



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Π.Δ.Ε.

**Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και
οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του κατεψυγμένου**

θράψαλου (*Illex coindetii*) στους 2°C

Shelf-life, microbiological, chemical and sensory changes

During the storage thawed short fin squid (*Illex coindetii*) at 2°C



ΤΕΡΠΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΒΟΛΟΣ, 2018

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

2. Δημήτριος Βαφείδης (Δρ.), Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση – έμμεση χρηστικότητα τους, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη συνεχή προσπάθεια και την ολοκλήρωση της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου και με τις συμβουλές τους κατάφερα να τα φέρω εις πέρας.

Πρώτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για όλα αυτά που μου έχει προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια και τη συνεχή στήριξή της σε όλες τις δύσκολες στιγμές της ζωής μου.

Ύστερα θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για τη στήριξή του και τη διαρκή βοήθειά του, τόσο για τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενη από τον κ. Κωνσταντίνο Κορμά.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την κ. Φωτεινή Παρλαπάνη για το μεράκι που διέθεσε, αλλά και για τη συνεχή και διαρκή βοήθειά της όλον αυτόν τον καιρό που διήρκησε η διπλωματική μου εργασία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο φίλο και συνάδελφο Χρήστο Ντάβαρο για την τέλεια συνεργασία και στήριξη που είχαμε κατά την ολοκλήρωση της διπλωματικής μας εργασίας.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Γενικά στοιχεία για τα κεφαλόποδα	8
1.2. Ιστορική αναδρομή για τα κεφαλόποδα.....	9
1.3. Στοιχεία βιολογίας κεφαλόποδων.....	10
.....	10
1.4. Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων.....	10
1.5. Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων.....	11
1.6. Διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού.....	11
1.7. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης.....	12
1.8. Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (EAM)	12
1.9. Σκοπός της εργασίας	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
2.1. Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	15
2.2. Προέλευση δειγμάτων.....	15
2.3. Μικροβιολογικά υλικά	15
2.4. Μικροβιολογική Ανάλυση	15
2.5. Χημική ανάλυση	16
2.5.1 Αλλαγή του pH κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των κεφαλόποδων ...	16
2.5.2. Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Αζώτου TVB-N και Τριμεθυλαμίνης TMA-N	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	18
3.1. Οργανοληπτικές αλλαγές και εμπορικός χρόνος ζωής των κεφαλόποδων	18
3.2. Μικροβιολογική ανάλυση	19
3.3. Χημική Ανάλυση	20

3.3.1. Προσδιορισμός pH	20
3.3.2. Προσδιορισμός του αζώτου τριμεθυλαμίνης TMA-N	20
3.3.3. Προσδιορισμός του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N).....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	25
Ξενόγλωσση	25
Ηλεκτρονική	31

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών με σκοπό την εκτίμηση της ποιότητας και του εμπορικού χρόνου ζωής του θράψαλου στους 2°C. Θράψαλα ελήφθησαν από την περιοχή της Χαλάστρας (Ν. Θεσσαλονίκης), τον Φεβρουάριο του 2016 και αποθηκεύθηκαν στους 2°C. Δείγματα θράψαλων λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 2 ημέρες) για οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις (Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο, Άζωτο της Τριμεθυλαμίνης).

Η αλλοίωση στα νοπά αλιευτικά προϊόντα οφείλεται στη μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Ο βαθμός αλλοίωσης των προϊόντων προσδιορίζεται με οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεθόδους. Η σπουδαιότερη χημική παράμετρος που σχετίζεται με τη μικροβιακή δραστηριότητα είναι το Ολικό Βασικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N). Η ψύξη είναι ένα μέσο για τη διατήρηση των ιχθύων πριν την επεξεργασία ή την κατανάλωση.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής των θράψαλων ήταν τέσσερις (4) ημέρες (4days). Το αρχικό pH για του θράψαλου ήταν 6.31. Έπειτα το pH της σάρκας του θράψαλου είχε ελάχιστα αυξηθεί μετά την 4η μέρα, (day 4->pH = 6.44) φθάνοντας την τιμή του 6.57.

Αρχικά την πρώτη μέρα (day 0), το APC των κατεψυγμένων θράψαλων ήταν 2logcfu/g. Στα θράψαλα οι πληθυσμοί των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, *Pseudomonas spp.* και οξυγαλακτικά βακτήρια που ανιχνεύθηκαν ήταν, (2 και 2.95 logcfu/g), αντίστοιχα. Στο σημείο απόρριψης, το APC έφθασε στα επίπεδα των 2.95logcfu/g. Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas spp.* και οξυγαλακτικών βακτηρίων έφθασε στα επίπεδα των 2.41 και 2.95 logcfu/g αντίστοιχα (day 4). Οι υπόλοιποι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Στην αρχή η TMA-N ήταν στην τιμή του 14.71 mg N/100g για το θράψαλο ($p > 0.05$). Για τις 2 πρώτες μέρες υπήρξε διαφορά, ενώ μετά την 4η μέρα συντήρησης η τιμή της TMA-N αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0.05$), φθάνοντας το 28.05mg N/100g (day4). Η αρχική συγκέντρωση του TVB-N ήταν 13,21 mg /100g ($p > 0.05$). Οι πρώτες μέρες συντήρησης, η τιμή του TVB-N δεν διέφεραν και πολύ ($p > 0.05$). Έπειτα από 4

μέρες συντήρησης η τιμή του TVB-N ξαφνικά αυξήθηκαν ($p > 0.05$) (Fig. 4). Στο τέλος του πειράματος η τιμή του TVB-N έφθασε στο 24.30 mg N/100g (day 8).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το θράψαλο χαρακτηρίστηκε οργανοληπτικά μη αποδεκτό (4^η ημέρα) όταν α) τα *Pseudomonas* spp. και τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν τους δύο σημαντικότερους σε πληθυσμό αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, χωρίς να ξεπεράσουν το επίπεδο των $4 \cdot 10^6$ cfu/g, β) το pH έφτασε στην τιμή 6,57 και γ) οι συγκεντρώσεις του TVB-N και TMA-N έφτασαν στα επίπεδα των 24,30 και 55,68 mg N Kg⁻¹ αντίστοιχα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, φαίνεται ότι το TVB-N και TMA-N θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αλλοίωσης των θραψάλων.

ABSTRACT

The aim of this work is to (i) determine the microbiological changes and shelf-life of Squid stored at 2°C, and (ii) carry out an investigation of Total Volatile Basic Nitrogen and Trimethylamine Nitrogen (TVB-N and TMA-N) profiles, in order to reveal their potential to be used as Chemical Spoilage Indices (CSIs) of squid spoilage/freshness. This study will give valuable information regarding the spoilage of squid which is an important added-value product of seafood market.

Shelf life squid, as determined by the overall sensory scores, was 4 days. The pH value showed a considerable increase after the end of shelf-life (day 4), reaching the level of 6.44 at the end of storage period. *Pseudomonas* spp. and producing bacteria, were the dominant bacteria and reached populations not higher than $4 \log_{10}$ cfu/g. Enterobacteriaceae populations were not higher than $5 \log_{10}$ cfu/g, while LAB remained below the detection limit of $1 \log_{10}$ cfu/g throughout the experiment. Aerobic Plate Counts reached the level of $4 \log_{10}$ cfu/g at the end of shelf life of squid (day 4). TVB-N and TMA-N values increased substantially from the middle of storage, reaching a value of 24.30 and 55.68 mgN Kg⁻¹ at the end of shelf life (day 4).

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά στοιχεία για τα κεφαλόποδα

Το θράψαλο (*Illex coindetii*) ανήκει στην κλάση των Κεφαλοπόδων (Cephalopoda), ενός αθροίσματος ασπόνδυλων ζώων τα οποία αποτελούν την πιο εξελιγμένη μορφή μαλακίων από πλευράς μορφολογίας, η δε πολυπλοκότητα του οργανισμού τους, εξελικτικά, είναι συγκρίσιμη ακόμα και με αυτή των σπονδυλωτών. Τα Κεφαλόποδα είναι ανώτεροι εξελικτικά θαλάσσιοι οργανισμοί, εκπρόσωποι των οποίων έχουν βρεθεί σε διάφορες γεωλογικές περιόδους. Σήμερα υπάρχουν μόνο 700 είδη περίπου, τα οποία εκτός από τους ναυτίλους ανήκουν στην υφομοταξία των κολεοειδών γνωστών με κοινές ονομασίες όπως χταπόδια, καλαμάρια, θράψαλα και σουπιές. Συναντώνται σε μεγάλη ποικιλία βιοτόπων και ορισμένα είδη παρουσιάζουν μεγάλη αφθονία αποτελώντας σημαντική πηγή διατροφής τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τους μεγάλους θηρευτές της θάλασσας όπως τα Κητώδη, οι καρχαρίες τα μεγάλα πελαγικά ψάρια και τα θαλάσσια πουλιά (Clarke 1996, Piatkowski et al. 2001).

Τα Κεφαλόποδα είναι δραστήριοι θηρευτές, τρεφόμενοι με μεγάλη ποικιλία ζωντανής λείας. Χαρακτηρίζονται από ψηλούς ρυθμούς μεταβολισμού και ανάπτυξης, που τα αναγκάζει σε εποχιακές οριζόντιες μεταναστεύσεις ή σενυχθήμερες κάθετες μετακινήσεις στη στήλη του νερού για κάποια πελαγικά είδη, προκειμένου να εξασφαλίσουν την απαιτούμενη ποιότητα και ποσότητα τροφής ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης τους (Rodhouse & Nigmatulin 1996).

Ο ρυθμός αύξησης στα Κεφαλόποδα ποικίλει σχετιζόμενος σε μεγάλο βαθμό με την εποχή, την διαθέσιμη τροφή, τη θερμοκρασία και τη πυκνότητα του πληθυσμού (Ehrhardt et al. 1983, Rodhouse et al. 1988), με αποτέλεσμα η αύξηση να εμφανίζεται σχεδόν γραμμική σε συνθήκες άφθονης τροφής, ενώ να επιβραδύνεται συνοδευόμενη μάλιστα από θνησιμότητα των νεαρότερων ατόμων, λόγω κανιβαλισμού, όταν η τροφή είναι περιορισμένη (Caddy 1991). Η διάρκεια ζωής νητρικών αλλά και ωκεάνιων ειδών που έχουν μελετηθεί, εκτός από τα Ναυτιλοειδή, δεν ξεπερνά τα 1-2 χρόνια, με σχεδόν καθολική θνησιμότητα των γεννητόρων μετά το τέλος της ωοτοκίας (Boyle 1990, Arkhipkin 1992). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από την ξαφνική εξαφάνιση των μεγάλων ατόμων που παρατηρείται στους πληθυσμούς των Κεφαλόποδων μετά την περίοδο ωοτοκίας αλλά και την καταγραφή μαζικών θανάτων των θηλυκών γεννητόρων στα πεδία ωοτοκίας σε είδη καλαμαριών (*Loligo opalescens*, Fields 1965, Hixon 1983) καθώς και του θανάτου μεμονωμένων

θηλυκών χταποδιών μετά την εκκόλαψη και των τελευταίων αυγών που έχουν ελευθερώσει και φροντίσει για 1-5 μήνες (Mangold 1987). Στα κολεοειδή Κεφαλόποδα έχουν παρατηρηθεί ποικίλες τακτικές αναπαραγωγής, από σύγχρονη ωοτοκία σε μικρό χρονικό διάστημα πριν το τέλος της ζωής τους μέχρι τμηματική ωοτοκία που καλύπτει μεγάλο τμήμα της συνολικής διάρκειας της ζωής τους, με ασύγχρονη ανάπτυξη των ωαρίων και σωματική αύξηση του ζώου μεταξύ των διαφορετικών εναποθέσεων αυγών (Rocha et al. 2001). Η γεννητική ωρίμανση και ωοτοκία στις συνθήκες των εύκρατων ζωνών πραγματοποιούνται συνήθως σε ετήσια βάση με εποχιακή κορύφωση, οπότε η μαζική θνησιμότητα μετά την ωοτοκία είναι αναμενόμενη και έχει σαν αποτέλεσμα τη μη επικάλυψη ομάδων ενηλίκων ατόμων από διαφορετικές ετήσιες γενιές και την εξάρτηση του μεγέθους της βιομάζας ενός πληθυσμού από την εκάστοτε νεοεισερχόμενη γενιά. Η αφθονία των νεαρών ατόμων που εισέρχονται στον πληθυσμό εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις από χρόνο σε χρόνο, όπως και στους περισσότερους θαλάσσιους Οστεϊχθείς. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες και ο ανταγωνισμός μεταξύ των ειδών παίζουν ιδιαίτερο ρόλο για το μέγεθος τόσο της νεοεισερχόμενης γενιάς όσο και της συνολικής βιομάζας του πληθυσμού, ενώ η σχέση αποθέματος και αφθονίας νεοεισερχόμενων ατόμων φαίνεται να είναι πολύ μικρότερης σημασίας για τους πληθυσμούς των Κεφαλόποδων απ' ό,τι για τους ιχθυοπληθυσμούς (Boyle & von Boletzky 1996, Lipinski et al. 1998). Αξιοσημείωτες είναι συχνά και οι εποχιακές διακυμάνσεις της βιομάζας που παρουσιάζουν πολλά είδη των Κεφαλόποδων, λόγω της μαζικής θνησιμότητας μετά την περίοδο αναπαραγωγής αλλά και του μεγάλου ρυθμού αύξησης που έχει σαν συνέπεια τη γρήγορη μεταβολή του μέσου ατομικού βάρους του πληθυσμού (Beddington et al. 1990, Wurtz et al. 1992). Ο βαθμός εποχικότητας της ωοτοκίας και συγχρονισμού των γεννητόρων ενός είδους, συμβάλουν στην ένταση ή στην άμβλυνση της εποχιακής και ετήσιας διακύμανσης της βιομάζας.

1.2. Ιστορική αναδρομή για τα κεφαλόποδα

Η κλάση των κεφαλόποδων σήμερα αντιπροσωπεύει ένα απομεινάρι μιας παλαιάς και κάποτε κυρίαρχης ομάδας μαλακίων τα οποία διαφοροποιήθηκαν νωρίς από τα πρωτόγονα αποθέματα μαλακίων. Έγιναν καταπληκτικά άφθονα σε αριθμό ειδών κατά τη διάρκεια των περιόδων περί το τέλος του Παλαιοζωικού και Μεσοζωικού, αριθμούνται περισσότερο από 10.000 είδη για να λιγοστέψουν σήμερα

σε 600 ζώντα είδη περίπου. Μερικές από τις κύριες ομάδες έχουν εξαφανισθεί ολοκληρωτικά, ενώ άλλα έχουν μερικούς αντιπροσώπους που ζουν και σήμερα. Εντούτοις, αρκετά από τα σημερινά κεφαλόποδα είναι πετυχημένα, ευρισκόμενα σε πολύ μεγάλη αφθονία και ευρέως κατανεμημένα δίδοντα την εντύπωση ότι, τα χταπόδια π.χ. ακόμη και στην παρούσα περίοδο, υπόκεινται σε δραστική εξελικτική διαφοροποίηση.

Τα κεφαλόποδα εμφανίστηκαν κατά την περίοδο του Καμβρίου (620 εκατομμύρια χρόνια πριν, διήρκεσε 70 εκατομμύρια χρόνια) και κατά τη διάρκεια του Παλαιοζωικού (620- 230 εκατομμύρια χρόνια πριν) και Μεσοζωικού (230-67 εκατομμύρια χρόνια πριν)αιώνα, είχαν δύο μεγάλες περιόδους εξελικτικής ανάπτυξης με σχηματισμό πολλών ειδών.

1.3. Στοιχεία βιολογίας κεφαλόποδων

Τα βιολογικά χαρακτηριστικά των Κεφαλόποδων τα καθιστούν ικανά να προσαρμόζονται εύκολα σε ασταθείς περιβαλλοντικές συνθήκες, θεωρούμενα επιλεκτικά είδη. Οι δραματικές διακυμάνσεις που συχνά παρατηρούνται στην αφθονία και την αλιευτική παραγωγή των Κεφαλόποδων από χρόνο σε χρόνο, δεν σχετίζονται τόσο με την ασκούμενη αλιευτική προσπάθεια όσο με την ικανότητα των πληθυσμών των Κεφαλόποδων να ανταποκρίνονται πολύ σύντομα σε φυσικές αλλά και ανθρωπογενείς αλλαγές στο θαλάσσιο οικοσύστημα (Rodhouse&Nigmatulin 1996). Υπάρχουν ενδείξεις ότι σε περιοχές όπου τα αποθέματα μακροβιότερων ειδών ιχθύων μειώνονται λόγω υπεραλίευσης ή κλιματολογικών συνθηκών, τα Κεφαλόποδα τείνουν να αυξήσουν το μέγεθος του πληθυσμού τους εκμεταλλευόμενα τη μείωση των θηρευτών τους και των ανταγωνιστών τους στην τροφή (Pauly 1979, Caddy 1983) αντικαθιστώντας τα ψάρια στην αλιευτική παραγωγή. Στη διαμόρφωση βέβαια της εικόνας της αλιευτικής παραγωγής συμβάλλει και η στροφή του ενδιαφέροντος των αλιευτικών στόλων προς τα εμπορικά είδη των Κεφαλόποδων μετά τη μείωση άλλων εμπορικών ειδών (Balguerias etal. 2000).

1.4.Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων

Τα αλιεύματα και τα προϊόντα τους είναι δυνατό να επιμολυνθούν με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας τους, με αποτέλεσμα να είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Η αύξηση ή όχι των

παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Buchanan&Bagi 1999, Grametal. 2002, Skandamis&Nychas 2002).

1.5. Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων

Η αύξηση διοξειδίου του άνθρακα και η μείωση οξυγόνου στη συσκευασία MAP έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες και τη δημιουργία πιθανώς πιο ευνοϊκού περιβάλλοντος για την αύξηση άλλων μικροοργανισμών, όπως είναι οι παθογόνοι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Farber 2001). Έτσι, η συσκευασία σε MAP είναι δυνατόν να επιτρέψει την αύξηση παθογόνων σε επίπεδα μεγαλύτερα από εκείνα που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης (Davies 1997). Οι Skandamis and Nychas (2002) αναφέρουν ότι οι συσκευασίες κενού ή MAP αυξάνουν την ανησυχία για αύξηση και επιβίωση μικροαερόφιλων ή/και ψυχρότροφων παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα γενικά όπως και στο θράψαλο. Πρόσθετα εμπόδια, όπως τα φυσικά συντηρητικά ή άλλες νεοεμφανιζόμενες τεχνολογίες (Skandamis&Nychas 2002, Chouliaraetal. 2004) είναι τα πολλά υποσχόμενα όπλα για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων.

Η χρήση των αλάτων οργανικών οξέων, όπως είναι το κιτρικό νάτριο, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αντιμικροβιακής (Zhuangetal. 1996, Sallam 2007) και αντιοξειδωτικής του δράσης (Lee *etal.* 2005). Συγκεκριμένα, τα άλατα αυτά δρουν έναντι της αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής στα τρόφιμα όπως στο κρέας (Maca *etal.* 1997, Sallam&Samejima 2004), στα πουλερικά (Williams&Phillips 1998) και στους ιχθύες (Boskou&Debevere 2000, Zhuang *etal.* 1996).

1.6. Διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής σύνθεσης ενός τροφίμου (απομόνωση, ταυτοποίηση, ανίχνευση και απαρίθμηση των μικροοργανισμών) στηρίζονται κυρίως στη χρήση εκλεκτικών ή γενικής χρήσης τεχνητών υποστρωμάτων (θρεπτικά υλικά) και χαρακτηρίζονται ως κλασσικές μέθοδοι. Η αξιοπιστία των κλασσικών τεχνικών περιορίζεται εξαιτίας της δυνατότητας μέτρησης μόνο των κυττάρων που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν

αποικίες καθώς και από την αξιοπιστία του ίδιου του υποστρώματος (θρεπτικό υλικό). Επίσης, τα καταπονημένα ή τραυματισμένα κύτταρα δεν αναπτύσσονται σε εκλεκτικά υλικά, ενώ άλλα παρεμποδίζονται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αφθονία (Hugenholtz et al. 1998). Γενικά, οι κλασσικές τεχνικές χαρακτηρίζονται ως χρονοβόρες και καλύπτουν μικρότερο ποσοστό του 1% των ειδών των μικροοργανισμών που απαρτίζουν τη μικροβιακή σύνθεση ενός περιβαλλοντικού δείγματος (Ward et al. 1990).

1.7. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

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

1.8. Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (EAM)

Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα μιας σειράς αλλαγών στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου, λόγω της επικράτησης των μικροοργανισμών (Nychaset al. 2008). Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στους μεταβολίτες των μικροοργανισμών και γίνονται αντιληπτές με τις μεταβολές που παρατηρούνται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευτικών προϊόντων, όπως είναι η οσμή, το άρωμα και η γενική εμφάνιση (Parlapani et al. 2014). Οι Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard 2002). Οι EAM αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης των 7-9 log cfu/g οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους, έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard et al. 1993, Gram & Huss 1996, Huisin't Veld 1996). Το επίπεδο ανάπτυξης των EAM, μπορεί να χαρακτηριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης,

ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη που αντιπροσωπεύει την αλλοίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημικός δείκτης αλλοίωσης (Chemical Spoilage Index, CSI) (Dalgaard 1993).

Η επικράτηση των ΕΑΜ δεν είναι καθορισμένη, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από μία σειρά παραγόντων κατά την παραγωγική αλυσίδα όπως επεξεργασία, μεταφορά και συντήρηση (Nychas, etal 2008). Οι μικροοργανισμοί που τελικά θα επικρατήσουν, είναι αυτοί οι οποίοι διαθέτουν τέτοιες στρατηγικές, που τους επιτρέπουν να προσαρμοστούν καλύτερα στο μικρό περιβάλλον του τροφίμου. Είναι γνωστό πλέον, ότι σε κάθε τρόφιμο, πέντε είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Πίνακας 1.8.). Οι παράγοντες αυτοί μαζί αποτελούν τις συνιστώσες από κάθε ένα διαφορετικό σημείο του τροφίμου, η εξέλιξη του οποίου είναι διαφορετική στο χωροχρόνο, επηρεάζει και επηρεάζεται από τους μικροοργανισμούς. Η τροποποίηση ή ο έλεγχος ενός ή περισσότερων παραγόντων οδηγεί σε διαφορετική επιλογή και εξέλιξη των μικροοργανισμών, χαρακτηριστικό που μπορεί να έχει εφαρμογή στη δημιουργία προϊόντων με μεγάλη διάρκεια ζωής (Nychas.etal. 2005).

Πίνακας 1.8.

Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη(Nychas.etal. 2005).

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

1.9. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας είναι ο προσδιορισμός των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών για την εκτίμηση της ποιότητας και του εναπομείναντος εμπορικού χρόνου ζωής των θράψαλων αποθηκευμένων στους 2°C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Σε 8 (οκτώ) θράψαλα πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και του προφίλ των παραγόμενων χημικών δεικτών αλλοίωσης όπως TVB-N, TMA, καθώς επίσης και η μέτρηση του pH των δειγμάτων στους 2°C.

2.2. Προέλευση δειγμάτων

Τα θράψαλα ($\approx 500-700$ γ) παρασχέθηκαν από μια ελληνική επιχείρηση και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Ανάπτυξης και Τεχνολογίας Υδρόβιων Προϊόντων και Τροφίμων (Τμήμα Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) τον Αύγουστο του 2015. Τα κατεψυγμένα κεφαλόποδα τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε ένα ψυγείο 5°C για να ξεπαγώσουν. Κατόπιν, τα απεψυγμένα κεφαλόποδα αποθηκευτήκαν στους επωαστήρες που λειτουργούν σε 2°C για 8 ημέρες. Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας, (2) άτομα λήφθηκαν για τις αναλύσεις.

2.3. Μικροβιολογικά υλικά

Όλα τα μικροβιολογικά υλικά από την LAB M (Lancashire, UK), εκτός από το STAA (streptomycinsulphate, thallusacetate, cycloheximideactidioneagar) το οποίο προέρχονταν από την Biolife Italianasrl (Milano, Italy). Το Iron Agar (IA) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Grametal. (1987) και περιείχε τα παρακάτω: peptone 20 g l⁻¹, meat extract 3.0 g, yeast extract 3.0 g l⁻¹, ferric citrate 3.0 g l⁻¹, sodium thiosulphate 0.3 g l⁻¹, NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 g l⁻¹, agar 14 g l⁻¹. Το Ph ρυθμίστηκε στο 7.4.

2.4. Μικροβιολογική Ανάλυση

Εικοσιπέντε (25) g δείγματος (σάρκας) από κάθε άτομο μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σακούλες τύπου stomacher, προστέθηκε 225 ml MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.1% w/v peptone, 0.85% w/v NaCl) και ομογενοποιήθηκαν για 2 λεπτά με τη χρήση της συσκευής Stomacher (BugMixer, Interscience, London, UK). Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με 0.1 ml MRD και απλώθηκαν στην επίστρωση

του ξηρού μέσου σε τριβλία Petri για την καταμέτρηση των α) Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός (APC) σε TSA (TryptoneSoyAgar),) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48-72 ώρες, (b)*Pseudomonas*spp., σε cetrimide-fucidin-cephaloridineagar (CFC), μετά από επώαση για 48 h στους 25°C και (c) *Brochotrixthermosphacta*, σε STAA, μετά από επώαση για 48 -72 h στους 25°C. Επίσης, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις με 1mlMRD και χρησιμοποιήθηκε τεχνική της ενσωμάτωσης για καταμέτρηση των (α)βακτηριών που παράγουν H₂S σε 1A μετρώντας μόνο τις μαύρες αποικίες , μετά από επώαση στους 25°C για 72 h, (b) Οξυγαλακτικά βακτήρια(LAB) σε DeMan, Rogosa, Sharpeagar (MRS) μετά από επώαση στους 25°C για 72 h. Η απαρύθμιση των οξυγαλακτικών βακτηριών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, ενώ του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού, *Pseudomonas* spp. και των βακτηριών που παράγουν H₂S με την τεχνική της επίστρωσης.

Το TSA είναι το πιο σημαντικό μέσο Άγαρ για την APC καταμέτρηση λόγω της ικανότητας να μας δίνει δέκα υψηλότερους αριθμούς αποικιών συγκριτικά με άλλα μέσα που χρησιμοποιούνται για APC στα θαλασσινά (Kakasis etal. 2011).

2.5. Χημική ανάλυση

2.5.1 Αλλαγή του pH κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των κεφαλόποδων

Το pH της σάρκας των κεφαλόποδων υπολογίστηκε τοποθετώντας ηλεκτρόδια pH (Inolab WTW pHmeter, Weilheim, Germany) σε αναλογία 1/10 σάρκας κεφαλόποδων/MRD ομογενοποιημένων στους 20°C.

2.5.2. Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Αζώτου TVB-N και Τριμεθουλαμίνης TMA-N

Τα αντίστοιχα χημικά παρέχονται από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Δέκα (10) g σάρκας ομογενοποιήθηκαν με διάλυμα 60 g/L τριχλωροοξικού οξέος (TCA) και κατόπιν ακολούθησε διήθηση μέσω ηθμού Whatman No.1 σε ογκομετρική φιάλη 100 ml . Ποσότητα σαράντα (40) ml εις διπλούν του διηθήματος χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση TVB-N χρησιμοποιώντας την μεθ' υδρατμών μέθοδο, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά (Vyncke et al.1987). Τα υπόλοιπα 10 ml, ανά δοκιμή, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό

της τριμεθυλαμίνης TMA φασματοφωτομετρικά χρησιμοποιώντας πικρικό οξύ, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά σύμφωνα με τον Dyer (1945). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg N/100g \pm σταθερής απόκλισης των 4 επαναλήψεων (2 επαναλήψεις για κάθε ομάδα).

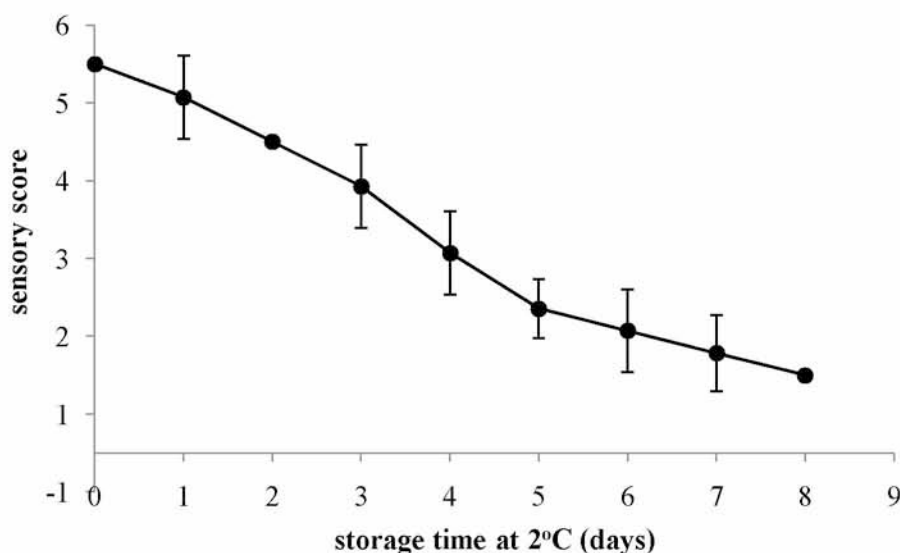
2.6 Ανάλυση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

Η ανάλυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών πραγματοποιούνταν κάθε μέρα προκειμένου να καθοριστεί το χρονικό σημείο απόρριψης. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν 8 θράψαλα. Η αξιολόγηση εκτελέστηκε από πέντε εκπαιδευμένους κριτές. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες που αξιολογήθηκαν περιγράφονται από τους Vaz-Pires και Seixas (2006) για τα θράψαλα (εμφάνιση και χρωματισμός του δέρματος/ραχιαία πλευρά, μυρωδιά και βλέννα δερμάτων, ελαστικότητα και χρωματισμός του δέρματος/κοιλιακή πλευρά, υφή σάρκας, κερατοειδής χιτώνας ματιών και κόρης, στοματική μυρωδιά, εσωτερικό κόκαλο: σύνδεση κόκαλο/κεφάλι). Η εκτίμηση κάθε οργανοληπτικής ιδιότητας αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μια περιγραφική ηδονική κλίμακα από 5 έως 1 (5 που είναι το υψηλότερο ποιοτικό αποτέλεσμα και 1 το χαμηλότερο). Το 3 λήφθηκε ως μέσο αποτέλεσμα για την ελάχιστη αποδοχή. Από αυτή την άποψη, το αποτέλεσμα 1 αποδόθηκε σε ένα συνολικά χαλασμένο δείγμα και το αποτέλεσμα 2 θεωρήθηκε ως αποτέλεσμα για απόρριψη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Οργανοληπτικές αλλαγές και εμπορικός χρόνος ζωής των κεφαλόποδων

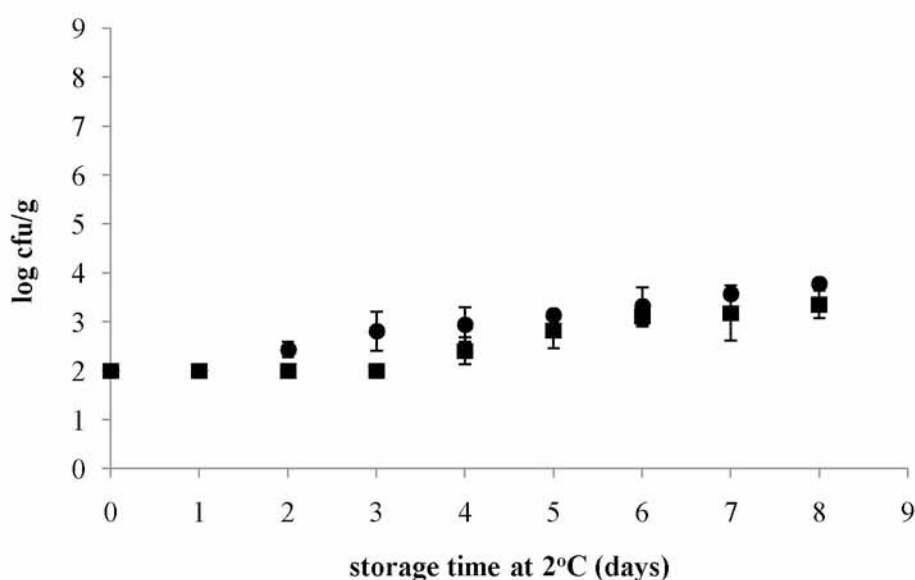
Ο εμπορικός χρόνος ζωής των νωπών θράψαλων κατά τη συντήρηση τους στους 2οC που προσδιορίστηκε από οργανοληπτικές αποτιμήσεις ήταν 4 μέρες. Αρχικά, η φρεσκάδα της σάρκας των θράψαλων ήταν εξαιρετική. Η οσμή περιγράφηκε ως θαλασσινή, το δέρμα ήταν λαμπερό και η βλέννα χαρακτηρίστηκε ως διαυγής, υγρή και φωτεινή. Η οσμή του στόματος ήταν επίσης θαλασσινή και φρέσκια. Η σύσταση της σάρκας ήταν σταθερή, ο κερατοειδής χιτώνας των ματιών ήταν άθικτος, υγρός και λαμπερός. Και το εσωτερικό κόκκαλο ήταν άριστα συνδεδεμένο με το ανώτερο σημείο της περιοχής της κεφαλής. Η φρεσκάδα των χαρακτηριστικών των θράψαλων είχε μειωθεί ουσιαστικά μετά από 4 μέρες. Στο σημείο του χρόνου απόρριψης (όπου το σκορ ήταν ανάμεσα στο 2 και 3) υπήρχε μία ελαφρά αύξηση της οσμής. Η εμφάνιση του δέρματος ήταν θολή ενώ το κεντρικό μέρος του μανδύα έγινε καφέ και το εσωτερικό κόκκαλο έχανε τη σύνδεση με το ανώτερο σημείο της περιοχής της κεφαλής.



Διάγραμμα 3.1.: Οργανοληπτικές μεταβολές στη γενική εμφάνιση των θράψαλων κατά τη διάρκεια της συντήρησης (2°C). Κάθε σημείο είναι ο μέσος 5 τιμών και οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

3.2. Μικροβιολογική ανάλυση

Αρχικά την πρώτη μέρα (day 0), το APC των κατεψυγμένων θράψαλων ήταν 2logcfu/g. Στα θράψαλα οι πληθυσμοί των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, *Pseudomonasspp.* και οξυγαλακτικά βακτήρια που ανιχνεύθηκαν ήταν, (2 και 2.95logcfu/g), αντίστοιχα. Στο σημείο απόρριψης, το APC έφθασε στα επίπεδα των 2.95logcfu/g. Οι πληθυσμοί των *Pseudomonasspp.* και οξυγαλακτικών βακτηρίων έφθασε στα επίπεδα των 2.41 και 2.95 logcfu/g αντίστοιχα (day 4). Οι υπόλοιποι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.



Διάγραμμα 3.2.: Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε σάρκα θράψαλων, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 2°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2X2=4) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών και οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. *Pseudomonas* spp (●), οξυγαλακτικά βακτήρια(■).

3.3. Χημική Ανάλυση

3.3.1. Προσδιορισμός pH

Το αρχικό pH για του θράψαλου ήταν 6.31. Έπειτα το pH της σάρκας του θράψαλου είχε ελάχιστα αυξηθεί μετά την 4η μέρα, (day 4->pH = 6.44) φθάνοντας την τιμή του 6.57.

Πίνακας 3.3.1.

Μέτρηση των τιμών του pH. \pm τυπικής απόκλισης της σάρκας του θράψαλου. Με έντονα μαύρα γράμματα παρατίθεται η τιμή του pH στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Μέρες	pH
0	6.31 \pm 0.09
1	6.39 \pm 0.16
2	6.42 \pm 0.07
3	6.45 \pm 0.05
4	6.44\pm0.07
5	6.47 \pm 0.07
6	6.56 \pm 0.06
7	6.56 \pm 0.04
8	6.57 \pm 0.05

3.3.2. Προσδιορισμός του αζώτου τριμεθυλαμίνης TMA-N

TMA-N: Στην αρχή η TMA-N ήταν στην τιμή του 14.71 mg N/100g για το θράψαλο ($p > 0.05$). Για τις 2 πρώτες μέρες υπήρξε διαφορά, ενώ μετά την 4η μέρα συντήρησης η τιμή της TMA-N αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0.05$), φθάνοντας το 28.05mg N/100g (day4).

Πίνακας 3.3.2

TMA-N: Μεταβολές στο TMA-N (μ.ο. ± τυπ.αποκλ., mgKg⁻¹ σάρκας θράψαλου, (n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης θράψαλου υπό συνθήκες αέρα στους 2 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Μέρες	TMA-N
0	14.71±1.04
2	17.60±2.03
3	19.17±0.56
4	28.05±1.73
5	34.26±1.28
7	45.58±1.25
8	55.68±2.08

3.3.3. Προσδιορισμός του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)

TVB-N: Η αρχική συγκέντρωση του TVB-N ήταν 13,21mg /100g (p>0.05). Οι πρώτες μέρες συντήρησης, η τιμή του TVB-N δεν διέφεραν και πολύ (p>0.05). Έπειτα από 4 μέρες συντήρησης η τιμή του TVB-N ξαφνικά αυξήθηκαν (p>0.05) (Fig. 4). Στο τέλος του πειράματος η τιμή του TVB-N έφθασε στο 24.30 mg N/100g (day 8).

Πίνακας 3.3.3.

TVB-N: Μεταβολές στο TVB-N (μ.ο. \pm τυπ.αποκλ., mgKg^{-1} σάρκας θράψαλου, ($n=2 \times 2=4$) κατά τη διάρκεια της συντήρησης θράψαλου υπό συνθήκες αέρα στους 2 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Μέρες	TVB-N
0	13.21 \pm 0.94
2	16.11 \pm 1.49
3	17.97 \pm 1.35
4	18.84\pm1.63
5	19.45 \pm 1.75
7	22.10 \pm 1.91
8	24.30 \pm 2.11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έγινε προσδιορισμός των οργανοληπτικών, μικροβιολογικών και χημικών μεταβολών με σκοπό την εκτίμηση της ποιότητας και του εμπορικού χρόνου ζωής των θράψαλων αποθηκευμένων στους 2°C. Όσο αναφορά τους μικροοργανισμούς, η ανάπτυξη των οποίων οδηγεί στην αλλοίωση των θραψάλων, στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι οι επικρατέστεροι είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. και τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ειδικότερα, οι κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί των προαναφερθέντων ιχθύων ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp., με δεύτερα επικρατέστερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), με πληθυσμούς, την ημέρα απόρριψης των καβουριών (ημέρα 4), $2 \log_{10} \text{cfu/g}$ και $2.95 \log_{10} \text{cfu/g}$ αντίστοιχα, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης (ημέρα 8), τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν πιο λίγα σε πληθυσμό από αυτά των *Pseudomonas* spp με τις τιμές να κυμαίνονται σε 3.79 και $3.36 \log_{10} \text{cfu/g}$ αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Boziaris et al. (2011), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp είναι ο επικρατέστερος αλλοιογόνος μικροοργανισμός και στις καραβίδες Νορβηγίας υπό συνθήκες ψύξης (0°C), με τιμή της τάξης των $5 \times 10^3 \text{cfu g}^{-1}$, ενώ ακολουθούν τα υδροθειούχα (H_2S). Περαιτέρω, η μικροβιακή αλλοίωση στα ψάρια από εύκρατα νερά της Βόρειας Θάλασσας, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες, προκαλείται από τα *S. putrefaciens* και τα *Pseudomonas* sp. (Gram et al., 1996). Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp έχει αναφερθεί ότι είναι ο κύριος μικροοργανισμός αλλοίωσης των ψαριών που αλιεύονται στα ελληνικά εύκρατα νερά (Koutsoumanis & Νυχάς 1999, Koutsoumanis & Νυχάς 2000, Koutsoumanis et al 2000. Παπαδόπουλος et al. 2003, Parlapani et al. 2013, 2014, 2015a, b). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με την εν λόγω εργασία. Οι παραπάνω ερευνητές αναφέρουν ότι τα υδροθειούχα και οξυγαλακτικά βακτήρια και τα *Enterobacteriaceae* είναι συνήθως οι δεύτεροι και τρίτοι, πιο σημαντικοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με την παρούσα εργασία. Εν αντιθέσει με τους Boziaris et al. (2008), όπου παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια που παράγουν H_2S και τα *Enterobacteriaceae* δεν διέφεραν σε όλη τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης. Το αρχικό pH για του θράψαλου ήταν 6.31. Έπειτα το pH της σάρκας του θράψαλου είχε ελάχιστα αυξηθεί μετά την 4η μέρα, (day 4 \rightarrow pH = 6.44) φθάνοντας την τιμή του 6.57.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το θράψαλο χαρακτηρίστηκε οργανοληπτικά μη αποδεκτό (4^η ημέρα) όταν α) τα *Pseudomonas* spp. και τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν τους δύο σημαντικότερους σε πληθυσμό αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, χωρίς να ξεπεράσουν το επίπεδο των 4-5logcfu/g, β) το pH έφτασε στην τιμή 6,57 και γ) οι συγκεντρώσεις του TVB-N και TMA-N έφτασαν στα επίπεδα των 24,30 και 55,68mg N Kg⁻¹ αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

- Anders R.J., Cervený J.G., Milkowski A.L. (1989) Method for delaying *Clostridium botulinum* growth in fish and poultry. United States Patent: 4,888,191. Appl. No. 287252 (19881220). Oscar Mayer Foods Corporation, Madison, WI, USA.
- Arkhipkin A., 1992. Reproductive system structure, development and function in cephalopods with a new general scale for maturity stages. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 12: 63-74
- Balguerías E., Quintero M. E. & C. L. Hernández-González, 2000. The origin of the Saharan Bank cephalopod fishery. *ICES J. Mar. Sci.*, 57: 15-23.
- Beddington J. R., Rosenberg A. A., Crombie J. A. & G. P. Kirkwood, 1990. Stock assessment and the provision of management advice for the short fin squid fishery in Falkland Islands waters. *Fisheries Research*, 8:351-365.
- Boskou G., Debevere J. (2000) Shelf life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmosphere. *Food Additives and Contaminants*, 17: 17–25.
- Boyle P.R., 1990. Cephalopod biology in the fisheries context, *Fisheries Research*, 8:303- 321.
- Boyle P.R. & S.v. Boletzky, 1996. Cephalopod populations: definition and dynamics, 282 *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*, 351: 985- 1002.
- Bozariis, I. S. and Parlapani, F. F. 2014. Microbiological examination of seafood. In: *Seafood Processing. Technology, Quality & Safety*. Edited by Bozariis I. S. IFST Advances in Food Science Series Wiley-Blackwell. 387-418

- Brillet A., Pilet M. F., Prevost H., Bouttefroy A., Leroi F. (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1029-1037.
- Buchanan R.L., Bagi L.K. (1997) Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Food Protection*, 60: 254– 261.
- Caddy J. F., 1991. Daily rings on squid statoliths: an opportunity to test standard population models? In *Squid age determination using statoliths* P. Jereb, S. Ragonese & S. von Boletzky (eds.), *Proceedings of the International Workshop held in the Istituto di Tecnologia della Pesca e del Pescato (ITTP-CNR), Mazara del Vallo, Italy, 9-14 October 1989*. N. T. P. –I.T.P.P. Special Publications, no 1, pp. 53-66.
- Chouliara I., Savvaidis I.N., Panagiotakis N., M.G. Kontominas (2004) Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 21: 351–359.
- Clarke M. R., 1966. A review of the systematics and ecology of oceanic squids. *Adv. Mar. Biol.*, 4: 91-300.
- Dalgaard, P., Jørgensen L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 105-115.
- Davies A.R. (1997) Modified-atmosphere packaging of fish and fish products. In: Hall, G.M. (ed.) *Fish processing technology*. 2nd edition, Blackie Academic & Professional, London, pp 200-223.

• Ehrhardt N. M., Jacquemin P. S., Garcia F. B., Gonzalez G. D., Lopez J. M. B., Ortiz J. C. & A. N. Solis, 1983. On the fishery and biology of *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. In *Advances in assessment of world cephalopod resources* (ed. J.F. Caddy), FAO Fisheries Technical Paper 231: 306-339. Rome: FAO.

• Farber J.M. (1991) Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology-a review. *Journal of Food Protection*, 54: 58-70.

• Fields W. G., 1965. The structure, development, food relations, reproduction, and life history of the squid *Loligo opalescens* Berry. California Department of Fish and Game, *Fish Bulletin*, 131: 1-108.

• Gennari, M., and F. Dragotto (1992) A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *J. Appl. Bacteriol.* 72:281–288.

• Ghalfi H., Allaoui A., Destain J., Benerroum N., Thonart P. (2006) Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *Journal of Food Protection*, 69: 1066-1071.

• Gimenez B., Dalgaard P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 96-109.

• Gram L., Ravn L., Rasch M., Bartholin Bruhn J., Christensen A.B., Givskov M. (2002) Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 79– 97.

• Hixon R. F., 1983. *Loligo opalescens*. In *Cephalopod life cycles*, vol. I (ed. P. R. Boyle), pp. 95-114. London: Academic Press.

- Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180: 4765-4774.
- Huisin'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, Rome, 195.
- Jorgensen LV, Huss HH. (1998) Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 42:127-31.
- Lee J.-E., Hong Y.-S., Lee C.-H. (2009) Characterization of Fermentative Behaviors of Lactic Acid Bacteria in Grape Wines through ¹H NMR- and GC-Based Metabolic Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4810–4817.
- Lipinski M.R., Butterworth D.S., Augustyn C. J., Brodziak J.K.T., Christy G., Des Clers S., Jackson G.D., O'Dor R.K., Pauly D., Purchase L.V., Roberts M.J., Roel B. A., Sakurai Y. & W.H.H. Sauer, 1998. Cephalopod fisheries: a future global upsite to past overexploitation of living marine resources? Results of an international workshop, 31 August-2 September 1997, Cape town, South Africa. In *Cephalopod Biodiversity , Ecology and Evolution*. Payne A.I.L., Lipinski M.R., Clarke M.R. & M.A.C. Roeleveld (Eds). *S.Afr. J.mar. Sci.* 20: 463-469.
- Maca J. V., Miller R. K., Acuff G. R. (1997) Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged ground beef patties treated with salts of organic acids. *Journal of Food Science*, 62: 591–596.
- Mangold K., 1987. Reproduction. In *Cephalopod life cycles*, P. R. Boyle (ed.), vol. II, pp. 157-200. London: Academic Press.

- Mol S., Erkan N., Ücok D., Tosun S. Y. (2007) Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Foods*, 18: 120–128.
- Nilsson L., Gram L., Huss H.H. (1999) Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection*, 62: 336-342.\
- Nilsson L., Ng Y.Y., Christiansen J.N., Jorgensen B.L., Grotnum D., Gram L. (2004) The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 133-143.
- Parlapani F.F., Malouchos A., Haroutounian S.A. & I.S. Bozaris (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.
- Pauly D., 1979. Theory and management of tropical multispecies stocks: a review with emphasis on the Southeast Asian demersal fisheries, ICLARM Stud. Rev. 1.
- Piatkowski U., Pierce G.J. & M. Morais da Cunha, 2001. Impact of cephalopods in the food chain and their interaction with the environment and fisheries: an overview, *Fisheries Research*, 52: 5-10.
- Qvist S., Sehested K., Zeuthen P. (1994) Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 283–293
- Rocha F., Guerra A. & A.F. Gonzalez, 2001. A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biol. Rev.*, 76: 291-304.

- Rodriguez O., Barros-Velazquez J., Ojea A., Pineiro C., Aubourg S.P. (2003) Evaluation of Sensory and Microbiological Changes and Identification of Proteolytic Bacteria during the Iced Storage of Farmed Turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science* 68 (5), 2764-2771.
- Rodhouse P.G. & Ch. M. Nigmatulin, 1996. Role as consumers. *Phil. Trans. R. Soc.* 295 Lond. B,351: 1003-1022.
- Sallam K. I. (2007) Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon *Food Control*, 18: 566–575.
- SallamKh. I., Samejima K. (2004) Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/LWT-Food Science and Technology*, 37: 865–871.
- Scherer R., Augusti P. R., Bochi V. C., Steffens C., Martins Fries L. L., Daniel A. P., Kubota E. H., Neto J. R., Emanuelli T. (2006) Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodonidella*) slaughtered by different methods. *Food Chemistry*, 99: 136–142.
- Skandamis P. N., Nychas G.-J. E. (2002) Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 35– 45.
- Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas G.- J. E. (2002) Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 65-72.
- Tsigarida E. Skandamis P., Nychas G.-J.E. (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and

modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5oC. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 901-909.

- Vold L., Holck A. Wasteson Y., Nissen H. (2000) High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 219-225.

- Ward D.M., Weller R., Bateson M. M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature (London)*, 345: 63–65.

- Zhuang R.-Y., Huang Y.-W., Beuchat L.R. (1996) Quality changes during refrigerated storage of packaged shrimp and catfish fillets treated with sodium acetate, sodium lactate or propyl gallate. *Journal of Food Science*, 61: 241–244, 261.

Ηλεκτρονική

- [http1://www.kallimanis.gr/products/consumer-products/natural-fish and-seafood-gr/squid/squid-rings.aspx](http://www.kallimanis.gr/products/consumer-products/natural-fish-and-seafood-gr/squid/squid-rings.aspx)