα μεταλλικά ράφια, σε μια προσπάθεια να ξεπεραστεί η δυσκολία εκφόρτωσης των κατεψυγμένων ψαριών.



Εικόνα 3: Σκίτσο απεικόνιση πορτογαλικής μεθόδου

(<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5910e/x5910e01.htm>)

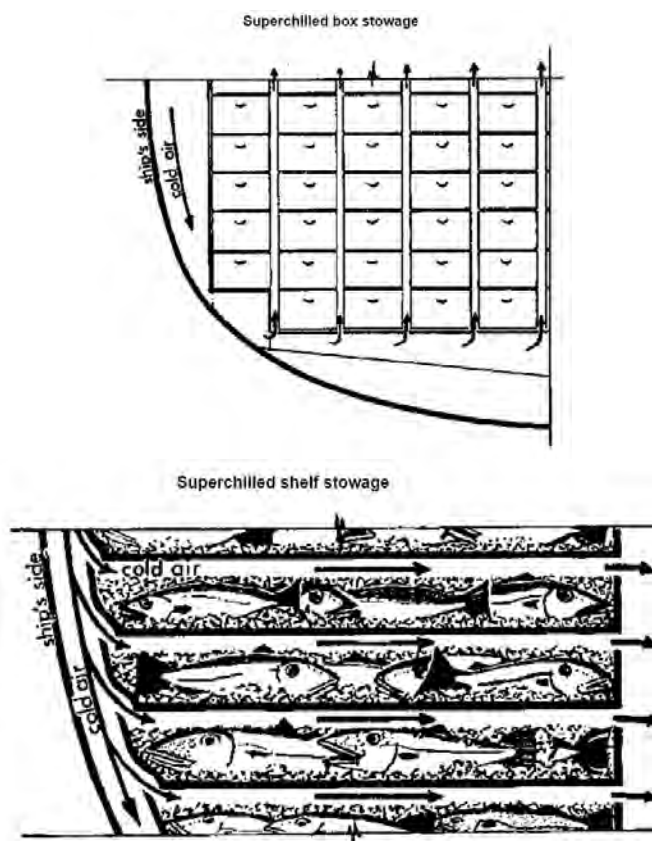
#### 1.3.4.2. Μέθοδος κρύου αέρα

Οι εγκαταστάσεις υπερψύξης στις βρετανικές μηχανότρατες έχουν σχεδιαστεί για να αποφεύγεται η περίπλοκη και δαπανηρή ανακατασκευή του θαλάμου ψαριών.

Ο ψυχρός αέρας διοχετεύεται στην αίθουσα ψαριών και έπειτα περνάει ανάμεσα σε ράφια ή κιβώτια ψαριών και πάγου. Δεδομένου ότι η συσκευασία των παγωμένων ψαριών σε κιβώτια έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις χύμα μεθόδους, η αποδοτικότερη μέθοδος υπερψύξης είναι η συσκευασία αμέσως μετά την αλίευση.

Η συμβατική δομή αμπαριών που προορίζονται για αλιεία και υπερψύξη, διαθέτει κάθετες διαιρέσεις και φορητά ράφια, απαλλαγμένα από κουτιά, ενώ τα ψάρια είναι στοιβαγμένα σε ανοικτές στοιβασιές με στενά κάθετα κενά μεταξύ τους (Http5).

Οι πλευρές του θαλάμου υπερψύξης είναι τετραγωνισμένες όπως φαίνεται στην εικόνα 5. Ο κρύος αέρας διοχετεύεται κάτω από τις πλευρές της αίθουσας των ψαριών πίσω από την κατακόρυφη επένδυση και έπειτα προς τα πάνω μέσα από το ψευδοδάπεδο για να περάσει μεταξύ των αλιευμάτων.



**Εικόνα 4:** Σκίτσο απεικόνισης της κυκλοφορίας του αέρα

(<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5910e/x5910e01.htm>)

Όταν διατηρείται η συνηθισμένη δομή της λίβρας, ο ψυχρός αέρας οδηγείται κάτω από τις πλευρές του πλοίου και διοχετεύεται μέσα από ανοίγματα στην επένδυση που συμπίπτουν με τον εναέριο χώρο πάνω από κάθε ράφι ψαριού και πάγου. Τα ράφια απέχουν σε κοντινά διαστήματα ώστε το κέντρο κάθε στρώματος ψαριών και πάγου να μην είναι πολύ απομακρυσμένο από τον κρύο αέρα.

#### **1.4. Σκοπός παρούσας εργασίας**

Βασικός σκοπός της παρούσας προπτυχιακής μελέτης είναι η συγκριτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας δύο διαφορετικών θερμοκρασιών ψύξης ως διαφορετικών μεθόδων συντήρησης ιχθυρών. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκε η εφαρμογή της απλής ψύξη στους 2°C, καθώς και η υπερψύξη στους -1,5°C σε φιλέτα λαυρακίου. Σε συνδυασμό με τα ανώτερα εξετάστηκε και η επίδραση των δυο μεθόδων χαμηλής θερμοκρασίας συντήρησης ιχθύων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τον χρόνο εμπορικής ζωής των νωπών ιχθύων.

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1. Πειραματικός σχεδιασμός**

Φιλέτα λαβρακιού, χωρισμένα σε δυο παρτίδες προερχόμενα από την εταιρία «Ιχθυοτροφεία Σελόντα ΑΕΓΕ», μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο Υγιεινής και Τεχνολογίας Αλιευτικών προϊόντων και τροφίμων του εργαστηρίου Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος 24 ώρες μετά την εξαλίευσή τους.

Οι ιχθύες αλιεύτηκαν στις 25/11/2015 και στις 9/04/2016 όπου αποθηκεύτηκαν στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$  (υπερψύξη) και στους  $2^{\circ}\text{C}$ . Πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των μικροβιολογικών και οργανοληπτικών μεταβολών, ώστε να προσδιοριστεί ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων λαβρακιού σε υπερψύξη  $-1,5^{\circ}\text{C}$  για να συγκριθεί με τον συμβατικό τρόπο συντήρησης.

Καταμετρήθηκαν ανά 2 ημέρες, η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) και οι πληθυσμοί των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως τα *Pseudomonas spp.*, υδροθειούχα βακτήρια ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), *Brochothrix sp.* και Enterobacteriaceae. Επίσης παρατηρήθηκαν οι οργανοληπτικές μεταβολές σε γεύση, οσμή, εμφάνιση.

### **2.2. Μικροβιακές αναλύσεις**

#### **2.2.1. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών**

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).



### 2.2.1.1. TSA, ολική μικροβιακή χλωρίδα

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:

**Πίνακας 6:**Συστατικά: g/1000 ml

|                 |      |
|-----------------|------|
| Tryptone        | 15.0 |
| Soy Peptone     | 5.0  |
| Sodium Chloride | 5.0  |
| Agar            | 12.0 |

Για την παρασκευή του, 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.

### 2.2.1.2. CFC, *Pseudomonas spp.*

Το θρεπτικό μέσο (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine) 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<sup>+</sup> και ορισμένα Gram<sup>-</sup> βακτήρια.

Πίνακας 7:Συστατικά: g/1000 ml

|                 |      |
|-----------------|------|
| Tryptone        | 15.0 |
| Soy Peptone     | 5.0  |
| Sodium Chloride | 5.0  |
| Agar            | 12.0 |

Για την παρασκευή του, 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.

### 2.2.1.3. STAA, *Brochothrix thermosphacta*

Ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* είναι ένας από τους κυριότερους αλλοιωγόνους παράγοντες των τροφίμων που διατηρούνται κάτω από συνθήκες ψύξης.

Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός με εύρος ανάπτυξης 0 έως 30°C, με βέλτιστο σημείο τους 20 έως 25°C. Ως προαιρετικό αναερόβιο, το *Brochothrix thermosphacta*, είναι ικανό να αναπτυχθεί και σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP). Τα συστατικά παρέχουν τις απαραίτητες αζωτούχες ενώσεις, τις βιταμίνες και άλλα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, ενώ η στρεπτομυκίνη είναι ένας εκλεκτικός παράγοντας που αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών, πέραν των συγκεκριμένων.

**Πίνακας 8:**Συστατικά: g/1000 ml

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| Peptic Digest of Animal Tissue   | 20.0 |
| Yeast Extract                    | 2.0  |
| Dipotassium Hydrogen Phosphate   | 1.0  |
| Magnesium Sulphate, Heptahydrate | 1.0  |
| Agar                             | 13.0 |

Για την παρασκευή του, σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 17.3 g αφυδατωμένης σκόνης και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 500 ml απιονισμένου νερού μαζί με 7.5 g γλυκερόλη. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50°C, προστέθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες ένα φιαλίδιο με ενυδατωμένο εκλεκτικό μέσο STAA. Στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

#### **2.2.1.4. VRBGA, enterobacteriaceae**

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA). 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, Neutral red).

**Πίνακας 9:**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  |

Για την παρασκευή του, 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°C, στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

### 2.2.1.5. ΙΑ, βακτήρια που παράγουν υδρόθειο και *Shewanella putrefaciens*

Το Iron Agar χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H<sub>2</sub>S). 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 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ανάγεται προς υδρόθειο (H<sub>2</sub>S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου Fe και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες.

**Πίνακας 10:** Συστατικά: g/1000ml

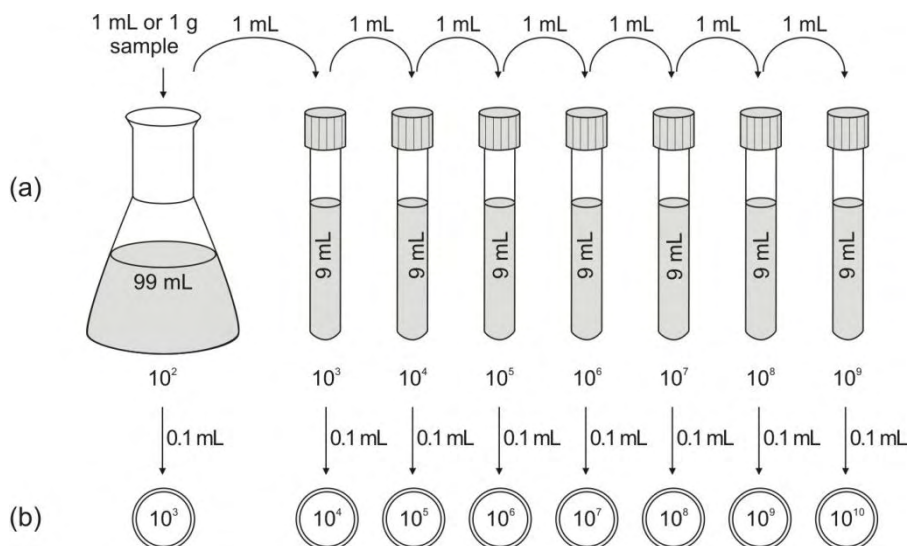
|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Beef Extract          | 3.0   |
| Yeast Extract         | 3.0   |
| Balanced Peptone N° 1 | 20.0  |
| Sodium Chloride       | 5.0   |
| Lactose               | 10.0  |
| Ferric citrate        | 0.3   |
| Sucrose               | 10.0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

Για την παρασκευή του, σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 65.0 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml 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.

### 2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Λαμβάνονταν ασηπτικά, σε κάθε δειγματοληψία 10 g σάρκας ιχθύος εις διπλούν ( $n = 2$ ) και μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 90 ml αραιωτικού διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v peptone) και η σακούλα οδηγούνταν σε συσκευή ομογενοποίησης (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK), όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος.

### **2.2.3. Τεχνική επίστρωσης τρυβλίων**

#### **2.2.3.1. Τεχνική της επιφανειακής Επίστρωσης (spread plate)**

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, και στα θρεπτικά TSA, STAA, CFC.

#### **2.2.3.2. Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plate technique)**

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 και στα θρεπτικά Iron Agar και VRBGA.

### **2.2.4. Επώαση δειγμάτων**

Ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα τα τρυβλία με τις καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανάλογες συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του επιθυμητού μικροοργανισμού, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12).

**Πίνακας 12:** Χρόνοι επώασης δειγμάτων

| <b>θρεπτικό</b> | <b>Μικροοργανισμός στόχος</b>             | <b>επώαση</b>          |
|-----------------|---|------------------------|
| TSA             | OMX                                       | 25°C για 48-72 h.      |
| Iron Agar       | Βακτήρια που παράγουν<br>H <sub>2</sub> S | 25°C για 48 h.         |
| VRBGA           | <i>Enterobacteriaceae</i>                 | 37°C για 24 h.         |
| CFC             | <i>Pseudomonas</i> spp.                   | 25°C για 48 h.         |
| STAA            | <i>Brochothrix thermosphacta</i>          | 25 °C για 48 έως 72 h. |

### **2.3. Οργανοληπτική ανάλυση**

Σε κάθε δειγματοληψία και πριν την έναρξη των αναλύσεων πραγματοποιούνταν οργανοληπτική αξιολόγηση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πενταβάθμια κλίμακα κριτηρίων νοψότητας και αρεσκειάς και αξιολογήθηκε η εμφάνιση, η οσμή και η γεύση, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2406/96/EK που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.



**Πίνακας 13:** Η Πενταβάθμια κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε

| <b>ΒΑΘΜΟΣ</b> | <b>ΕΜΦΑΝΙΣΗ</b>                               | <b>ΣΥΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΑΡΚΣΑ</b> | <b>ΟΣΜΗ</b>                    | <b>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ</b>            |
|---------------|---|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>5</b>      | Ημιδιαφανές, γυαλιστερό                       | Σφικτή                      | Έντονα θαλασσινή               | Άριστο                       |
| <b>4</b>      | Ελαφριά έλλειψη λαμπρότητας                   | Λιγότερο σφικτή             | Ελαφρά θαλασσινή               | Καλό                         |
| <b>3</b>      | Αισθητή απώλεια λαμπρότητας                   | Ελαφριά μαλακή              | Ούτε θαλασσινή, ούτε δυσάρεστη | Υποβαθμισμένο, αλλά αποδεκτό |
| <b>2</b>      | Θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο            | Αρκετά μαλακή               | Δυσάρεστη                      | Υποβαθμισμένο, μη αποδεκτό   |
| <b>1</b>      | Εξαιρετικά θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο | Πολύ μαλακή, διαλύεται      | Πολύ δυσάρεστη                 | αλλοιωμένο                   |

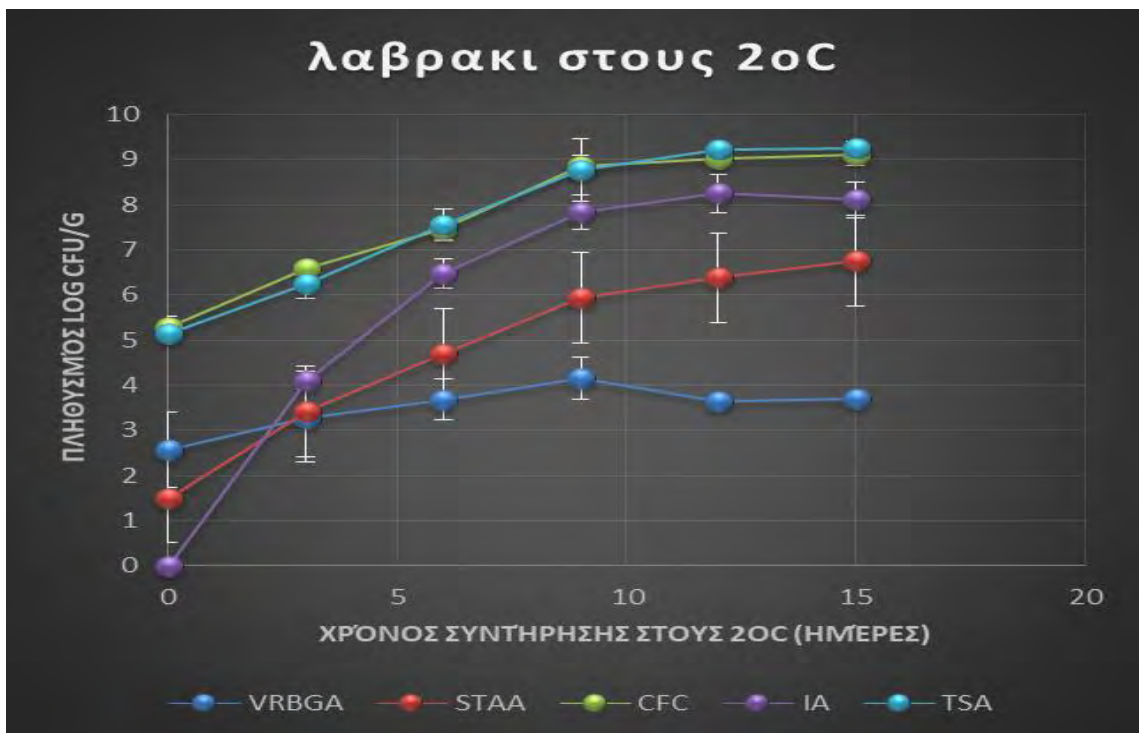
Η γεύση του ψαριού, γινόταν παίρνοντας ένα κομμάτι σάρκας 10-20 g, τυλιγμένο σε αλουμινόχαρτο που ψηνόταν σε προθερμασμένο φούρνο (250°C) για 15 min. Το δείγμα αφέθηκε για 10 min εκτός φούρνου και δοκιμάστηκε. Με 5 βαθμολογήθηκε η έντονη ευχάριστη γεύση και με 4, 3, 2, 1 το γευστικό χωρίς ιδιαίτερη γεύση, το άνοστο αλλά χωρίς ανεπιθύμητη γεύση, το άνοστο μη ελκυστικό με σχετικά όξινη αλλά όχι πικρή γεύση και το πικρό με ανεπιθύμητη οσμή. Σύμφωνα με τη γενική βαθμολογία, ως χρόνος απόρριψης είναι ο χρόνος όπου το προϊόν βαθμολογήθηκε με 2. Ως εμπορικός χρόνος ζωής είναι το 2.5.

Όσον αφορά την οσμή και την εμφάνιση, αυτές γίνονταν στο ωμό φιλέτο

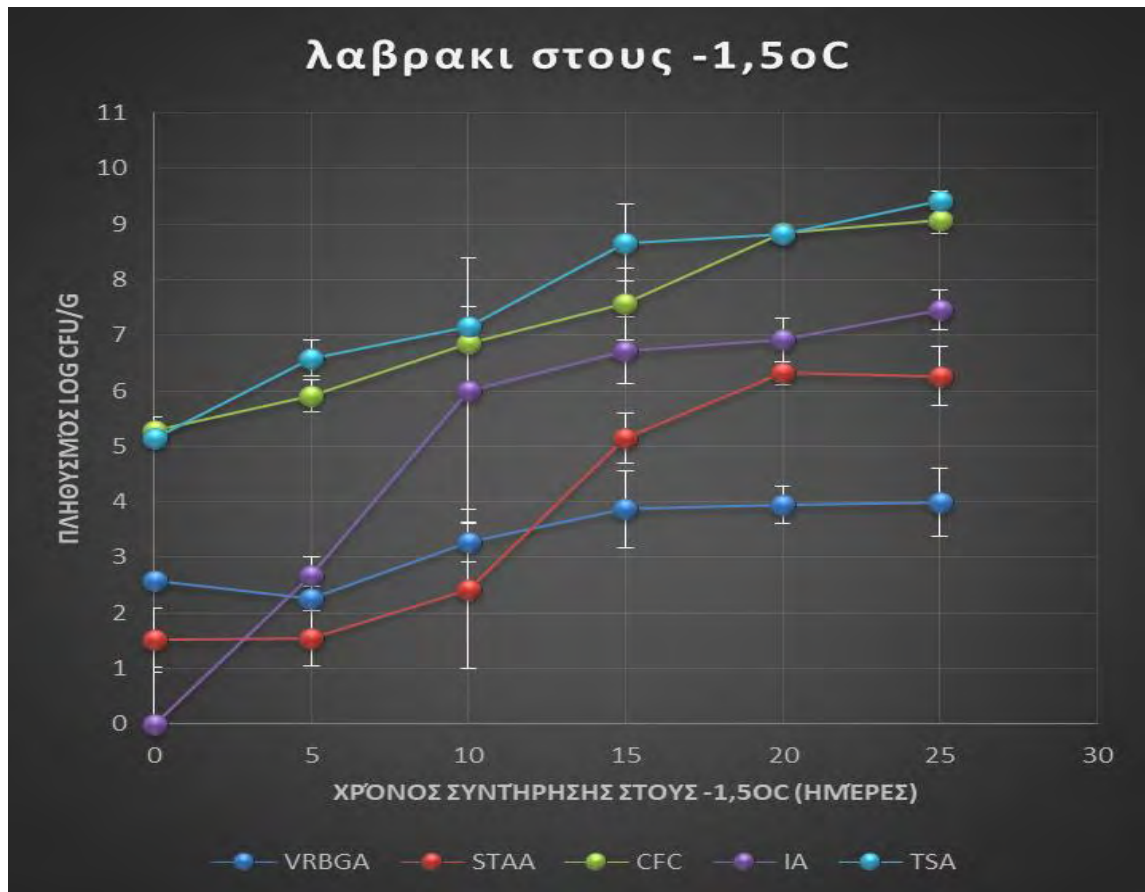
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Μικροβιολογική αξιολόγηση

Στα σχήματα 3 και 4 παρουσιάζεται η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού στα φιλέτα λαυρακιού κατά την χρονική διάρκεια συντήρησης στους 2 °C και -1,5°C αντίστοιχα.



**Σχήμα 3:** Χρονική μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού ανά θρεπτικό υπόστρωμα σε συνάρτηση με τη διάρκεια συντήρησης στους 2°C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος 4 μετρήσεων και οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.



**Σχήμα 4:** Χρονική μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού ανά θρεπτικό υπόστρωμα σε συνάρτηση με τη διάρκεια συντήρησης στους -1,5°C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος 4 μετρήσεων και οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

Όπως παρατηρείται στα παραπάνω διαγράμματα, το αρχικό μικροβιακό φορτίο των εντροβακτηρίων ήταν το ίδιο, ωστόσο κατά την διάρκεια της συντήρησης προέκυψαν διαφορετικά αποτελέσματα. Δηλαδή, κατά την 15 ημέρα συντήρησης οι αποικίες των τρυβλίων που αφορούσαν την υπερψύξη ήταν σημαντικά χαμηλότερες σε αριθμό, ενώ χρειάστηκαν ακόμα δέκα ημέρες συντήρησης προκειμένου να φτάσουν περίπου το ίδιο επίπεδο αλλοίωσης.

Τα αποτελέσματα που αφορούν το μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta*, διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης. Όπως παρατηρείται

από το ίδιο αρχικό μικροβιακό φορτίο και μετά το πέρας 15 ημερών συντήρησης υπάρχει μια διαφορά της τάξης του  $1 \log(\text{cfu})/\text{mL}$ , ενώ μετά από δέκα μέρες εκτεταμένης συντήρησης σε υπερκατάψυξη, τα αποτελέσματα, όπως και στην πρώτη περίπτωση των εντεροβακτηριδίων, ήρθαν περίπου στα ίδια επίπεδα, με τα αποτελέσματα των  $2^{\circ}\text{C}$ .

Στην περίπτωση των ψευδομονάδων, οι οποίες αποτελούν και έναν από τους βασικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς που αναπτύχθηκαν, μετά το πέρας 15 ημερών, δεν διέφεραν σημαντικά κατά το δεύτερο πείραμα συντήρησης στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$  σε σχέση με τη συντήρηση στους  $2^{\circ}\text{C}$ . Επίσης, παρατηρείται ότι παρόλο που υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στην ταχύτητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών ανάμεσα στα δύο πειράματα συντήρησης στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$ , κατά την 25<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, τα  $\log(\text{cfu})/\text{mL}$  παρατηρούνται στα ίδια επίπεδα.

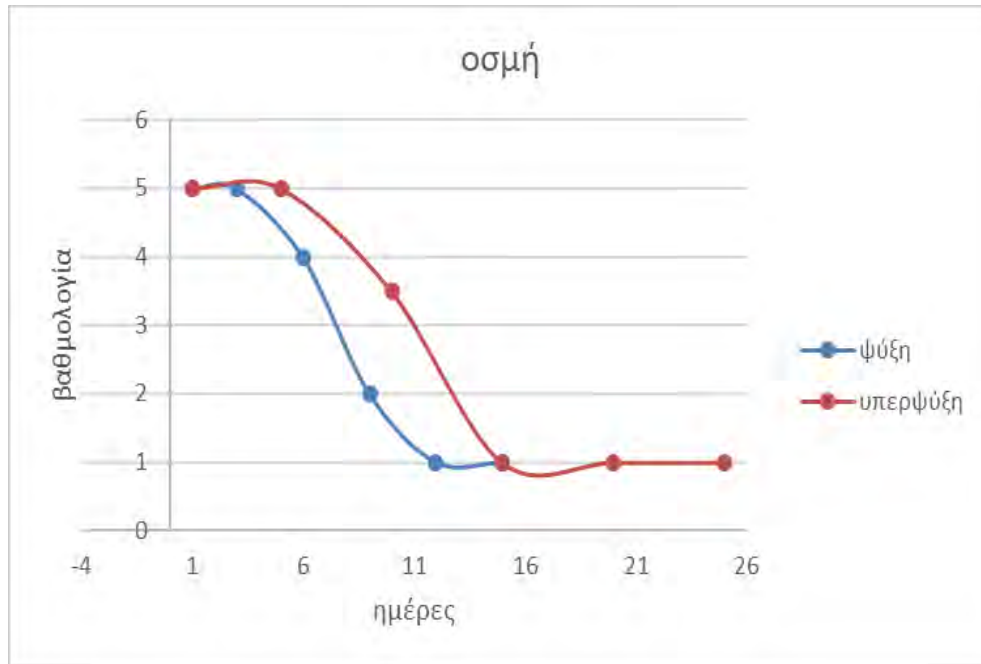
Όσον αφορά τα βακτήρια που παράγουν  $\text{H}_2\text{S}$ , τα οποία καλλιεργήθηκαν σε Iron Agar, παρατηρείται ότι, όπως και στην περίπτωση των εντεροβακτηρίων, από το ίδιο αρχικό μικροβιακό φορτίο, τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$  χρειάστηκαν 10 ημέρες παραπάνω συντήρησης προκειμένου να έρθουν στα επίπεδα  $\log(\text{cfu})$  των δειγμάτων που συντηρήθηκαν στο  $2^{\circ}\text{C}$ .

Τέλος, οι καλλιέργειες του TSA που αφορούν την ολική μεσόφιλη χλωρίδα, παρατηρείται ότι από το ίδιο αρχικό μικροβιακό φορτίο, μετά από 15 ημέρες συντήρησης, οι πληθυσμοί  $\log(\text{cfu}/\text{g})$  για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$ , ήταν σημαντικά χαμηλότεροι σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα των  $2^{\circ}\text{C}$ , ενώ για άλλη μια φορά παρατηρείται ότι χρειάστηκαν 10 ημέρες παραπάνω προκειμένου το μικροβιακό φορτίο να είναι περίπου στα ίδια επίπεδα.

Ως συμπέρασμα από τα διαγράμματα, είναι ασφαλές να πούμε ότι τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε υπερψύξη, είχαν αργότερη μικροβιακή ανάπτυξη, σε σχέση με τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε απλή ψύξη. Από αυτό συμπεραίνεται ότι και η αλλοίωση του λαβρακιού θα ήταν αργότερη αλλά και ότι ο χρόνος ζωής του θα αυξανόταν, καθώς η αλλοίωση είναι συνδεδεμένη με τη μικροβιακή ανάπτυξη. Συγκεκριμένα ο χρόνος ζωής του λαβρακιού αυξήθηκε από τις πέντε ημέρες περίπου στις δέκα όπου έφτασε το  $7 \log(\text{cfu})/\text{g}$  που είναι και το μικροβιακό όριο αλλοίωσης.

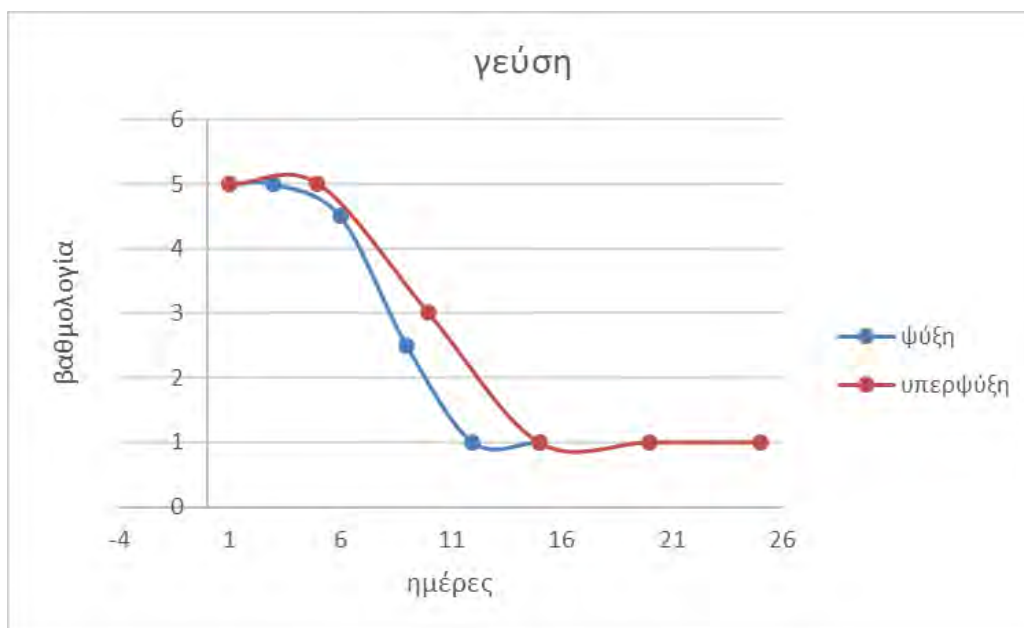
### **3.2. Οργανοληπτικές αναλύσεις**

Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή, γεύση, εμφάνιση) των φιλέτων λαυρακιού υπό δυο διαφορετικές συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας. Όσον αφορά την οσμή, παρατηρείται ότι μέχρι την 6η ημέρα η οσμή του λαβρακιού που διατηρούταν με απλή ψύξη ήταν σε αποδεκτά επίπεδα. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, ενώ από την 7η ημέρα άρχισε να γίνεται αισθητή η αλλοίωση (Σχήμα 5).



**Σχήμα 5:** Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της οσμής φιλέτων λαβρακιού κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (2°C) και υπερψύξη (-1.5°C). Το κάθε σημείο είναι η μέση εκτίμηση από 5 δοκιμαστές.

Ομοίως τα δείγματα που ήταν υπό συντήρηση σε υπερψύξη, άρχισε να γίνεται αντιληπτή η αλλοίωση μετά το πέρας 5 ημερών. Αντιθέτως μετά από 10 ημέρες ήταν σε μη αποδεκτά επίπεδα η οσμή και ως εκ τούτου τα φιλέτα λαυρακιού ήταν ακατάλληλα για κατανάλωση.



**Σχήμα 6:** Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της γεύσης φιλέτων λαβρακιού κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (2°C) και υπερψύξη (-1.5°C) .

Σύμφωνα με τα αναλυτικά δεδομένα του σχήματος 6, και στα δύο μεταχειρίσεις, τα υπό εξέταση δείγματα λαυρακιού διατήρησαν τη γεύση τους σε ικανοποιητικά επίπεδα μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα. Από την 7<sup>η</sup> και μετέπειτα, στο δείγμα που συντηρούνται στην απλή ψύξη, παρουσιάστηκε αισθητή μείωση της ποιότητας της γεύσης, μέχρι την επόμενη μέτρηση την 9<sup>η</sup> ημέρα, όπου η γεύση ήταν σε μη αποδεκτά επίπεδα.

Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρούνταν σε συνθήκες υπερψύξης, τα φιλέτα λαυρακιού διατήρησαν τη γεύση τους σε ικανοποιητικά επίπεδα μέχρι και την 10<sup>η</sup> ημέρα. Από την επόμενη ημέρα και μετέπειτα ήταν ακατάλληλα προς βρώση.

Σχετικά με την οργανοληπτική παράμετρο εμφάνιση διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα που συντηρούνταν σε απλή ψύξη, διατήρησαν καλή εμφάνιση για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, περίπου 9 ημερών. Από τη 10<sup>η</sup> ημέρα και μετέπειτα η αλλοίωση έγινε σημαντικά αισθητή. Όσον αφορά τα δείγματα που βρίσκονταν σε υπερψύξη, η

διατήρηση της καλής εμφάνισης διήρκησε παραπάνω, περίπου 10 ημέρες. Παρόλα αυτά τις επόμενες ημέρες σημειώθηκε σημαντικά αρνητική μεταβολή στην εμφάνισή τους.

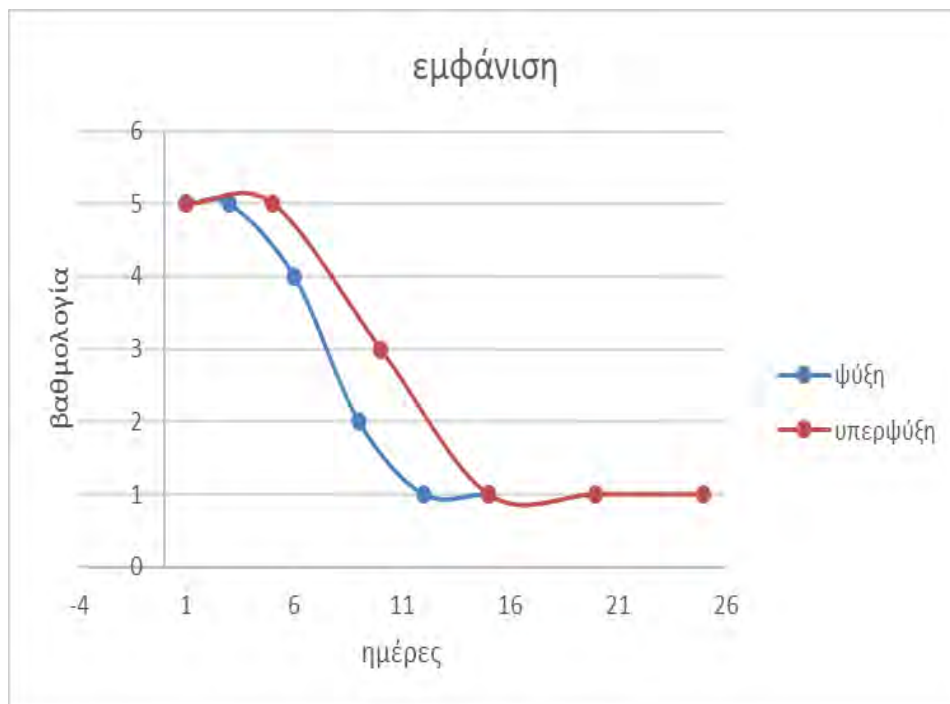
Και από τα τρία διαγράμματα παρατηρείται ότι η υπερψύξη σε σχέση με την απλή ψύξη διατηρεί πιο φρέσκο το λαβράκι για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, με εμφανώς καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα και όσον αφορά την οσμή, το ψάρι που ήταν συντηρημένο στους 2°C είχε αποδεκτή οσμή μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα ενώ αυτό που ήταν αποθηκευμένο στους -1,5°C, ήταν αποδεκτή η οσμή μέχρι την 13<sup>η</sup> ημέρα.

Αντίστοιχα για την γεύση, το ψάρι του ήταν διατηρημένο στους 2°C, ήταν αποδεκτό μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα, ενώ το συντηρημένο στους -1,5°C διατηρήθηκε σε αποδεκτά επίπεδα 3 ημέρες μετά, δηλαδή την 12<sup>η</sup> ημέρα.

Τέλος, όσον αφορά την εμφάνιση το δείγμα που ήταν στους -1,5°C διατηρήθηκε επίσης 3 ημέρες παραπάνω σε σχέση με αυτό στους 2 °C, δηλαδή ήταν σε μη αποδεκτά επίπεδα την 12<sup>η</sup> ημέρα, ενώ αντίστοιχα αυτό στους 2 °C ήταν σε μη αποδεκτά επίπεδα την 9<sup>η</sup>.

Όσον αφορά τον εμπορικό χρόνο ζωής στα συντηρούμενα φιλέτα λαβρακίου σε ψύξη (2°C) ήταν 9 μέρες ενώ στα αντίστοιχα φιλέτα σε υπερψύξη (-1.5°C) στις 16 μέρες.





**Σχήμα 7:** Μεταβολές της οργανοληπτικής βαθμολογίας της εμφάνισης φιλέτων λαβρακιού κατά την συντήρησή τους σε ψύξη (2°C) και υπερψύξη (-1.5°C)

#### 4. Συζήτηση

Ο βασικός σκοπός των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων είναι η παρεμπόδιση ή εξάλειψη των παραγόντων που αλλοιώνουν και υποβαθμίζουν την ποιότητα των τροφίμων και ιδιαίτερα των ευαλλοιώτων (π.χ ψάρια) (Ghaly et al, 2010). Ο στόχος είναι να παρεμποδισθούν οι ανεπιθύμητες μεταβολές που επιδρούν στη διατροφική αξία, στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στην υγιεινή κατάσταση των προϊόντων και τα

κάνουν ακατάλληλα για κατανάλωση. Για την αύξηση της διατηρησιμότητας των ευαλλοιώτων τροφίμων εφαρμόζονται σήμερα φυσικές μέθοδοι επεξεργασίας που στηρίζονται στην αξιοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων της χαμηλής θερμοκρασίας όπως η ψύξη και η κατάψυξη. Μεγάλη μικροβιοκτόνος δράση παρατηρείται στην περιοχή των θερμοκρασιών που συντελείται η κρυστάλλωση (πάγωμα) του νερού. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί θανατώνονται καθώς το τρόφιμο διέρχεται μεταξύ των  $-4^{\circ}\text{C}$  έως  $-10^{\circ}\text{C}$ . Σημαντικό είναι να επισημανθεί πως με την κατάψυξη σχεδόν ποτέ δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί πλήρης καταστροφή των μικροοργανισμών. Επομένως, τα κατεψυγμένα τρόφιμα δύναται να είναι από μικροβιακής πλευράς σταθερά, αλλά δεν είναι αποστειρωμένα. Κάποιοι μικροοργανισμοί (ψυχρόφιλοι) έχουν την δυνατότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των  $-5^{\circ}\text{C}$  και σε ορισμένες περιπτώσεις μέχρι και  $-10^{\circ}\text{C}$  (Ghaly et al., 2010).

Για την αποφυγή της δυνητικής αλλοίωσης των θαλασσιών χρησιμοποιούνται τεχνικές για την αξιολόγηση των οργανοληπτικών αλλαγών (οσμή, χρώμα, υφή) που συμβαίνουν στη σάρκα τους (Gram and Huss, 1996), τη μικροβιακή αλλοίωση, τις αυτολυτικές διαδικασίες και τη χημική οξείδωση (Ashie et al., 1996). Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί που οφείλονται για την αλλοίωση των φιλέτων ιχθύων λαβρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης ( $2 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) μετά από 25 μέρες, ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp* με δεύτερα επικρατέστερα τα υδροθειούχα ( $\text{H}_2\text{S}$ ) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), με πληθυσμούς στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης (ημέρα 15<sup>η</sup>),  $9,1 \log \text{cfu/g}$ . Βάση των παρόντων πειραματικών δεδομένων ο τελικός πληθυσμός των μικροοργανισμών αυτών δεν επηρεάστηκε από τις θερμοκρασίες συντήρησης. Δηλαδή τόσο υπό συνθήκες ψύξης όσο και υπερψύξης τα *Pseudomonas* δεν

μεταβάλλουν τον πληθυσμό τους. Σύμφωνα με την πλειοψηφία των ερευνητών, τα *Pseudomonas spp.* αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς και κατ' επέκταση τους ΕΑΜ σε ιχθύες όπως το λαβράκι (Tryfinopoulou et al., 2007). Οι Parlapani et al. (2013) και Parlapani et al. (2014) υποστηρίζουν ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί απαντώνται σε ιχθύες που αναπτύσσονται σε εύκρατα και τροπικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, ο Dainty (1996) αναφέρει ότι οι ουσίες που δίνουν τις χαρακτηριστικές οσμές σε ψάρια ευρείας κατανάλωσης όπως η τσιπούρα που αποθηκεύεται υπό αερόβιες συνθήκες, είναι προϊόντα μεταβολισμού των *Pseudomonas spp.*

Όπως προαναφέρθηκε, παρά τον υψηλό αρχικό πληθυσμό τα βακτήρια του είδους *Pseudomonas spp.* στα υπό εξέταση δείγματα λαυρακίου παρουσίασαν μικρότερη μικροβιακή ανάπτυξη συγκριτικά με τα εντεροβακτήρια και τα υδροθειούχα βακτήρια.

Πιο συγκεκριμένα, τα υδροθειούχα ( $H_2S$ ) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), είχαν πληθυσμούς, την αρχική ημέρα συντήρησης των ιχθύων κάτω από το όριο απαρίθμησης του  $\log cfu/g$  ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης έφτασαν τους  $8,15 \log cfu/g$ . Συγκριτικά με τις συνθήκες υπερψύξης, οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών αυτών παρουσίασαν σχετικά μικρότερο ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης, δηλαδή στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης έφτασαν τους  $7,44 \log cfu/g$ .

Κατά τους Gram et al., (1987) και Jørgensen and Huss (1998), τα υδροθειούχα ( $H_2S$ ) βακτήρια αποτελούν τους ΕΑΜ στους ιχθύες που προέρχονται από Βόρειες θάλασσες (π.χ γάδος) και συντηρούνται στους  $0^\circ C$  αποτελούν τους δεύτερους επικρατέστερους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς στα αλιεύματα που προέρχονται από τη Μεσόγειο (Paleologos et al., 2004; Tryfinopoulou et al., 2007), ενώ αποτελούνται κυρίως από

*Shewanella spp.* και στις δυο περιπτώσεις (Gram et al., 1987; Jørgensen and Huss, 1998; Parlapani et al., 2014).

Σχετικά με τα *Brochothrix thermosphacta* είχαν πληθυσμούς, την αρχική ημέρα συντήρησης των ιχθύων 1,51 log cfu/g ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης έφτασαν τους 6,25 και 6,75 log cfu/g, υπό συνθήκες ψύξης και υπερψύξης αντίστοιχα . Τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta* καθώς και 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). Επιπροσθέτως, ο Huis in't Veld (1996), υποστηρίζει ότι τα *Brochothrix thermosphacta* είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί σε συνθήκες κενού (Vacuum) και τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP), ενώ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 5 έως 10°C, τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae κυριαρχούν των *Pseudomonas spp.*, με την παρουσία τους σε υψηλά επίπεδα να υποδηλώνει πιθανή μόλυνση από κόπρανα ή ανεπαρκή επεξεργασία. Τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, στην παρούσα μελέτη, παρέμειναν στο όριο ανίχνευσης των 2.00 log cfu/g, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και για την τσιπούρα και για το λαβράκι. Επιπλέον, αναπτύσσονται βραδέως σε αερόβιες συνθήκες ψύξης (Huis in't Veld, 1996), ενώ κυριαρχούν υπό συνθήκες κενού σε ιχθύες που έχουν υποστεί κάπνιση κατά το τέλος της περιόδου αποθήκευσης (Leroi et al., 1998). Έτσι, η επικράτηση των μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση είναι στενά συνδεδεμένη με τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Στους ιχθύες της Βόρειας Ευρώπης, για παράδειγμα, το βακτήριο *Shewanella* αποτελεί τον κυρίαρχο αλλοιογόνο μικροοργανισμό στους 0°C, ενώ τα

Enterobacteriaceae και τα Vibrionaceae αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε υψηλότερες θερμοκρασίες (π.χ. 20°C) (Gram et al., 1987).

Όσον αφορά την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, η αρχική τιμή της για τους φιλέτα ιχθύες λαβρακιού που αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης ( $2 \pm 1^\circ\text{C}$ ) στην παρούσα μελέτη, την ημέρα 1<sup>η</sup> (24 h), ήταν 4,39 log cfu/g υποδηλώνοντας, σύμφωνα με τους Papadopoulos et al., (2003), καλή ποιότητα σάρκας για τους φρέσκους ιχθύες που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες. Η OMX υπερέβη τους 7.00 log cfu/g μετά την ημέρα 6 (168 h) και στις δυο συνθήκες συντήρησης. Κατά τους Taliadourou et al. (2003), η τιμή 7.00 log<sub>10</sub> cfu/g είναι το ανώτερο όριο αποδοχής για ιχθύες θαλασσινού και γλυκού νερού, φτάνοντας τους 8,03 και 8,32 log<sub>10</sub> cfu/g, στα υπό συντήρηση δείγματα σε συνθήκες ψύξης και υπερψύξης αντίστοιχα. Σχεδόν παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Kyra and Lougonois, (2002), οι οποίοι διαπίστωσαν πως η OMX ξεπέρασε τους 7.00 log<sub>10</sub> cfu/g μετά από 9 ημέρες, για απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους 0 °C. Επίσης, οι Paleologos et al. (2004), αναφέρουν πως η OMX υπερέβη τα 7.00 log<sub>10</sub> cfu/g μετά από 9 ημέρες, για απεντερωμένους ιχθύες λαβρακιού που είχαν αποθηκευτεί στους 0 °C.

Σε συντηρούμενα φιλέτα τσιπούρας υπό συνθήκες υπερψύξης, οι Parlapani et al (2013) παρατήρησαν την μέρα 0 μόνο τριάντα οκτώ (38) αποικίες από τις συνολικά 77 αποικίες, όταν η βιώσιμη μέτρηση ήταν τόσο χαμηλή όσο 3,88 log cfu/ g. Ωστόσο, μετά από 16 μέρες συντήρησης ο αριθμός των αποικιών ήταν είκοσι οκτώ (28) από 56 αποικίες, όταν το κυρίαρχο μικροβιακό ήταν 7,75 log cfu/g. Σε πρόσφατη ερευνητική μελέτη σχετικά με συντηρούμενα φιλέτα τσιπούρας υπό διάφορες συνθήκες οι Parlapani et al. (2017) διαπίστωσαν ότι η OMX υπερέβη τα 7.00 log<sub>10</sub> cfu/g μετά σχεδόν από 9 ημέρες, υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified

Atmosphere Packaging, MAP) στους 0°C. Με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 0°C στους 15°C οι ανώτεροι ερευνητές παρατήρησαν ότι η OMX υπερέβη τα 7.00 log<sub>10</sub> cfu/g μετά σχεδόν από 1 ημέρα υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP)

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλιεύοντες ιχθύες έχουν διαφορετικούς βακτηριακούς πληθυσμούς και ως εκ τούτου, ενώ στο σημείο οργανοληπτικής απόρριψης, η OMX κυμαίνεται από 7 έως 8 log<sub>10</sub> cfu/g (Gram and Huss, 1996). Επομένως, η OMX μπορεί να αποτελέσει ένα στοιχείο μικροβιολογικών κριτηρίων για την εκτίμηση της ποιότητας ενός προϊόντος (Montivelle and Matthews, 2010).

Σχετικά με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η υπερψύξη σε σχέση με την απλή ψύξη διατηρεί πιο φρέσκο το λαβράκι για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, με εμφανώς καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με τον Jones (2015), η συντήρηση σε υπερψύξη δύναται να διατηρήσει το λαβράκι φρέσκο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, καθώς επιβραδύνει σημαντικά την ανάπτυξη σημαντικών μικροοργανισμών, και κατά συνέπεια το φαινόμενο της αλλοίωσης αλλά και την επίδραση της στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Δηλαδή υπό τις συνθήκες αυτές παρατηρείται ότι υπάρχει σημαντική βελτίωση στον χρόνο εμπορικής ζωής των ιχθύων που αποθηκεύονται σε υπερψύξη. Συγκεκριμένα, και αφαιρώντας τις μελέτες που χρησιμοποίησαν και συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα, παρατηρείται ότι στον σολομό επιτεύχθη παράταση του χρόνου ζωής κατά 17 ημέρες στους -1,4 °C, όπου και ήταν το μεγαλύτερο στην κατηγορία των ιχθύων, με δεύτερο το ιαπωνικό λαβράκι όπου επιτεύχθηκε παράταση κατά 14 ημέρες στους -3, που ήταν κατά περίπου 9 ημέρες μεγαλύτερη από αυτή που επιτεύχθη στην παρούσα εργασία. Στα

υπόλοιπα ψάρια επιτεύχθηκε παράταση του χρόνου ζωής 5 ημερών σε ολόκληρο γάδο, στους -1 °C, 3 ημέρες στο φιλέτο του στους -1,5 °C, και 6 ημέρες σε γαρίδες.

Παρατηρείται ότι η θερμοκρασία της υπερψύξης δεν είναι σταθερή, και χρησιμοποιείται αναλόγως, με διαφορετικά αποτελέσματα και πλεονεκτήματα κάθε φορά. Μια άλλη παρατήρηση αφορά τις MAP (modified atmosphere package), οι οποίες και είναι γνωστές για την παράταση του χρόνου ζωής που επιτυγχάνουν στα τρόφιμα.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι, η μελέτη αυτή, λόγω του καθαρά επιστημονικού της χαρακτήρα, θεωρείται ως ένα βήμα προς τη βελτίωση των συνθηκών μετακίνησης, αποθήκευσης και γενικότερα συντήρησης του λαβρακιού, με σκοπό την αύξηση του εμπορικού χρόνου ζωής, και συνεπώς την μεγαλύτερη εξάπλωση του εμπορίου λαβρακιού, στο οποίο η χώρα μας διαθέτει μια σημαντική θέση εντός και εκτός Ε.Ε., άλλα και της βιομηχανίας της συντήρησης. Τελικώς το θέμα της συντήρησης με υπερψύξη χρήζει περαιτέρω έρευνας και μελέτης, αρχικώς όσον αφορά την πρακτική εφαρμογή τέτοιων τεχνολογιών πέρα από τα αλιευτικά σκάφη, ενώ η εφαρμογή του μπορεί να επεκταθεί και στα υπόλοιπα ψάρια εμπορικού ενδιαφέροντος.

## **5. Συμπεράσματα**

Με βάση τις μικροβιακές απαριθμήσεις, οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στα ελληνικά εύκρατα ύδατα είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., ακολουθούμενα από τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*). Αντιθέτως, τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae, καθώς και τα *Brochothrix thermosphacta* ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλότερους

πληθυσμούς, Ως εκ τούτου, τα *Pseudomonas* spp. δύναται να χαρακτηριστούν και μετά από διερεύνηση των μεταβολικού τους δυναμικού και ως οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) των ιχθύων λαβρακιού που προέρχονται από εύκρατα μεσογειακά ύδατα και έχουν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης και υπερψύξης.

Όσον αφορά την η υπερψύξη, η παρούσα έρευνα έδειξε ότι ο εμπορικός χρόνο ζωής στα συντηρούμενα φιλέτα λαβρακιού στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$  ήταν κατά μεγαλύτερος κατά 7 μέρες συγκριτικά με τον αντίστοιχο στις συνθήκες ψύξης. Ως εκ τούτου, η υπερψύξη δύναται να αποτελέσει ένα μέσο για τη διατήρηση των ιχθύων λαβρακιού πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση. Όταν ένας ιχθύς αποθηκεύεται σε θερμοκρασία  $<0$  αλλά όχι υπερβολικά χαμηλές τόσο οι ενζυμικές όσο και οι χημικές αντιδράσεις, καθώς και η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνονται. Επομένως, η αποθήκευση ιχθύων υπό αερόβιες συνθήκες υπερψύξης συνιστούν ένα καλό μέσο συντήρησης και παράτασης της διάρκειας ζωής των νωπών αλιευτικών προϊόντων.

## **6. Βιβλιογραφία**

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

- Χώτος, Γ. και Ι. Ρογδάκης, (1992). Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. Λαβράκι και τσιπούρα. Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης. Εκδόσεις ΙΩΝ Περιστέρι ISBN 960-405-364-7, Αθήνα.



- Μπλούκας, Ι.Γ. (2004). Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων, Σταμούλης, Αθήνα.

### **Ξενογλώσση βιβλιογραφία**

- Antoine, F. R., Wei, C. I., Otwell, C. A., Sims, R. C., Littell, R. C., Hogle, A. D., Marshall, M. R. (2002). TVB-N correlation with odor evaluation and aerobic plate count in Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Food Science*. 67. 3210–3214.
- 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. 87-121.
- Carlson. C. J. (1969). Superchilling fish - a review. In R. Kreuzer (editor). *Freezing and irradiation of fish*. p. 101-103. Fish. News (Books) Ltd., Lond.
- Charm, S. E. (1971). *The fundamentals of food engineering*. 2nd ed. The Avi Pub. Co., Inc. Westport, Conn.692 p.
- Dainty, R. H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33. 19-33.
- Dalgaard, P., Gram, L. and H.H. Huss. (1993) Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283-294.
- Fernandez K., Aspe E., Roeckel M (2009). Shelf life extension on fillets of atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. *Food control*. 11: 1036–1042.

- Ghaly A.E., D. Dave, S. Budge and M.S . Brooks (2010). Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review. *American Journal of Applied Sciences* 7: 859-877.
- Gram and Dalgaard (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13. 262-266.
- Gram, L. and Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33. 121-137.
- Gram, L. and Melchiorson, J. (1996) Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *S. putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, 80. 589-595
- Gram, L., Trolle, G. and 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.
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C. and Huss, H.H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, 10:303-31
- Herbert, R.A. and Shewan, J.M. (1975). Precursors of volatile sulphides in spoiling North Sea cod (*Gadus morhud*). *Journal Science of Food Agriculture* 26, 1195-1202.
- Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33. 1-18.
- Huss, H.H. (1995) Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*. No 348. FAO. Rome.

- Huss, H.H., Jeppesen, V.F., Johansen, C. and Gram, L. (1995) Biopreservation of fish products-a review of recent approaches and results. *Journal of Aquaculture Food Technology* 4: 5-26
- ICMSF, (2000). *Microorganisms in Foods. Vol 6. Microbial Ecology of Food Commodities. Fish and Fish products* pp 130-189, Blackie Academic & Professional, London.
- Jones, G.(2015). Extending the shelf-life of meat and fish products with superchilling. *International Meat Topics* ,6. 20-21.
- Jørgensen, B.R., Gibson, D.M. and Huss, H.H.(1988). Microbiological quality and shelf-life prediction of chilled fish. *International Journal of Food Microbiology*, 6: 295-307.
- Jørgensen, B. R. and Huss, H. H. (1989). Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology* 9. 51-62.
- Kaale, L. D., Eikevik, T. M., Rustad, T., and Kolsaker, K. (2011). Superchilling of food: A review. *Journal of food engineering*, 107: 141-146.
- Koutsoumanis K., and Nychas, G-J.E. 1999. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boqueron (Boqueron boqueron) stored aerobically at 0,3,7 and 10°C. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 698-706.
- 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.

- Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E., (2000). Application of a systematic experimental procedure in order to develop a microbial model for rapid fish shelf life prediction, *International Journal Food Microbiology*, 25:171-84.
- Koutsoumanis, K. (2001). Predictive modelling shelf life of fish at non-isothermal conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1821-1829.
- Kyra, V. R. and 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 and Technology* 37. 319-328.
- 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.
- Montville, J. T. and Matthews, K. R. (2010). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Κεφάλαιο 6: Μικροοργανισμοί Δείκτες και Μικροβιολογικά Κριτήρια. σελ. 85-86. Κεφάλαιο 24: Φυσικές Μέθοδοι Συντήρησης Τροφίμων. σελ. 390.
- Oehlenschläger J. (1997a). Suitability of ammonia-N, dimethylamine-N, trimethylamine-N, trimethylamine oxygen-N and total volatile basic nitrogen as freshness indicators in seafood. In: Olafsdottir G. et al. (eds.) *Methods to determine the freshness of fish in research and industry*. International Institute of Refrigeration, Paris, pp. 92-99.
- Oehlenschläger J. (1997b) Volatile amines as freshness/spoilage indicators. A literature review. In: Luten J.B. et al. (eds.) *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*. Elsevier, Amsterdam, pp. 571-588.

- 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.
- 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.
- Parlapani, F. F., Kormas, K. Ar, and Boziaris, I. S. (2015a). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 2386—2394.
- Parlapani, F. F., Malouchos, A., Haroutounian, S. A., and Boziaris, I. S. (2014b). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 189: 153—163.
- Parlapani, F. F., Malouchos, A., Haroutounian, S. A., Boziaris, I. S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189. 153-163.
- Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, K. Ar., Boziaris, I. S. (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. and I.S. Boziaris (2016).Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures LWT - Food Science and Technology.66: 553—559.
- Parlapani, F.F., A. Mallouchos, S.A. Haroutounian, and I.S. Boziaris (2017).Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria Food Science and Technology , 78:54-62 .
- Power, H. E., and M. L. Morton. (1965). Effect of superchilled storage on the quality of gutted round cod. Fish. Res. Board Can. New Ser. Circ. 23.
- Ronsivalli, L.J. and D. W., Baker (1981). Low Temperature Preservation of Seafoods: A Review. Marine Fisheries Review 43. 1-15.
- 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.
- 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.

#### **Ιστότοποι**

- [https://en.wikipedia.org/wiki/European\\_bass](https://en.wikipedia.org/wiki/European_bass)

- <http://www.fao.org/fishery/species/2291/en>
- <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5910e/x5910e01.htm>