Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

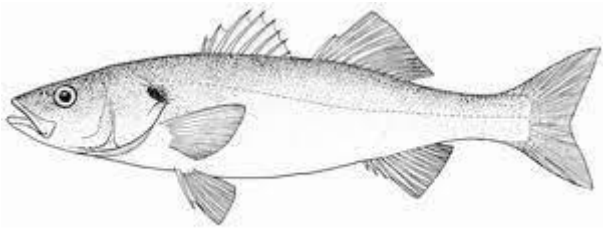
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη και εφαρμογή ήπιων μεθόδων εξυγίανσης και επεξεργασίας με Υπερυψηλή Πίεση για τη βελτίωση της διατηρησιμότητας φρέσκων ιχθυηρών



Ελένη Καρδαμύλα

Επιβλέπων καθηγητής: Πέτρος Ταούκης

ΑΘΗΝΑ, 2021

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Πέτρου Ταούκη.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον καθηγητή μου, κ. Πέτρο Ταούκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, όσο και για την υποστήριξη και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις διδάκτορες Αθηνά Ντζιμάνη και Μαρία Τσεβδού για την καθοδήγηση, την υποστήριξη, τις συμβουλές αλλά και για την υπομονή και τον χρόνο που μου αφιέρωσαν, τόσο στο σχεδιασμό, όσο και στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, για την άριστη συνεργασία και το φιλικό κλίμα κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και στήριξη που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η έρευνα, η ανάπτυξη και η εφαρμογή νέων μεθόδων επεξεργασίας των ιχθυηρών με σκοπό την επιβράδυνση της αλλοίωσης τους, τη βελτίωση της ποιότητάς τους και την αύξηση της διατηρησιμότητάς τους, αποτελεί βασικό στόχο για την επιστημονική κοινότητα και τη βιομηχανία τροφίμων. Τα φρέσκα ιχθυηρά είναι τρόφιμα εξαιρετικά ευαλλοίωτα, με την ποιότητά τους να υποβαθμίζεται με γρήγορους ρυθμούς εξαιτίας της ανάπτυξης μικροοργανισμών. Προκειμένου να αυξηθεί ο χρόνος διατήρησής τους, είναι απαραίτητη η επαρκής απενεργοποίηση και ο έλεγχος ανάπτυξης των περιεχόμενων αλλοιογόνων μικροοργανισμών με όσο το δυνατόν λιγότερη επίδραση στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου.

Τα τελευταία χρόνια, οι καταναλωτικές συνήθειες στρέφονται προς τα νωπά τρόφιμα και σε έτοιμα προς κατανάλωση ιχθυηρά. Επομένως, προκύπτει η απαίτηση της αύξησης του χρόνου ζωής του προϊόντος και διατήρησης όσο το δυνατόν περισσότερο των ποιοτικών χαρακτηριστικών τους. Ένα τέτοιο τρόφιμο το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο και μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι τα νωπά φιλέτα λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Πρόκειται για προϊόν με σημαντικό εμπορικό ρόλο στην ευρωπαϊκή και ελληνική αγορά.

Μια καινοτόμα μη θερμική διεργασία επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί η Υπερυψηλή Πίεση. Η εφαρμογή της πίεσης (200-600MPa) στα τρόφιμα προκαλεί μερική ή ολική μικροβιακή απενεργοποίηση που εξαρτάται από τον συνδυασμό πίεσης-χρόνου και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του πληθυσμού των μικροοργανισμών μετά την επεξεργασία, οδηγώντας σε αύξηση της διατηρησιμότητάς τους. Επιπλέον, οι ήπιες μέθοδοι επεξεργασίας των τροφίμων όπως είναι η εξυγίανση με νερό και με διαλύματα οξέων, μελετώνται τα τελευταία χρόνια για τον ίδιο σκοπό. Ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων μπορεί να παρατείνει ακόμη περισσότερο το χρόνο ζωής τους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της μεθόδου της εξυγίανσης με νερό και με υδατικά διαλύματα οξέων, της μεθόδου της Υπερυψηλής Πίεσης, καθώς και του συνδυασμού τους σε νωπά φιλέτα λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) συντηρημένα στους 0°C στην αύξηση του χρόνου ζωής τους.

Έγινε εμβάπτιση ενός μέρους από το σύνολο των δειγμάτων σε νερό και σε διαλύματα κιτρικού και γαλακτικού οξέος συγκεντρώσεων 200, 800, 1200, 1500, 1800 και 7500ppm για 10 λεπτά στους 25°C. Τα υπόλοιπα δείγματα υποβλήθηκαν συσκευασμένα σε επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση 300MPa (5 λεπτά-25°C). Επίσης μελετήθηκε συνδυαστική επεξεργασία των φιλέτων λαβρακιού, δηλαδή εξυγίανση με διάλυμα κιτρικού οξέος 200 και 7500ppm και γαλακτικού οξέος 7500ppm προ της επεξεργασίας με Υπερυψηλή Πίεση στις παραπάνω συνθήκες. Μετρήθηκαν ο ρυθμός ανάπτυξης της Ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (Total Viable Count), των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.), του *Brochothrix thermosphacta,* των ζυμών/μυκήτων, των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.) και των βακτηρίων που παράγουν H_2S (π.χ. *Shewanella putrefaciens*). Οι καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών εκφράσθηκαν μαθηματικά με το μοντέλο *Baranyi* για κάθε συνθήκη. Η διατηρησιμότητα στους 0°C μπορεί να υπολογιστεί με βάση τον μέγιστο πληθυσμό που αντιστοιχεί στο αποδεκτό όριο του κύριου παράγοντα αλλοίωσης. Τέλος, μελετήθηκε η μεταβολή της τιμής του pH, του χρώματος, της υφής και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (TBARS).

Ο κυριότερος παράγοντας αλλοίωσης υπήρξε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (TVC). Το αρχικό υψηλό μικροβιακό φορτίο των φιλέτων λαβρακιού καθώς και οι αυξημένοι ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης καθόρισαν το χρόνο ζωής των δειγμάτων με αποδεκτό όριο αλλοίωσής την τιμή 7 log(CFU)/g. Τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε Υπερυψηλή Πίεση είχαν μειωμένο αρχικό μικροβιακό φορτίο και μειωμένους ρυθμούς μικροβιακής ανάπτυξης συγκριτικά με τα ανεπεξέργαστα δείγματα, με αποτέλεσμα την αύξηση της διατηρησιμότητάς τους. Η μέθοδος της εξυγίανσης ήταν αποτελεσματική στην υψηλότερη συγκέντρωση οξέων 7500ppm. Οι χρόνοι ζωής των φιλέτων λαβρακιού που υπολογίσθηκαν για τη θερμοκρασία των 0°C, ήταν 6-8 ημέρες τα ανεπεξέργαστα δείγματα, 7 ημέρες για την εξυγίανση με χρήση νερού, 8, 7, 7, 6, 6 και 11 ημέρες για τα δείγματα που εξυγιάνθηκαν με υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος 200, 800, 1200, 1500, 1800 και 7500ppm αντίστοιχα, 9, 7, 6 και 10 ημέρες για τα δείγματα που εξυγιάνθηκαν σε υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος 200, 800, 1500 και 7500ppm αντίστοιχα, 17 και 22 ημέρες για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση (300MPa για 5

λεπτά), 22 μέρες για τη συνδυαστική εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης (300 MPa για 5 λεπτά) και εξυγίανσης με υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος 200ppm, καθώς και 18 μέρες τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με συνδυαστική εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης (300MPa για 5 λεπτά) και εξυγίανσης με υδατικό διάλυμα κιτρικού και γαλακτικού οξέος 7500ppm αντίστοιχα.

Αναφορικά με τη μεταβολή της τιμής του pH, δεν παρουσιάσθηκε διαφοροποίηση συγκρίνοντας τις συνθήκες επεξεργασίας. Παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές του δείκτη Ε του χρώματος στα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση, καθώς και αυξημένη σκληρότητα. Δεν παρατηρήθηκε σαφής τάση για τη μεταβολή τους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης. Όσον αφορά στην οξείδωση των λιπαρών (TBARS), δεν μπόρεσε να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα συναρτήσει των συνθηκών επεξεργασίας και αποθήκευσης.

Επομένως, για ένα ευαλλοίωτο τρόφιμο όπως είναι τα φιλέτα λαβρακιού, η μέθοδος της εξυγίανσης με διαλύματα κιτρικού και γαλακτικού οξέος 7500ppm, έδωσε σημαντικά αποτελέσματα επέκτασης της διάρκειας ζωής. Η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης θα μπορούσε να θεωρηθεί κατάλληλη μέθοδος για το σκοπό αυτό, πετυχαίνοντας μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Με το συνδυασμό των δυο μεθόδων παρατηρήθηκε οριακή αύξηση του χρόνου ζωής γεγονός που δεν επιβεβαιώνει ξεκάθαρη συνεργιστική δράση. Οι διεργασίες αυτές στις κατάλληλες συνθήκες μπορούν να εφαρμοστούν για παραγωγή ιχθυηρών υψηλότερης ποιότητας επεκτείνοντας το χρόνο διατήρησής τους.

Study and application of High-Pressure Processing and other mild treatments for the improvement of quality and extension of shelf life of sea bass fillets

Within the food industry, a basic aim for researchers is the development of new fish processing methods in order to slow degradation, improve quality, and extend the shelf life of the product. Fish is a perishable food, due to the microbial growth, that results in quality degradation in a very short time. In order to extend the shelf life, it is necessary to decrease or deactivate the spoilage microorganisms with less effect on quality characteristics.

Consumers' tendencies over the last few years, have turned to fresh and ready-to-cook or ready-to-eat products, leading to a demand for the extension of their shelf lives while maintaining the quality characteristics. One of these products is fresh sea bass, which are widely consumed. It is one of the most cultured species in Greece, which plays the most important role in the European and Greek market.

One of the most innovative non-thermal methods is the High-Pressure Process. Through the High-Pressure Process, increased amounts of pressure (200-600 MPa) applied to food products. Depending the combination of pressure-time, microorganisms' growth rates are decreased leading to shelf life evaluation. Another popular method in recent years is the use of water and organic acids for food processing. The combination of these two methods may extend the shelf life of sea bass fillets even more.

The aim of this diploma thesis is to study the effect of High-Pressure Processing, treatment with water and organic acids and also their combination, on sea bass fillets stored at 0°C, in order to evaluate the shelf life of the product. Sea bass samples were treated by dipping them for 10 minutes in water and aqueous solutions 200, 800, 1200, 1500, 1800 and 7500ppm of citric and lactic acid at 25°C. Another sample set of sea bass fillets was processed with High-Pressure Processing 300MPa (5 minutes-25°C), having been previously prepared with vacuum packing individually. The combination of these methods was studied, immersion in 200 and 7500ppm citric acid

and 7500ppm lactic acid solutions before the High-Pressure Processing in the same conditions. The growth rate of Total Viable Counts, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta,* yeast, *Enterobacteriaceae* spp. and H_2S producing bacteria (e.g. *Shewanella putrefaciens*) was measured. The growth curves were expressed mathematically by the *Baranyi* model for every condition. The shelf life at 0^oC was measured, based on the maximum microbial population which corresponds to the limit of acceptability of the main factor of degradation. Additionally, pH, color, texture and lipid oxidation (TBARS) measurements were carried out during storage of the products.

The main influence of degradation factor was the growth of Total Viable Counts. The high initial microbial load and the high growth rate of microorganisms determined the shelf life of sea bass fillets with the upper limit of acceptability of 7 log(CFU)/g. The best results being exhibited in samples treated with the High-Pressure Processing, with reduced growth rates. The organic treatment was successful only for concentration of 7500ppm. The shelf life was 6-8 days for control samples, 7 days for sample immersed in water, 8, 7, 7, 6, 6 and 11 days for samples treated with 200, 800, 1200, 1500, 1800 and 7500ppm citric acid solutions respectively, 9, 7, 6 and 10 days for samples immersed in 200, 800, 1500 and 7500ppm lactic acid solutions respectively, 17 and 22 days for samples treated only with High-Pressure Processing (300MPa for 5 minutes), 22 days for samples treated with both High-Pressure Processing and immersion in 200ppm citric acid solution and 18 days for samples treated with both High-Pressure Processing and immersion in 7500ppm citric acid and lactic acid solutions respectively.

As for pH value, there was no observed differences comparing the samples. As for color parameter, the value of E was increased for sea bass fillets treated with High-Pressure Processing. The same result was noticed for hardness. There was no clear tendency for their modification during storage. Concerning lipid oxidation (TBARS), there was no conclusive results either during storage time or condition of process.

In conclusion, when considering sea bass fillets which are perishable foods, the immersion technique produced good results for 7500ppm concentration of organic acids. Alternatively, the non-thermal method of High-Pressure Processing is

considered to be highly effective due to decreased initial load and growth rate of microorganisms. When combined, the two different methods do not appear to produce a positive synergistic effect. These techniques, under the correct conditions, can be applied for the production of high quality fish products by extending their shelf lives, creating outcomes for food industry.

Πίνακας περιεχομένων

1 Στοιχεία παραγωγής και κατανάλωσης ιχθυηρών 1

1.1 Γενικά 1

1.2 Ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα 1

1.3 Ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο 2

1.4 Κατανάλωση ιχθυηρών 3

1.5 Σύστημα παραγωγής μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας 4

2 Βιολογικά χαρακτηριστικά, σύσταση και μικροβιακή αλλοίωση ιχθυηρών 7

2.1 Εισαγωγή 7

2.2 Χημική σύσταση και βιολογική αξία ιχθυηρών 7

2.2.1 Γενικά 7

2.2.2 Πρωτεΐνες 7

2.2.3 Άλλες αζωτούχες ενώσεις 9

2.2.4 Υδατάνθρακες 10

2.2.5 Λίπη 10

2.2.6 Ανόργανα συστατικά 11

2.2.7 Βιταμίνες 12

2.3 Λαβράκι *(Dicentrarchus labrax)* 13

2.3.1 Γενικά 13

2.3.2 Διατροφική αξία λαβρακιού 15

2.3.3 Περιβάλλον ανάπτυξης και μέθοδοι καλλιέργειας λαβρακιού 16

2.4 Μεταθανάτιες αλλαγές ιχθυηρών 18

2.5 Αλλοίωση ιχθυηρών 19

2.5.1 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθυηρών 19

2.5.2 Μεταβολή οργανοληπτικών χαρακτηριστικών 23

2.5.3 Μεταβολή φυσικοχημικών χαρακτηριστικών 24

3 Μη θερμικές διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων 27

3.1 Η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης 27

3.1.1 Εισαγωγή 27

3.1.2 Βασικές αρχές λειτουργίας που ακολουθεί η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης 28

3.1.3 Εξοπλισμός της μονάδας της Υπερυψηλής Πίεσης 29

3.1.4 Πλεονεκτήματα επεξεργασίας τροφίμων με Υπερυψηλή Πίεση 32

3.1.5 Επίδραση Υπερυψηλής Πίεσης στα ιχθυηρά 33

3.1.6 Χρήση της μεθόδου της Υπερυψηλής Πίεσης σε φιλέτα λαβρακιού 38

3.2 Χημικές μέθοδοι επεξεργασίας 40

3.2.1 Κιτρικό οξύ 40
3.2.2 Γαλακτικό οξύ 46
3.2.3 Εξυγίανση ιχθυηρών με χρήση οργανικών οξέων 50
4 Πειραματικό Μέρος - Υλικά και Μέθοδοι 52
4.1 Εισαγωγή 52
4.2 Πειραματικός Σχεδιασμός 53
4.3 Πειραματική Διαδικασία 54
4.3.1 Παραλαβή νωπών φιλέτων λαβρακιού 54
4.3.2 Εξυγίανση νωπών φιλέτων λαβρακιού 54
4.3.3 Συσκευασία και αποθήκευση των φιλέτων λαβρακιού 54
4.3.4 Επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση 55
4.4 Αναλυτικές μέθοδοι 57
4.4.1 Μικροβιακή ανάλυση 57
4.4.2 Μέτρηση pH 61
4.4.3 Μέτρηση χρώματος 62
4.4.4 Μέτρηση υφής 62
4.4.5 Προσδιορισμός οξείδωσης των λιπαρών (TBARS) 63
4.5 Επεξεργασία αποτελεσμάτων 64
4.5.1 Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης 64
4.5.2 Υπολογισμός μικροβιακού φορτίου 65
4.5.3 Υπολογιστικά μοντέλα ποιοτικής υποβάθμισης ιχθύων 66
5 Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων 69
5.1 Εισαγωγή 69
5.2 Μελέτη της μικροβιακής αλλοίωσης των δειγμάτων 69
5.2.1 Εισαγωγή 69
5.2.2 Μικροβιακή ανάπτυξη της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας 71
5.2.3 Μικροβιακή ανάπτυξη των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) 73
5.2.4 Μικροβιακή ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* 75
5.2.5 Μικροβιακή ανάπτυξη των ζυμών/μυκήτων 77
5.2.6 Μικροβιακή ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.) 79
5.2.7 Μικροβιακή ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν H_2S 81
5.2.8 Εφαρμογή του μοντέλου Baranyi για τον προσδιορισμό του ρυθμού αλλοίωσης του κάθε μικροοργανισμού 83
5.3 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής (shelf life) 95
5.4 Μέτρηση της μεταβολής της τιμής του pH 97

5.5 Ανάλυση χρώματος 99
5.6 Ανάλυση υφής 100
5.7 Προσδιορισμός οξείδωσης λιπαρών (TBARS) 101
6 Συζήτηση Αποτελεσμάτων, Συμπεράσματα και Προτάσεις 102
7 Βιβλιογραφία 108

1 Στοιχεία παραγωγής και κατανάλωσης ιχθυηρών

1.1 Γενικά

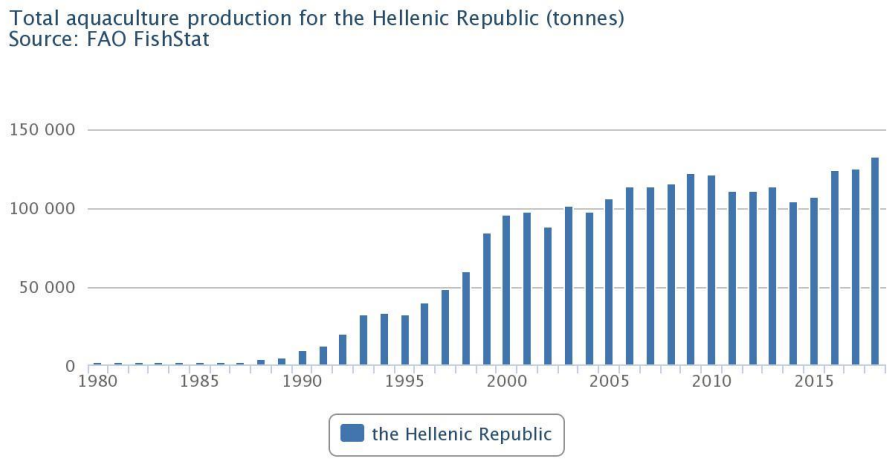
Με τον όρο ιχθυηρά περιγράφεται οποιοσδήποτε ζωντανός υδρόβιος οργανισμός, σπονδυλωτός και ασπόνδυλος. Τα ιχθυηρά και τα προϊόντα αυτών παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή. Μια από τις σημαντικότερες και ταχύτατα εξελισσόμενες βιομηχανίες παραγωγής τροφής παγκοσμίως είναι οι υδατοκαλλιέργειες όπου εκεί εκτρέφονται καθημερινώς και ελέγχονται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους με σκοπό την κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο. Η λειτουργία τους επηρεάζεται άμεσα από το περιβάλλον ανάπτυξης των ιχθυηρών και τις ανάγκες του καταναλωτή.

1.2 Ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα παρουσίασαν αύξηση ανάπτυξης στην δεκαετία του 1980 και πιο συγκεκριμένα το 1990 με εντατική παραγωγή, που οδήγησε σε ύφεση της τιμής, αύξηση των αποθεμάτων, περιπτώσεις κακής χρήσης αντιβιοτικών και πρόκλησης περιβαλλοντικής υποβάθμισης που οδήγησαν σε κακή διαφήμιση.

Η χρήση υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα αυξήθηκε δραματικά και ειδικότερα επικεντρώθηκαν στην αλιεία του λαβρακιού και της τσιπούρας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η συνολική παραγωγή ιχθυηρών που προέρχεται από υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα μέχρι το 2018 με την αύξηση της παραγωγής να είναι εμφανής.

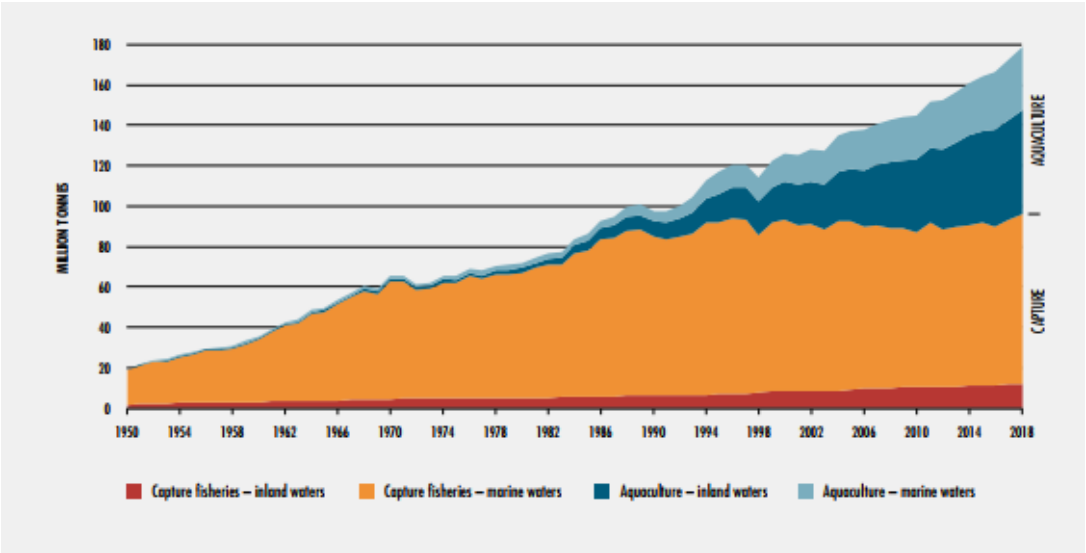
Σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization-FAO) το 2018 καταγράφηκαν στην Ελλάδα παραγωγή περίπου 133.000 τόνων ιχθυηρών. Η υπερπαραγωγή, η έλλειψη ποικιλίας, τα προβλήματα όσον αφορά στην εξαγωγή τους σε άλλες χώρες και ο ισχυρός ανταγωνισμός από την Τουρκία, οδήγησε σε ύφεση της τιμής από το 1990 μέχρι σήμερα (Perdikaris & Paschos, 2010).



Εικόνα 1.1: Συνολική παραγωγή ιχθυηρών από υδατοκαλλιέργειες από το 1980 έως το 2018 σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO, 2020)

1.3 Ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο

Οι υδατοκαλλιέργειες είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος τομέας παραγωγής τροφίμων από στον κόσμο, με αυξημένη συνεισφορά στις παγκόσμιες αγορές τροφίμων και στην οικονομική ανάπτυξη (Gutiérrez et al., 2020). Σύμφωνα με το FAO, παρατηρείται έντονα αυξητική τάση στην παραγωγή των ιχθυηρών και από τους δύο τομείς παραγωγής (από αλίευση και από ιχθυοκαλλιέργεια) και μόνο για το 2018 η παραγωγή έφθασε τους 179 εκατομμύρια τόνους ιχθυηρού, εκ των οποίων τα 82 εκατομμύρια τόνοι προέρχονται από υδατοκαλλιέργειες. Από το σύνολο της παραγωγής τα 156 εκατομμύρια τόνοι χρησιμοποιήθηκαν για ανθρώπινη κατανάλωση που ισοδυναμεί σε 20.5 kg ιχθυηρού ανά άνθρωπο ετησίως ενώ τα υπόλοιπα 22 εκατομμύρια τόνοι χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο για παραγωγή ιχθυελαίου.



Εικόνα 1.2: Εξέλιξη παραγωγής ιχθυηρών είτε από αλιεία, είτε από υδατοκαλλιέργειες σε εγχώρια και θαλάσσια ύδατα σε παγκόσμιο επίπεδο από το 1950-2018 (FAO, 2020)

Σε παγκόσμια κλίμακα, η Κίνα και γενικότερα η Ασία καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην παραγωγή ιχθυηρών με 34% της συνολικής παραγωγής για το 2018. Έπειτα ακολουθεί η Αμερική με 14%, η Ευρώπη με 10%, η Αφρική με 7% και η Αυστραλία με 1%. Η συνολική παραγωγή ιχθυηρών έχει αυξηθεί κατακόρυφα τα τελευταία χρόνια σε όλες τις ηπείρους με εξαίρεση την Ευρώπη που παρόλα αυτά έχει εξισορροπηθεί στο παγκόσμιο επίπεδο λόγω της συνεχόμενα αυξανόμενης τάσης από Ασία και Αφρική (FAO, 2020).

1.4 Κατανάλωση ιχθυηρών

Τα ιχθυηρά και γενικά τα θαλασσινά πάντα θεωρούνταν πολύ σημαντικό κομμάτι στην ανθρώπινη διατροφή και έχουν αναγνωριστεί σαν ένα πολύ υγιεινό και θρεπτικό τρόφιμο (Kaimakoudi et al., 2013). Σύμφωνα με το FAO, η κατανάλωσή τους σε παγκόσμιο επίπεδο έχει αυξηθεί κατά 3.1% κάθε χρόνο από το 1961 μέχρι το 2017, με το ποσοστό αύξησης να είναι μεγαλύτερο από κάθε άλλο ζωικό τρόφιμο και παράγωγό του. Η κατά κεφαλήν κατανάλωση ιχθυηρού από 9.0 κιλά το χρόνο το 1961 αυξήθηκε σε 20.5 κιλά το 2018, που αντιστοιχεί σε ποσοστό αύξησης περίπου 1.5% κάθε χρόνο (FAO, 2020).

Το ιχθυηρό είναι ένα τρόφιμο με υψηλή εμπορική αξία και με περιορισμένο χρόνο ζωής, ο οποίος μπορεί να διευρυνθεί με χρήση κατάλληλων μεθόδων εξυγίανσης ή/και μεθόδων συσκευασίας. Εκτός από το μικρό χρόνο ζωής τους, ένα ακόμη εμπόδιο στην κατανάλωση φρέσκου ιχθυηρού είναι το γεγονός ότι οι υδρόβιοι οργανισμοί είναι πολύ ευαίσθητοι ως προς την αλλοίωσή τους και χρειάζονται ιδιαίτερη μεταχείριση πριν την κατανάλωσή τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ιχθυηρά και τα προϊόντα τους πρέπει να καταψύχονται αμέσως μετά την αλίευσή τους έτσι ώστε να περιοριστεί η μικροβιακή ανάπτυξη και η επιδείνωση της ποιότητάς τους. Γενικά οι διαδικασίες κατά τη αλίευση τους έχουν στόχο να αντιμετωπίσουν τη μικρή διάρκεια ζωής του και να βελτιώσουν την εμπορευματοποίηση (Tsironi et al., 2020).

Η Ελλάδα είναι ο κύριος παραγωγός λαβρακιού και τσιπούρας στην Ευρώπη. Οι Ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες λειτουργούν με βάση την αυξανόμενη ζήτηση στην αγορά, με γρήγορες αλλαγές ανάλογα με τις απαιτήσεις των καταναλωτών (Kaimakoudi et al., 2013).

1.5 Σύστημα παραγωγής μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας

Η αλιεία των ιχθυηρών διεξάγεται είτε σε ανοιχτές θάλασσες, είτε κοντά στις ακτές, είτε σε γλυκά νερά, ανάλογα με το είδος του ιχθυηρού (Belitz et al., 2009).

Το σύστημα παραγωγής ιχθυηρών ή αλλιώς η υδατοκαλλιέργεια βασίζεται στην παραγωγή πληθυσμού ιχθυηρών κατά την οποία ελέγχεται ολόκληρο ή σημαντικό μέρος του κύκλου ζωής των ιχθυηρών. Μια τυπική μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας αποτελείται από το τμήμα γεννητόρων, το τμήμα ζωντανής τροφής και το τμήμα πάχυνσης (Τσιρώνη, 2010).

Το πρώτο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας αφορά στην παραγωγή του γόνου η οποία γίνεται στις μονάδες εκκολαπτηρίων. Στο κάθε εκκολαπτήριο υπάρχουν γεννήτορες, αρσενικοί και θηλυκοί έως 5 ετών, όπου διατηρούνται σε συνθήκες μακροπρόθεσμης εκτροφής (Γκάνιας, 2015). Η ανάπτυξή τους είναι απόλυτα ελεγχόμενη, έτσι ώστε να επιτευχθεί η αναπαραγωγή.

Μετά την γέννηση, οι γόνοι τρέφονται αρχικά με ζωντανή τροφή (φυτοπλαγκτόν). Τα νεαρά ιχθυηρά 45 περίπου ημερών μεταφέρονται σε στρογγυλές ή ορθογώνιες δεξαμενές (10-25m^3), όπου συμβαίνει το πέρασμα από την ζωντανή τροφή στη συνθετική. Έπειτα, ταξινομούνται ανάλογα το μέγεθός τους και τοποθετούνται σε διαφορετικές δεξαμενές μέχρι να φθάσουν στο κατάλληλο εμπορεύσιμο μέγεθος (στάδιο πάχυνσης). Η συνθετική τους τροφή έχει πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και βιταμίνες.

Πριν από την αλίευσή τους είναι απαραίτητο τα ιχθυηρά να περάσουν μερικές μέρες σε ασιτία ανάλογα τη θερμοκρασία και το ρυθμό σίτισής τους. Αυτό συμβαίνει έτσι ώστε το πεπτικό τους σύστημα να είναι τελείως απαλλαγμένο από υπολείμματα τροφών. Η αλίευσή τους γίνεται με ειδικά διαμορφωμένα κλουβιά ή παγίδες, ανάλογα το σύστημα εκτροφής τους, όπου συντονίζονται σε μια μικρή περιοχή και συλλέγονται με απόχες ή με αντλίες κενού. Έπειτα θανατώνονται ακαριαία και μεταφέρονται στον πάγο. Τέλος οδηγούνται σε συσκευαστήρια για την συντήρησή τους, τυποποίηση και διανομή στους καταναλωτές (Γκάνιας, 2015, Τσιρώνη, 2010).

Υπάρχουν 3 διαφορετικοί τύποι συστημάτων καλλιέργειας ιχθυηρών:

- **Εκτατικά συστήματα:** Σε αυτά τα συστήματα γίνεται αλίευση ιχθυηρών με παγίδες σε παράκτιες λίμνες και λιμνοθάλασσες
- **Ημι-εντατικά συστήματα:** Αυτή η μέθοδος συμπεριλαμβάνει χρήση κομματιών γης διάφορων μεγεθών με σχετικά μικρή ποσότητα νερού σε σχέση με μία φυσική λίμνη. Οι πληθυσμοί αυτών των ιχθυηρών, περιλαμβάνουν περισσότερο από ένα είδος με τον πλήρη έλεγχο του ανθρώπινου παράγοντα
- **Εντατικά συστήματα:** Σε αυτήν την περίπτωση απαιτούνται κατασκευές ξηράς όπως διχτυωτά κλουβιά, όπου το νερό λειτουργεί ως μέσο εκτροφής. Το σύστημα δέχεται το εισαγόμενο νερό, του οποίου προηγουμένως ελέγχεται η ποιότητά του. Αυτό το σύστημα απαιτεί πολύ υψηλές απαιτήσεις σε οξυγόνο, και το νερό μένει μέσα όσο τα βιολογικά χαρακτηριστικά του είναι στα επιτρεπτά επίπεδα (Χρηστάκης, 1997, Γκάνιας, 2015).

Παρακάτω φαίνεται μια μονάδα παραγωγής που αποτελείται από διχτυωτά κλουβιά στην Ελλάδα από τα ιχθυοτροφεία Σελόντα ΑΕΓΕ.

Εικόνα 1.3: Μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελλάδα (ΣΕΛΟΝΤΑ ΑΕΓΕ)

2 Βιολογικά χαρακτηριστικά, σύσταση και μικροβιακή αλλοίωση ιχθυηρών

2.1 Εισαγωγή

Όπως ισχύει για τα περισσότερους ζωικούς οργανισμούς, έτσι τα ιχθυηρά καθώς και τα προϊόντα τους αποτελούνται κατά κύριο λόγο από νερό, πρωτεΐνες, λιπαρά, υδατάνθρακες, ανόργανα άλατα και βιταμίνες. Παρόλα αυτά, η χημική τους σύσταση μεταβάλλεται ανάλογα το είδος του ιχθυηρού, την ηλικία του και από το περιβάλλον στο οποίο έχει αναπτυχθεί.

Τα ιχθυηρά αποτελούν μια ομάδα τροφίμων που αλλοιώνεται αρκετά εύκολα. Έτσι για να υπολογιστεί ο χρόνος ζωής του τροφίμου πρέπει να είναι γνωστές και οι αιτίες των αλλοιώσεων που είναι μικροβιολογικής, φυσικής ή/και χημικής φύσεως (Gram & Huss, 1996).

2.2 Χημική σύσταση και βιολογική αξία ιχθυηρών

2.2.1 Γενικά

Η σάρκα των ιχθυηρών χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Τα περισσότερα ιχθυηρά είναι άπαχα, δηλαδή έχουν μικρή περιεκτικότητα σε λίπος (περιεκτικότητα 0.1-0.4%), ενώ μερικά είναι αρκετά λιπαρά (περιεκτικότητα 16-26%). Επιπλέον, περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα υδατανθράκων (κυρίως γλυκογόνο) σε ποσοστό μόλις 0.3%, ανόργανα άλατα, βιταμίνες, ένζυμα και αρωματικές ενώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ακριβής τιμή του κάθε συστατικού εξαρτάται από το φύλο των ιχθυηρών, την ηλικία τους και το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται (Belitz et al., 2009).

2.2.2 Πρωτεΐνες

Η χημική σύσταση των ιχθυηρών αποτελείται από πρωτεΐνες, οι οποίες κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό του μυϊκού ιστού τους. Είναι μεγάλης βιολογικής αξίας και

περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, για τη σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Το σύνηθες ποσοστό πρωτεΐνης στους μύες των ιχθυηρών κυμαίνεται μεταξύ 18-22%, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις που έχει βρεθεί ποσοστό πρωτεΐνης κάτω από 6% ή πάνω από 25% (Belitz et al., 2009, Haard, 1992). Το πρωτεϊνικό άζωτο κατέχει το 2-3%. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στον μυϊκό ιστό των ιχθυηρών χωρίζονται σε 3 επιμέρους κατηγορίες.

- Οι **σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες** οι οποίες είναι διαλυτές στο νερό και αποτελούνται κυρίως από ένζυμα. Η περιεκτικότητά τους στους μύες είναι 20-30%. Τέτοιες είναι η μυογλοβίνη και η αιμογλοβίνη.
- Οι **συσταλτές πρωτεΐνες** οι οποίες είναι διαλυτές στα άλατα. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την ευπεπτότητα των ιχθυηρών. Τέτοιες είναι η ακτίνη και η μυοσίνη. Βρίσκονται σε ποσοστό 70-80% στο μυϊκό ιστό.
- Οι **πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού** όπου κύριο συστατικό είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη (το κολλαγόνο αποτελεί το 90% και το υπόλοιπο είναι ελαστίνη). Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού είναι μόλις 1.3%. Τα ιχθυηρά περιέχουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες συσταλτών πρωτεϊνών συγκριτικά με τις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού σε σχέση με τα θηλαστικά. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την τρυφερότητα του εδώδιμου μέρους των ιχθυηρών. (Belitz et al.,2009, Haard, 1992; Toppe et al., 2007)

Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται το ποσοστό των επιμέρους πρωτεϊνών στο μυϊκό ιστό κάθε ιχθυηρού.

Πίνακας 2.1: Ποσοστό σε πρωτεΐνες στο μυϊκό ιστό των ιχθυηρών (Haard, 1992)

Είδος	Σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες	Συσταλτές πρωτεΐνες	Πρωτεΐνες συνδετικού ιστού
Ιχθυηρό, γενικά	**10-25%**	**70-90%**	**3-10%**
Μπακαλιάρος	**21%**	**76%**	**3%**
Κυπρίνος	**24%**	**71%**	**5%**
Γλώσσα	**21%**	**76%**	**3%**

2.2.3 Άλλες αζωτούχες ενώσεις

Η περιεκτικότητα σε μη πρωτεϊνικό άζωτο στον μυϊκό ιστό των ιχθυηρών είναι 9-18% της ολικής περιεκτικότητας του αζώτου. Τέτοιες ενώσεις είναι τα ελεύθερα αμινοξέα, τα πεπτίδια, η γουανιδίνη, τα οξείδια της τριμεθυλαμίνης, η ουρία, οι πουρίνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Το περιεχόμενο και το ποσοστό αυτών των ενώσεων εξαρτάται από το περιβάλλον ανάπτυξης του ιχθυηρού, την εποχή αλίευσης και το είδος του.

Το περιεχόμενο των ελεύθερων αμινοξέων στον μυϊκό ιστό των θαλάσσιων οργανισμών είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό των θηλαστικών. Το ποσοστό τους διαφέρει ανάλογα με το είδος του ιχθυηρού, αλλά κυμαίνεται μεταξύ 0.5-2% του συνολικού μυϊκού βάρους. Επιπλέον, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως συστατικά γεύσης. Παράδειγμα τέτοιων ελεύθερων αμινοξέων είναι η ιστιδίνη, η γλυκίνη, η προλίνη, που συναντώνται συχνά στους μυϊκούς ιστούς των ιχθυηρών.

Το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης είναι μία αζωτούχα ένωση η οποία βρίσκεται στον μυϊκό ιστό του ιχθυηρού και συμμετέχει στη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης. Τα ιχθυηρά που ζουν στη θάλασσα έχουν υψηλές ποσότητες (40-120 mg/kg) και εκείνα του γλυκού νερού, πολύ χαμηλότερες (0-5 mg/kg). Η διμεθυλαμίνη, η τριμεθυλαμίνη και η φορμαλδεΰδη είναι προϊόντα διάσπασης του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης, και αυτό συμβαίνει είτε ενζυμικά είτε από βακτήρια, όταν το ιχθυηρό είναι στη μεταθανάτια φάση. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για τη χαρακτηριστική οσμή που προκύπτει από το τρόφιμο καθώς και για την σκληρότητά του κατά την αποθήκευσή του.

Όσον αφορά στην ουρία, η συγκέντρωση της είναι σχετικά υψηλή στον μυϊκό ιστό (1.3-2.1 g/kg) και μετατρέπεται σε αμμωνία κατά την αποσύνθεση του ιχθυηρού. Η περιεκτικότητα των πουρινών είναι περίπου ίδια σε κάθε είδος και λαμβάνει την τιμή περίπου 300 mg/kg ιχθυηρού. Τέλος, οι ενώσεις γουανιδίνης οι οποίες είναι η κρεατίνη ή η αργινίνη κυμαίνονται σε ποσοστό 600-700 mg/kg νωπού μυϊκού ιστού (Belitz et al., 2009, Haard, 1992).

2.2.4 Υδατάνθρακες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι υδατάνθρακες βρίσκονται σε πολύ μικρά ποσοστά στο μυϊκό ιστό των ιχθυηρών σε αντίθεση με τα θηλαστικά (μέχρι 0.3%). Ο κυριότερος υδατάνθρακας είναι το γλυκογόνο, και τα ιχθυηρά που έχουν αναπτυχθεί σε ιχθυοκαλλιέργειες έχουν επαρκή ποσότητα γλυκογόνου στους μύες τους, σε σχέση με τα άλλα που αναπτύσσονται ελεύθερα. Η ποσότητα του γλυκογόνου καθορίζει την ποιότητα του κρέατος του ιχθυηρού. Και σε αυτήν την περίπτωση ισχύει ότι η ποσότητα των υδατανθράκων που περιέχονται στα ιχθυηρά εξαρτάται από το περιβάλλον ανάπτυξης, την ηλικία, το είδος, καθώς και από τη θερμοκρασία του νερού. Η ποσότητα γλυκογόνου είναι πάνω από διπλάσια στα είδη που βρίσκονται σε νερό 2°C σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται σε νερά θερμοκρασίας περιβάλλοντος (Haard, 1992).

2.2.5 Λίπη

Το λίπος των ιχθυηρών αποτελείται από πολλά επιμέρους διαφορετικά λιπίδια και επηρεάζεται από το είδος του, την ηλικία, την εποχή και τον τρόπο ανάπτυξής του. Ως προς την ηλικία, έχει βρεθεί ότι τα ιχθυηρά μεγαλύτερης ηλικίας παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά λίπους σε σχέση με τα νεότερα ηλικιακά ιχθυηρά (Haard, 1992). Τέτοια λιπίδια είναι τα τριγλυκερίδια, οι στερόλες, και τα φωσφολιπίδια (Toppe et al., 2007).

Ανάλογα την περιεκτικότητα σε λίπος στη σάρκα τους ταξινομούνται σε τρείς κατηγορίες: τα άπαχα, τα ημιλιπαρά και τα λιπαρά ιχθυηρά (Belitz et al., 2009). Τα ιχθυηρά που αναπτύσσονται σε ιχθυοκαλλιέργειες έχουν μεγαλύτερο ποσοστό

λιπαρών από αυτά που ζουν ελεύθερα. Τα λιπαρά ιχθυηρά, πέρα από υψηλό ποσοστό λίπους στους μύες έχουν και υψηλό ποσοστό στα κόκκαλα (μέχρι 320 g/kg ιχθυηρού), σε αντίθεση με τους μη-λιπαρούς (21 g/kg ιχθυηρού) (Toppe et al., 2007). Επιπλέον, τα μη λιπαρά ιχθυηρά, έχουν υψηλό ποσοστό φωσφολιπιδίων, καθώς και μεγαλύτερο ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων σε σχέση με τριγλυκερίδια. Όμως, παρόλο που κατέχουν υψηλή ποσότητα λιπαρών, δεν διαθέτουν την κατάλληλη αντιοξειδωτική προστασία. Άρα, αυτό σημαίνει ότι οξειδώνονται και αλλοιώνονται πολύ εύκολα κατά την αποθήκευσή τους (Haard, 1992).

Γενικά, η σωστή διατροφή, απαιτεί πρόσληψη *ω-3* λιπαρών οξέων και σχεδόν όλα τα ιχθυηρά, αποτελούν σημαντική πηγή (Belitz et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό των *ω-3* λιπαρών οξέων είναι μεγαλύτερο στα ιχθυηρά που ζουν ελεύθερα σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται στις υδατοκαλλιέργειες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η υψηλή περιεκτικότητα σε *ω-3* λιπαρά οξέα και σε άλλα ακόρεστα οξέα, καθιστούν τα ιχθυηρά και τα έλαιά τους πολύ εύκολα στην οξείδωση (Kaitaranta, 1992).

Η οξείδωση των λιπιδίων αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες επιδείνωσης της ποιότητας των μυών των ιχθυηρών οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ενώσεων καρβονυλίου χαμηλού μοριακού βάρους. Οι ενώσεις αυτές προκαλούν αλλοίωση στην ποιότητα του ιχθυηρού και επηρεάζουν τη γεύση, την οσμή, το χρώμα και την υφή. Ακόμη και η παραγωγή τοξικών ενώσεων μπορεί να προκύψει από την οξείδωση των λιπαρών (Kaitaranta, 1992; Richards & Hultin, 2002).

2.2.6 Ανόργανα συστατικά

Ο μυϊκός ιστός των ιχθυηρών, αποτελείται από όλα σχεδόν τα ανόργανα στοιχεία τα οποία υπάρχουν στο νερό. Επίσης, τα ιχθυηρά λαμβάνουν σημαντική ποσότητα ανόργανων στοιχείων από την τροφή τους. Τα ανόργανα συστατικά είναι πολύ σημαντικά για την ανάπτυξη των ιχθυηρών, καθώς και πολύ θρεπτικά συστατικά για τη διατροφή. Το σύνολο των ανόργανων συστατικών κυμαίνεται σε ποσοστά 3-7% του συνολικού τους βάρους. Επιπλέον, υπάρχει κι ένα μικρό ποσοστό από βαριά μέταλλα, όπως αρσενικό, κάδμιο και υδράργυρος, τα οποία είναι τοξικά και έχουν

την τάση να αυξάνονται όσο μεγαλώνει το ιχθυηρό. Επίσης η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται και από το νερό που αναπτύσσονται. Επομένως, είναι αναγκαίο στις ιχθυοκαλλιέργειες να γίνεται χρήση ειδικών συστημάτων καθαρισμού (Haard, 1992).

Παρακάτω φαίνεται η μέση περιεκτικότητα σε ανόργανα στοιχεία στους μύες του ιχθυηρού.

Πίνακας 2.2: Περιεκτικότητα σε ανόργανα στοιχεία στο μυϊκό ιστό των ιχθυηρών (Belitz et al., 2009)

Στοιχείο	Περιεκτικότητα (mg/kg)
Ασβέστιο (Ca)	48-420
Μαγνήσιο (Mg)	240-310
Φώσφορος (P)	1.730-2.170
Σίδηρος (Fe)	5-248
Χαλκός (Hg)	0.4-1.7
Ιώδιο (I)	0.1-1.0

2.2.7 Βιταμίνες

Τα ιχθυηρά αποτελούν πλούσια πηγή βιταμινών, οι οποίες είναι λιποδιαλυτές. Τέτοιες είναι η A και η D. Επίσης απαντώνται και άλλα είδη βιταμινών, όπως η E (τοκοφερόλη) και η K. Σε σημαντικές ποσότητες απαντώνται και οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες, η θειαμίνη, η ριβοφλαμίνη και η νιασίνη, ενώ τα άλλα είδη υπάρχουν σε μικροποσότητες ή δεν υπάρχουν στο σώμα τους. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται οι ποσότητες κάθε βιταμίνης που απαντώνται στο βρώσιμο τμήμα των ιχθυηρών (Belitz et al., 2009):

Πίνακας 2.3: Μέση περιεκτικότητα σε βιταμίνες στο βρώσιμο τμήμα των ιχθυηρών (Τσιρώνη,2010)

Βιταμίνες	Μέση περιεκτικότητα (μg/100g)
Βιταμίνη A	25
Βιταμίνη B_1 (θειαμίνη)	50
Βιταμίνη B_2 (ριβοφλαμίνη)	120
Νικοτινικό οξύ	3
Βιταμίνη B_{12}	1
Παντοθενικό οξύ	500
Πυριδοξίνη	500
Βιοτίνη	5
Φολικό οξύ	80
Βιταμίνη C	3000
Βιταμίνη D	15
Βιταμίνη E	12

2.3 Λαβράκι *(Dicentrarchus labrax)*

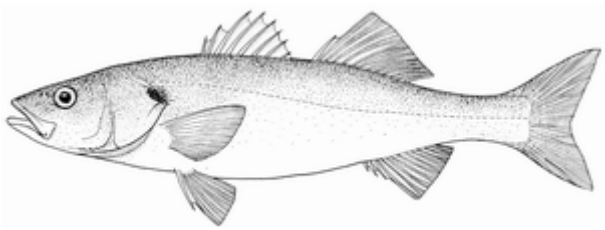
2.3.1 Γενικά

Το λαβράκι *[Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)]* ανήκει στην οικογένεια ιχθυηρών *Moronidae*. Πρόκειται για ένα είδος το οποίο βρίσκεται σε βάθος 10-100m. Οι ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης του είδους αυτού είναι υποτροπικές, με θερμοκρασιακό εύρος 8-24°C. Συνήθως βρίσκεται στον Δυτικό Ατλαντικό ωκεανό, καθώς και στην Μεσόγειο θάλασσα.

Το λαβράκι έχει σώμα επίμηκες που καταλήγει σε ομόκεντρο πτερύγιο. Έχει μήκος 23-46cm, με μέσο βάρος που κυμαίνεται στα 400-600g, ενώ το μέγιστο που έχει καταγραφεί είναι 12kg. Η μέση ηλικία του είναι τα 15 έτη, ενώ η μέγιστη φτάνει μέχρι τα 30 έτη. Το εμπορεύσιμο μέγεθός του στις ιχθυοκαλλιέργειες φτάνει τα 500g το ανώτερο.

Το σχήμα του σώματός του είναι επίμηκες και έχει δύο επίπεδα αγκαθιών. Το κεφάλι φέρει κυκλοειδής σχηματισμούς. Έχει σύνολο 8-10 ραχιαία αγκάθια, 12-13 μαλακές ραχιαίες ακτίνες, και πρωκτικό πτερύγιο με τρία αγκάθια και 11-12 μαλακές ακτίνες. Έχει αργυρόχρωμο-γκρι χρώμα με υποκυανή χροιά στο πίσω μέρος και υποκίτρινο χρώμα στο μέρος της κοιλιάς. Είναι μαλακό, λευκό ιχθυηρό με πολύ έντονη γεύση και πλούσιο σε *ω-3* λιπαρά οξέα. Τα νεαρά ιχθυηρά φέρουν συχνά σκούρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματός τους σε αντίθεση με τα ενήλικα ιχθυηρά που δεν φέρουν καθόλου. (FAO, 2020)

Για το λαβράκι ισχύει ότι όταν είναι ολόκληρο, έχει χρόνο ζωής στην ψύξη (0-1°C) 11-13 μέρες (Mokrani et al., 2018), ενώ όταν είναι φιλέτο 9-10 μέρες (Parlapani et al., 2015; Poli et al., 2001).



Εικόνα 2.1*: Dicentrarchus labrax* (FAO, 2020)

2.3.2 Διατροφική αξία λαβρακιού

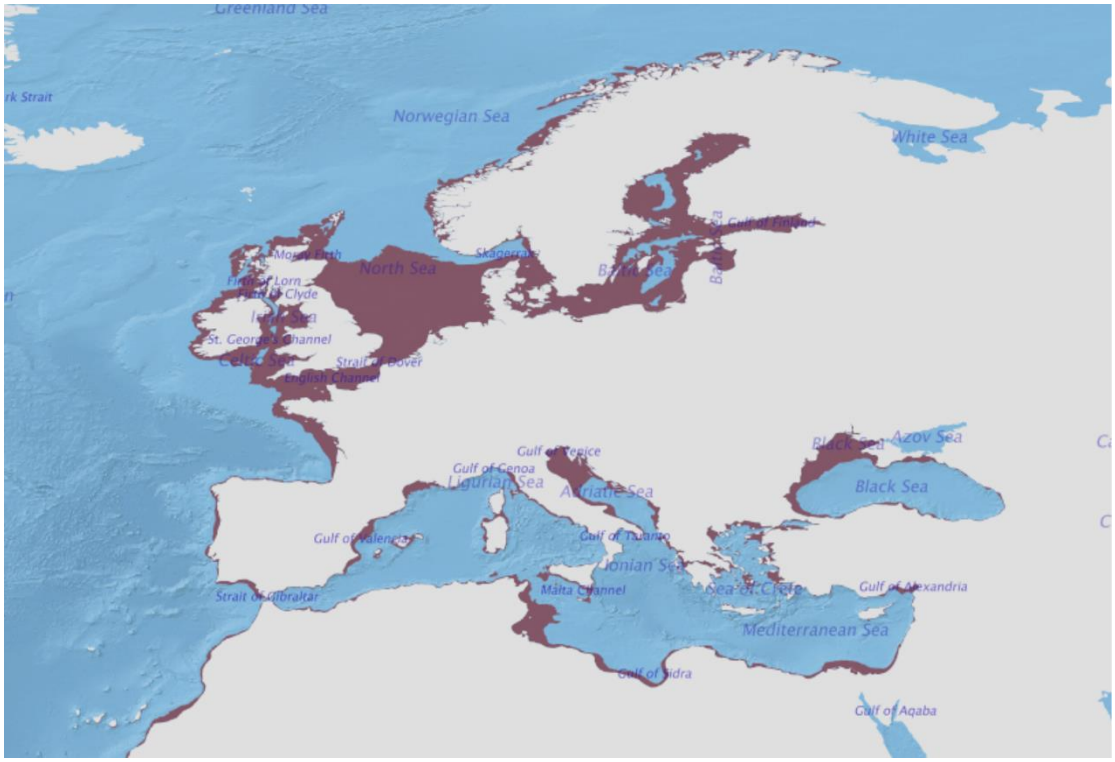
Η διατροφική αξία του λαβρακιού ανά 100gr σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας και Αγροτικής ανάπτυξης των Η.Π.Α. (USDA) φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.4: Διατροφική αξία λαβρακιού ανά 100 g

Διατροφικά στοιχεία λαβρακίου (ανά 100 g)	
Νερό	78,27 g
Ενέργεια	97 kcal/406 kJ
Πρωτεΐνη	18.43 g
Συνολικά λιπαρά	2 g
Υδατάνθρακες	
Ίνες	
Σάκχαρα	
Μεταλλικά Στοιχεία	
Ασβέστιο (Ca)	10 mg
Σίδηρος (Fe)	0.29 mg
Μαγνήσιο (Mg)	41 mg
Φώσφορος (P)	194 mg
Κάλιο (K)	256 mg
Νάτριο (Na)	68 mg
Ψευδάργυρος (Zn)	0.4 mg
Χαλκός (Cu)	0.019 mg
Μαγγάνιο (Mn)	0.015 mg
Σελήνιο (Se)	36.5 μg
Βιταμίνες	
Βιταμίνη C	
Βιταμίνη B1	0.11 mg
Βιταμίνη B2	0.12 mg
Βιταμίνη B3	1.6 mg
Βιταμίνη B5	0.75 mg
Βιταμίνη B6	0.4 mg
Βιταμίνη B9	5 mg
Βιταμίνη B-12	0.3 mg
Βιταμίνη A	46.2 μg
Βιταμίνη E	0.84 mg
Βιταμίνη D	5.6 μg
Βιταμίνη K	0.1 μg
Λιπαρά	
Κορεσμένα λιπαρά	0.511 g
Μονοακόρεστα λιπαρά	0.424 g
Πολυακόρεστα λιπαρά	0.743 g
Χοληστερίνη	41 mg

2.3.3 Περιβάλλον ανάπτυξης και μέθοδοι καλλιέργειας λαβρακιού

Το λαβράκι αναπτύσσεται σε φυσικές ή σε τεχνητές λίμνες, και παλαιότερα, η καλλιέργειά τους είχε συνδεθεί με την παραγωγή αλατιού σε παράκτιους βάλτους. Η συγκομιδή του αλατιού γινόταν κατά την διάρκεια της εξάτμισης του βάλτου στις καλοκαιρινές και φθινοπωρινές περιόδους με το ιχθυηρό να αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης. Μετά το 1960, η Γαλλία και η Ιταλία άρχισαν να ανταγωνίζονται ως προς τις τεχνικές παραγωγής τόνων νεαρών λαβρακιών και έπειτα αυτές οι τεχνικές εφαρμόσθηκαν σε όλες τις Μεσογειακές χώρες για να παρέχουν πολύ μεγάλες ποσότητες του ιχθυηρού. Στην Ευρώπη, το πρώτο θαλάσσιο είδος που αναπτύχθηκε σε υδατοκαλλιέργεια ήταν το *Dicentrarchus labrax* και μέχρι τώρα είναι το πιο σημαντικό εμπορικά ιχθυηρό που αναπτύσσεται σε όλη την Ευρώπη. Η Ελλάδα, η Τουρκία, η Ιταλία, η Ισπανία, η Κροατία και η Αίγυπτος, είναι οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή του παγκοσμίως. Το περιβάλλον ανάπτυξής του είναι σε θερμοκρασίες 5-28°C, άρα επί το πλείστον βρίσκεται σε παράκτια νερά και σε εκβολές. Επίσης, πιο σπάνια βρίσκεται στην επιφάνεια των λιμνών. Παρακάτω αναλύονται τα επιμέρους βήματα παραγωγής του.

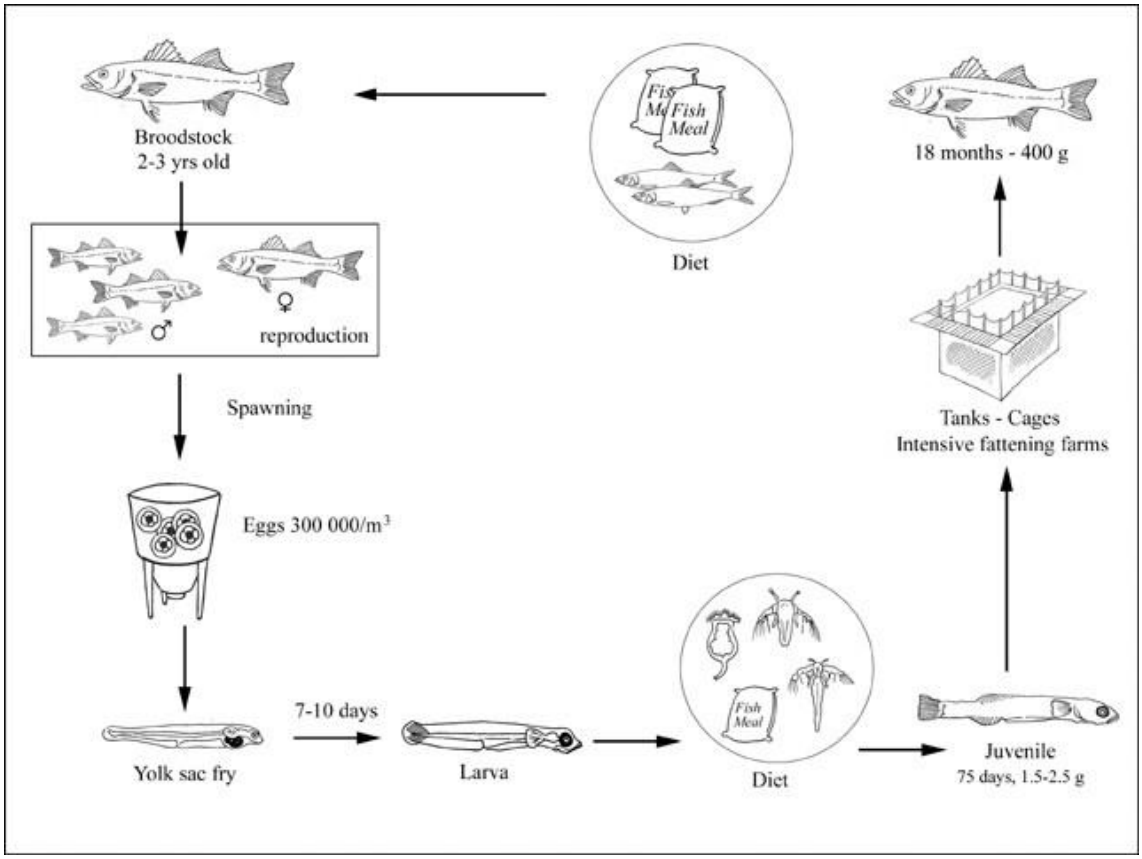


Εικόνα 2.2: Ευρωπαϊκός χάρτης παραγωγής *Dicentrarchus labrax* (FAO, 2020)

Αρχικά για να διασφαλιστεί ότι υπάρχει η απαραίτητη ποσότητα και ποιότητα αυγών του ιχθυηρού, υπάρχουν ειδικά εκκολαπτήρια όπου παραμένουν τα ιχθυηρά για μεγάλο χρονικό διάστημα και εκεί ταΐζονται κατάλληλα. Η βέλτιστη ηλικία για τα θηλυκά είναι τα 5-8 έτη, και για τα αρσενικά τα 2-4 έτη. Στα εκκολαπτήρια, τα ιχθυηρά θα ωριμάσουν, θα πραγματοποιηθεί η ωορρηξία με τη βοήθεια ορμονικής αγωγής, θα γίνει η γονιμοποίηση και τέλος η επώαση των αυγών σε ειδικά συστήματα.

Κατά την παραγωγή, νεαρά ιχθυηρά από τα εκκολαπτήρια μεταφέρονται στις μονάδες ανάπτυξης και τρέφονται κατάλληλα. Η ανάπτυξή τους γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένες δεξαμενές ή κελιά. Οι δεξαμενές προμηθεύονται το θαλασσινό νερό σε συνεχή ροή. Είναι απαραίτητο να ελέγχεται διαρκώς η ποιότητα και η θερμοκρασία του νερού μέσα στη δεξαμενή. Οι μονάδες ανάπτυξης επιταχύνουν την ανάπτυξη των ιχθυηρών γιατί φροντίζονται κατάλληλα, αλλά είναι μια διαδικασία αρκετά δαπανηρή αφού απαιτεί σύστημα ελέγχου ποιότητας του νερού που θα μπει μέσα στη δεξαμενή. Όσον αφορά στα κελιά, φτιάχνονται από ατσάλι και έχουν μέγεθος 4-10 m^2 και φθάνουν 6-8 m βάθος. Κατά την ανάπτυξή τους, τα νεαρά ιχθυηρά φθάνουν τα 400-450g σε 18 μήνες.

Πριν την αλίευσή τους, τα ιχθυηρά θανατώνονται από ασφυξία σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες νερού και συλλέγονται με ειδικές αντλίες κενού. Ο χρόνος μεταξύ της θανάτωσης και της αλίευσης δεν πρέπει να ξεπερνάει τις 2 ώρες. Μετά τη συλλογή τους, τοποθετούνται σε κιβώτια με πάγο για να διατηρηθούν (FAO, 2020). Όλα τα παραπάνω απεικονίζονται σχηματικά παρακάτω.



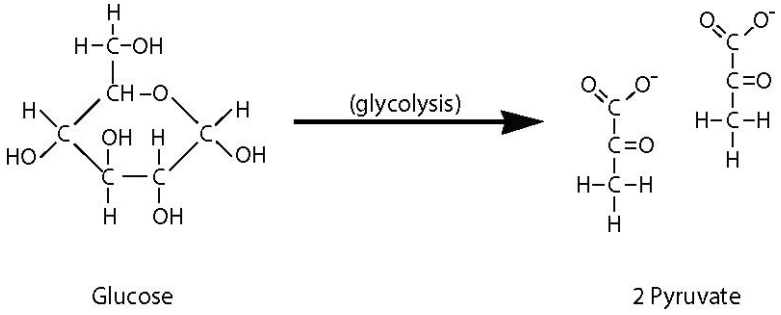
Εικόνα 2.3: Κύκλος παραγωγής *Dicentrarchus labrax* (FAO, 2020)

Στην Ελλάδα, το είδος *Dicentrarchus labrax* καλλιεργείται σε θάλασσες της Κορινθίας, Αργολίδας, Αρκαδίας και Δωδεκανήσων, και θεωρείται το πιο δημοφιλές μεσογειακό ιχθυηρό στη Βόρεια Αμερική και στην Αγγλία.

2.4 Μεταθανάτιες αλλαγές ιχθυηρών

Μετά τον θάνατο του ιχθυηρού, σταματάει η κυκλοφορία του αίματος καθώς και η παροχή οξυγόνου στον μυϊκό ιστό του, δηλαδή ξεκινάει το φαινόμενο της νεκρικής ακαμψίας. Οι φωσφορικές ομάδες που είναι υπεύθυνες για παροχή ενέργειας στα κύτταρα, όπως η φωσφορική κρεατίνη, το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και ADP (παράγεται από το ATP όταν αυτό καταναλώνεται σε μεταβολικές διεργασίες) αρχίζουν να αποικοδομούνται. Η μοναδική πηγή ενέργειας στον μυϊκό ιστό είναι η γλυκόλυση, η οποία παράγει πυροσταφυλικό οξύ και σε συνέχεια γαλακτικό οξύ, και μειώνει την τιμή του pH του ιχθυηρού. Στο συγκεκριμένο τρόφιμο, επειδή έχει μικρή περιεκτικότητα σε γλυκογόνο στους μύες, η πτώση της τιμής του pH (μέχρι 6.2) είναι

αρκετά μικρή. Η ιδανική τιμή του pH του νωπού ιχθυηρού για κατανάλωση είναι 6.0-6.5 και το όριο καταλληλότητας είναι 6.8. Όταν φτάσει στο επίπεδο αλλοίωσης η τιμή του ξεπερνά το 7.0. Η αντίδραση της γλυκόλυσης φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 2.4: Αντίδραση γλυκόλυσης στο μυϊκό ιστό προς παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος

Το φαινόμενο της νεκρικής ακαμψίας, επηρεάζεται από το είδος και τη φυσιολογική κατάσταση του ιχθυηρού και είναι μεγίστης σημασίας για τον ποιοτικό έλεγχό του. Όταν η συγκέντρωση του ATP μειωθεί κατά πολύ, ο μυϊκός ιστός από μαλακός, εύκαμπτος και στεγνός μετατρέπεται σε σκληρός και δύσκαμπτος, χάνεται η ελαστικότητά του και αποβάλλει ποσότητα νερού. Λόγω της ιδιαίτερης δομής του μυός του ιχθυηρού και σε συνδυασμό με την υψηλή πιθανότητα σε επιμόλυνση κατά την αλίευσή του, οι συνθήκες καθώς και το περιβάλλον είναι ευνοϊκά για γρήγορη μικροβιακή και φυσικοχημική αλλοίωση. Άρα είναι υψηλής σημασίας ο συνεχής έλεγχος τόσο σε μικροβιακό επίπεδο, όσο και σε υφή, χρώμα και pH πριν την κατανάλωσή τους (Belitz et al., 2009).

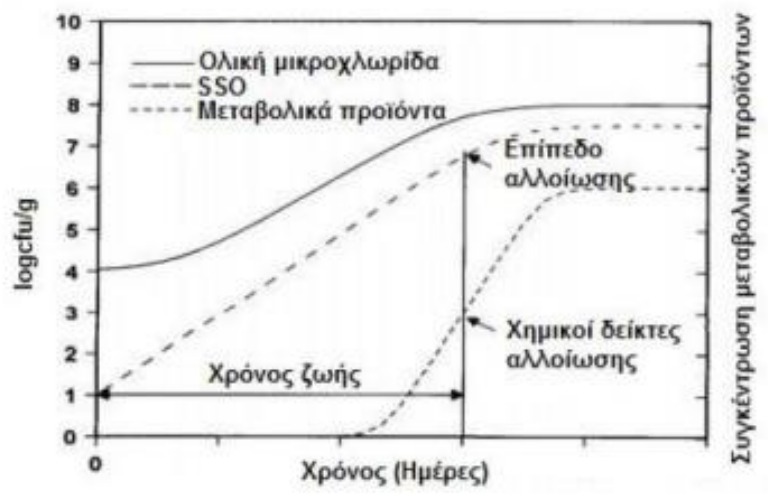
2.5 Αλλοίωση ιχθυηρών

2.5.1 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθυηρών

Η μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων και των ιχθυηρών, μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες όπως είναι το περιβάλλον ανάπτυξης, η ηλικία και το είδος του ιχθυηρού.

Τα νωπά ιχθυηρά έχουν υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο και σε αυτό οφείλεται η γρήγορη αλλοίωσή τους και ο μικρός χρόνος ζωής. Επιπλέον το μικροβιακό φορτίο

επηρεάζεται κατά πολύ από την διαχείριση του προϊόντος από τον άνθρωπο, όπως η συσκευασία, οι συνθήκες αποθήκευσής και η μορφή επεξεργασίας που μπορεί να υποβληθεί. Οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη μικροβιακή αλλοίωση του προϊόντος, καλούνται ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (Specific Spoilage Organisms-SSOs). Στην παρακάτω εικόνα, φαίνεται γραφικά η μικροβιακή αλλοίωση των ιχθυρών (Gram & Huss, 1996).



Εικόνα 2.5: Περιγραφικό διάγραμμα μικροβιακής αλλοίωσης ιχθυηρών (τροποποίηση από Gram and Huss, 1996) (Τσιρώνη, 2010)

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και εν συνεχεία η αλλοίωση του προϊόντος γίνεται εύκολα αντιληπτή στα ιχθυηρά, από τη μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος. Αυτό φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.5: Μικροβιακή αλλοίωση ιχθύων (Gram et al. 1996)

Μικροβιακή δραστηριότητα	Οργανοληπτικό χαρακτηριστικό που εκδηλώνεται	Μικροοργανισμός που προκαλεί την αλλοίωση
Διάσπαση συστατικών προϊόντος	Παραγωγή οσμών και γεύσης αλλοίωσης	*Shewanella baltica* *Aeromonas* spp. *Pseudomonas* spp.
Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαριτικού υλικού	Παραγωγή γλοιώδους υγρού	*Leuconostoc gelidum*
Ανάπτυξη μυκήτων, βακτηρίων και ζυμών	Εμφάνιση ορατών έγχρωμων ή μη αποικιών	Ζύμες-Μύκητες
CO_2 από υδατάνθρακες ή αμινοξέα	Παραγωγή αερίων	*Lactobacillus alimentarius* Ζύμες- Μύκητες

Όλα τα προϊόντα τροφίμων έχουν τη δική τους χαρακτηριστική μικροχλωρίδα. Πιο συγκεκριμένα, σημαντικοί παράγοντες που συνεισφέρουν στη μικροβιακή πολυπλοκότητα του κάθε ιχθυηρού είναι:

- Η επιμόλυνση που υφίσταται το ιχθυηρό από το περιβάλλον του καθώς και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του
- Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών (θερμοκρασία, ενεργότητα νερού a_w, pH, μικροβιακές αλληλεπιδράσεις)

Επιπλέον, το περιβάλλον ανάπτυξης του κάθε ιχθυηρού (γλυκό νερό ή αλμυρό νερό, τροπικό ή αρκτικό περιβάλλον, από την επιφάνεια της θάλασσας ή από το βάθος) καθώς και οι πολλοί διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας του (κατεψυγμένα προϊόντα ιχθυηρού ή κονσερβοποιημένα) είναι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την αρχική συγκέντρωση μικροβίων του καθώς και των προϊόντων του.

Έτσι, η μικροχλωρίδα του ιχθυηρού που αναπτύσσεται σε εύκρατο περιβάλλον (-3-18°C), αποτελείται από ψυχρότροφα κατά Gram-αρνητικά βακτήρια όπως *Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Shewanella, Flavobacterium, Vibrionaceae* και *Aeroemonadaceae*, καθώς και από κατά Gram-θετικά βακτήρια όπως *Bacillus, Micrococcus, Clostridium, Lactobacillus* και *Corynebacterium* που μπορούν να

ανιχνευθούν σε υψηλούς πληθυσμούς κατά τη μικροβιακή ανάλυση των ιχθυηρών. Η μικροχλωρίδα στα ιχθυηρά τροπικών υδάτων (21-30°C) εμφανίζει συχνά μεγαλύτερο αριθμό Gram-θετικών οργανισμών και Εντεροβακτηρίων, αλλά σε γενικές γραμμές είναι όμοια με την αντίστοιχη αυτών που αναπτύσσονται σε εύκρατα κλίματα (Liston, 1980).

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση των ιχθυηρών κατά τη συντήρηση και σε θερμοκρασίες ψύξης (<4 ^{o}C) παρουσία αέρα, υπό κενό και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Gram & Huss, 1996).

Πίνακας 2.6: Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί νωπών ιχθυηρών κατά τη συντήρηση και σε θερμοκρασίες ψύξης (Gram & Huss, 1996)

Ατμόσφαιρα	Εύκρατη ζώνη (-3-18 ^{o}C)	Τροπική ζώνη (21-30 ^{o}C)
Αέρας	*Shewanella putrefaciens* *Pseudomonas spp.*	*Shewanella putrefaciens* *Pseudomonas spp.*
Κενό	*Shewanella putrefaciens* *Γαλακτικά βακτήρια* *Gram- θετικά*	*Γαλακτικά βακτήρια* *Κατά Gram- θετικά βακτήρια*
CO_2	*Γαλακτικά βακτήρια*	*Γαλακτικά βακτήρια* *Gram- θετικά βακτήρια*

Είναι γνωστό ότι ο κυριότερος παράγοντας μικροβιακής αλλοίωσης των ιχθυηρών είναι η ανάπτυξη των βακτηρίων *Pseudomonas* spp.. Οι σημαντικές αλλοιώσεις που προκαλούν είναι κατά βάση δύο. Πρώτον, λόγω του ότι είναι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής και εξάπλωσής τους ανήκει στο εύρος θερμοκρασιών συντήρησης του ιχθυηρού (20-30°C). Δεύτερον, μεταβολίζουν διάφορες ουσίες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων που συμβάλλουν στην οργανοληπτική αλλοίωση. Άλλοι λόγοι που καθιστούν αυτά τα βακτήρια κυρίαρχα για την μικροβιακή αλλοίωση του ιχθυηρού είναι ο μικρός χρόνος διπλασιασμού τους και η ικανότητα τους να μεταβολίζουν μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια.

Όσον αφορά στο νωπό ιχθυηρό και τα προϊόντα του, σημαντικοί παράγοντες που το χαρακτηρίζουν είναι η αρκετά υψηλή τιμή του pH, η παρουσία μεγάλης ποσότητας μη πρωτεϊνικού αζώτου (non protein nitrogen, NPN), καθώς και του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO). Η ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της τιμής του pH (>6.0) του ιχθυηρού μετά την θανάτωσή του είναι μεγάλης σημασίας. Μετά την θανάτωση τους, τα περισσότερα νωπά ιχθυηρά περιέχουν πολύ μικρές ποσότητες υδατανθράκων (<0.5%) στους μυϊκούς τους ιστούς καθώς και παράγουν πολύ μικρές ποσότητες γαλακτικού οξέος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το γεγονός ότι αυτές οι αρχικές συνθήκες και κυρίως η αρχική υψηλή τιμή του pH επιτρέπει στα βακτήρια *Shewanella putrefaciens* να αναπτυχθούν. Έχει διαπιστωθεί ότι οι πληθυσμοί του μικροοργανισμού *Shewanella putrefaciens* μικρότεροι από 10^8/g προϊόντος δεν είναι ικανοί να προκαλέσουν αλλοίωση (Gram & Huss, 1996).

2.5.2 Μεταβολή οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

Η οργανοληπτική αξιολόγηση είναι πολύ σημαντική γιατί κρίνεται η ποιότητα του τρόφιμου και εν συνεχεία η αποδοχή του από τους καταναλωτές. Υπάρχουν ποιοτικά χαρακτηριστικά που κάνουν τους καταναλωτές να στραφούν σε κάθε προϊόν. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι το χρώμα, η υφή, η γεύση, η μετάγευση, η εμφάνιση, η οσμή. Η οργανοληπτική εκτίμηση γίνεται από επιλεγμένους και εκπαιδευμένους δοκιμαστές (Τζιά, 2019).

Με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά (Parlapani et al., 2015), κατά την αποθήκευση του λαβρακιού σε ψύξη (2°C), η εμφάνισή του από πολύ γυαλιστερή γίνεται θαμπή. Πιο αναλυτικά, την πρώτη μέρα η εμφάνισή του είναι πολύ λαμπερή με τα χρώματα στο δέρμα του να ξεχωρίζουν, να ιριδίζουν, και να είναι πιο ευδιάκριτα. Κατά την 6^η μέρα αποθήκευσης, χάνεται ένα μέρος της λαμπρότητας του και τα χρώματα δεν ιριδίζουν τόσο έντονα. Την 12^η μέρα αποθήκευσης, υπάρχει ένας ελαφρύς αποχρωματισμός, πλήρης απώλεια της λαμπρότητας και το δέρμα του ιχθυηρού αρχίζει και γίνεται θαμπό. Τέλος, κατά την 19^η μέρα και μετά, ο αποχρωματισμός είναι εντονότατος, τα χρώματα του δέρματος ξεθωριάζουν, και η ράχη του γίνεται γκρι.

Όσον αφορά στην οσμή του, κατά την αποθήκευση σε ψύξη τις πρώτες μέρες παραμένει η μυρωδιά της φρεσκάδας και το ιχθυηρό έχει μια ουδέτερη οσμή, αλλά όσο αλλοιώνεται, περνάει στο στάδιο της χαρακτηριστικής μυρωδιάς, και από την 18η μέρα και μετά μυρίζει σαν ξινισμένο.

2.5.3 Μεταβολή φυσικοχημικών χαρακτηριστικών

Εκτός από τις μικροβιολογικές μεταβολές, η ποιότητα των ιχθυηρών κρίνεται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Χαρακτηριστικά όπως το χρώμα, η υφή, το σχήμα και η ομοιομορφία του είναι βασικά κριτήρια τα οποία εκτός από την ποιότητα των ιχθυηρών επηρεάζει και τις επιλογές των καταναλωτών. Όπως ισχύει για τα περισσότερα προϊόντα, έτσι και για τα ιχθυηρά, όσο χάνουν τη φρεσκάδα τους, αλλοιώνονται και τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

Με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά (Cakli et al., 2007), κατά την αποθήκευση του λαβρακιού σε ψύξη (4-5°C), το χρώμα του από πολύ λαμπερό και γυαλιστερό, αρχίζει την 5η μέρα να χάνει τη γυαλάδα του, και από την 18η μέρα και μετά είναι τελείως θαμπό. Επιπλέον δεν εμφανίζει καθόλου γλιστερό δέρμα, αλλά από την 5η μέρα και μετά εμφανίζει μια ελαφριά μορφή κολλώδους ουσίας. Το χρώμα από τα βράγχια από σκούρο κόκκινο, όσο αλλοιώνεται μετατρέπεται σε καφέ. Το χρώμα της κοιλιακής του χώρας από αρκετά λευκό, αρχίζει και γίνεται κιτρινωπό από την 3η μέρα αποθήκευσής του. Το σχήμα του αρχίζει και αλλάζει μετά από την 18η μέρα αποθήκευσης και είναι πιο διογκωμένο. Επίσης, όταν είναι φρέσκο είναι αρκετά εύκαμπτο και ελαστικό, αλλά όσο αλλοιώνεται κατά την αποθήκευσή του μαλακώνει. Όλα τα παραπάνω οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του λαβρακιού κατά την αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης, παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 2.7: Μεταβολή οργανοληπτικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών λαβρακιού κατά την αποθήκευση σε ψύξη (4-5ºC) (Cakli et al., 2007)

Ιδιότητα	Χρόνος αποθήκευσης (μέρες)						
	1η	3η	5η	8η	12η	15η	18η
Εμφάνιση	Πολύ λαμπερό	Πολύ λαμπερό	Λαμπερό	Λαμπερό	Λαμπερό	Λαμπερό	Θαμπό
Δέρμα	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Ελαστικό	Μαλακό
Βλέννα	Απούσα	Απούσα	Ελαφρώς κολλώδες	Ελαφρώς κολλώδες	Ελαφρώς κολλώδες	Ελαφρώς κολλώδες	Κολλώδες
Υφή	Σφιχτό	Σφιχτό	Σφιχτό	Μαλακό	Μαλακό	Μαλακό	Βαθουλωτό
Καθαρότητα ματιού	Καθαρό	Καθαρό	Καθαρό	Ελαφρώς θαμπό	Ελαφρώς θαμπό	Ελαφρώς θαμπό	Θαμπό
Σχήμα	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Κανονικό	Βαθουλωτό
Αίμα	Χωρίς αίμα	Χωρίς αίμα	Χωρίς αίμα	Χωρίς αίμα	Χωρίς αίμα	Χωρίς αίμα	Ματωμένο
Χρώμα βράγχιων	Σκούρο κόκκινο	Σκούρο κόκκινο	Σκούρο κόκκινο	Κόκκινο	Κόκκινο	Κόκκινο	Καφέ
Οσμή	Φρεσκάδας	Φρεσκάδας	Ουδέτερη	Μπαγιάτικου	Μπαγιάτικου	Μπαγιάτικου	Χαλασμένου
Αποχρωματισμός κοιλιακής χώρας	Λευκή ιριδίζων	Λευκή ιριδίζων	Κιτρινωπή	Κιτρινωπή	Κιτρινωπή	Κιτρινωπή	Κιτρινωπή

Όσον αφορά στα χημικά χαρακτηριστικά, κατά την αποθήκευση σε ψύξη, υπάρχουν αλλαγές στα ιχθυηρά που αφορούν την τιμή του pH και τα λιπαρά τους. Λόγω του ότι οι μύες του ιχθυηρού έχουν μικρή περιεκτικότητα σε γλυκογόνο, κατά την αλλοίωσή του η τιμή του pH εμφανίζει πολύ μικρή πτώση (Belitz et al., 2009). Για το λαβράκι, δεν παρατηρούνται αλλαγές μέχρι την 5η μέρα αποθήκευσης (pH=6.8). Έπειτα αρχίζει σταδιακή πολύ μικρή πτώση της τιμής του pH, και αυτό οφείλεται στην μικροβιακή αλλοίωση του (Cakli et al., 2007; Kyrana & Lougovois, 2002).

Επίσης, κατά την αποθήκευση σε ψύξη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ξεκινάει η οξείδωση των λιπαρών. Ο ρυθμός του ταγγισμού στη σάρκα του ιχθυηρού είναι πολύ μικρός με αποτέλεσμα να μην υπερβαίνει το όριο στο οποίο επηρεάζεται η γεύση λόγω της οξείδωσης των λιπαρών. Αυξημένα επίπεδα λιπαρών ή πρωτεΐνης στο μυϊκό ιστό, αυξάνουν την πιθανότητα οξείδωσης των λιπαρών και έτσι το τρόφιμο είναι πιο

ευαίσθητο σε χημική αλλοίωση. Η χρήση της βιταμίνης Ε ως αντιοξειδωτικό καθυστερεί την οξείδωση και αυξάνει την διατηρησιμότητα το τροφίμου. Έτσι, η αυτο-οξείδωση των λιπαρών χαρακτηρίζεται ως μηδαμινή αλλοίωση των ιχθυηρών κατά την αποθήκευση. Όσον αφορά στο λαβράκι, η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στη σάρκα του αυξάνεται με αργούς ρυθμούς μέχρι τη $10^{η}$ μέρα και έπειτα ο ρυθμός αύξησης αυξάνεται πολύ απότομα περίπου τη $15^{η}$ μέρα αποθήκευσης. Έπειτα, παρατηρείται απότομη μείωση για όλο το υπόλοιπο διάστημα αποθήκευσης. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων μπορεί να οφείλεται είτε στη διάσπαση των τριγλυκεριδίων που γίνεται από ένζυμα που εκκρίνονται από το πεπτικό σύστημα του ιχθυηρού, είτε από μικροοργανισμούς (Kyrana & Lougovois, 2002).

3 Μη θερμικές διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων

3.1 Η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης

3.1.1 Εισαγωγή

Η Υπερυψηλή Πίεση αποτελεί μια καινοτόμο μη θερμική μέθοδο επεξεργασίας τροφίμων και μπορεί να εφαρμοστεί σε στερεά ή υγρά, συσκευασμένα ή μη συσκευασμένα τρόφιμα (Balasubramaniam & Farkas, 2008). Κατά την εφαρμογή της διεργασίας, τα τρόφιμα υποβάλλονται σε υψηλές πιέσεις 100-1200 MPa και επιτυγχάνεται διάρρηξη των εξωτερικών τοιχωμάτων των κυττάρων (Chawla et al., 2011). Η πίεση είναι υδροστατική με αποτέλεσμα να μην αλλοιώνεται ιδιαίτερα η εμφάνιση του τροφίμου όπως με χρήση μηχανικής πίεσης (Αλεξανδράκης, 2015). Οι θερμοκρασίες της διεργασίας ποικίλουν και μπορεί να είναι κάτω των 0°C (με σκοπό να μειωθούν, όσο γίνεται, φαινόμενα αδιαβατικής θερμότητας) μέχρι άνω των 100°C. Ο χρόνος της επεξεργασίας επίσης ποικίλει ανάλογα το τρόφιμο και τον σκοπό για τον οποίο εφαρμόζεται η Υπερυψηλή Πίεση (Balasubramaniam & Farkas, 2008).

Η εφαρμογή της Υπερυψηλής Πίεσης στα ιχθυηρά και στα προϊόντα τους, είναι μια μέθοδος η οποία έχει σκοπό να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος, επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Πρόκειται για μια εναλλακτική λύση έναντι στις κλασσικές μεθόδους επεξεργασίας και συντήρησης τροφίμων λόγω της μικρής επίδρασης στους ομοιοπολικούς δεσμούς, γεγονός που επηρεάζει ελάχιστα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Matser et al., 2000).

Παρακάτω φαίνεται μια μονάδα Υπερυψηλής Πίεσης για επεξεργασία τροφίμων:

Εικόνα 3.1: Μονάδα Υπερυψηλής Πίεσης για επεξεργασία τρόφιμων

3.1.2 Βασικές αρχές λειτουργίας που ακολουθεί η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης

Η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων αφού αδρανοποιεί τα ένζυμα και προκαλεί απενεργοποίηση και επιπλέον μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών που επιβιώνουν, επεκτείνοντας τον χρόνο ζωής των τροφίμων (Balasubramaniam & Farkas, 2008). Επηρεάζει κυρίως διάφορα μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, λιπίδια και υδατάνθρακες. Τα συστατικά με χαμηλό μοριακό βάρος όπως βιταμίνες και μέταλλα τα οποία είναι αυτά που καθορίζουν τη θρεπτική αξία του τροφίμου, αλλά και ενώσεις που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά δεν επηρεάζονται σημαντικά από την επεξεργασία (Oliveira et al., 2017).

Η αρχές λειτουργίας που ακολουθεί η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης είναι οι παρακάτω:

- **Αρχή Le Chatelier's**: *«Οποιοδήποτε φαινόμενο σε ισορροπία όπως χημική αντίδραση, αλλαγή φάσης και/ή μεταβολή στην μοριακή διαμόρφωση, που συνοδεύεται με μείωση του όγκου, θα ενισχύεται με αύξηση της πίεσης».* Όταν εφαρμόζεται πίεση σε ένα σύστημα, αυτό θα αντιδράσει έτσι ώστε να

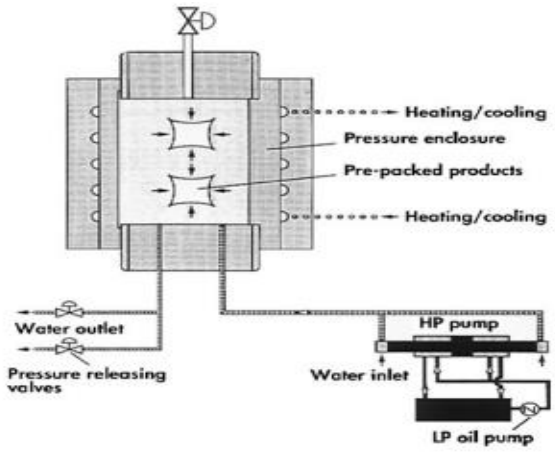
αντισταθμίσει την αλλαγή που προκλήθηκε (μεταβολή του όγκου) (Balasubramaniam & Farkas, 2008; Chawla et al., 2011). Αυτό σημαίνει ότι το προϊόν μετά την επεξεργασία του με Υπερυψηλή Πίεση, θα έχει μικρότερο όγκο από τον αρχικό (Oliveira et al., 2017).

- **Ισοστατική αρχή (Isostatic Principle)**: Με βάση αυτήν την αρχή, η εφαρμογή της πίεσης είναι ομοιόμορφη και ασκείται εξίσου σε όλες τις κατευθύνσεις. Όταν τα τρόφιμα συμπιέζονται ομοιόμορφα, θα επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση όταν η πίεση απελευθερωθεί. Η συμπίεση γίνεται ανεξαρτήτως του μεγέθους και της γεωμετρίας των τροφίμων με την μεταφορά της πίεσης να ξεκινά από το εξωτερικό μέχρι τον πυρήνα τους (Chawla et al., 2011).
- **Αρχή Μικροσκοπικής Διάταξης (Microscopic Ordering Principle)**: Σύμφωνα με αυτήν την αρχή, σε σταθερή θερμοκρασία, με αύξηση της πίεσης αυξάνεται ο βαθμός διάταξης των μορίων του συγκεκριμένου συστατικού. Επομένως, η θερμοκρασία και η πίεση ασκούν ανταγωνιστικές δυνάμεις στη μοριακή δομή του τροφίμου (Chawla et al., 2011).

3.1.3 Εξοπλισμός της μονάδας της Υπερυψηλής Πίεσης

Ο εξοπλισμός μίας μονάδας Υπερυψηλής Πίεσης, για επεξεργασία τροφίμων αποτελείται από τα επιμέρους τμήματα:

- Ένα θάλαμο συμπίεσης στον οποίο εισάγονται τα προς επεξεργασία τρόφιμα κι έπειτα εφαρμόζονται οι υψηλές πιέσεις
- Ένα σύστημα παραγωγής πίεσης
- Συστήματα ελέγχου θερμοκρασίας και πίεσης που βρίσκεται μέσα στο θάλαμο (Balasubramaniam & Farkas, 2008)



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση συστήματος Υπερυψηλής Πίεσης (Chawla et al., 2011)

Ο κύκλος διεργασίας Υπερυψηλής Πίεσης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Γέμισμα του θαλάμου συμπίεσης με το προς επεξεργασία προϊόν
- Κλείσιμο του δοχείου
- Εφαρμογή των συνθηκών πίεσης της διεργασίας
- Αποσυμπίεση του δοχείου
- Απομάκρυνση του επεξεργασμένου προϊόντος (Balasubramaniam & Farkas, 2008)

Ο θάλαμος πίεσης συνήθως αποτελείται από δύο ή παραπάνω ομοκεντρικούς κυλίνδρους. Ο εξωτερικός κύλινδρος προστατεύει το θάλαμο και αποτελείται από υψηλής αντοχής ατσάλι. Τα τρόφιμα που εισάγονται στη μονάδα, πρέπει να συσκευάζονται με ειδική συσκευασία που σφραγίζει το τρόφιμο για να προστατευθεί. Σφραγίζονται με ένα βιδωτό πώμα ή με ένα σφραγισμένο πλαίσιο το οποίο τοποθετείται πάνω από το θάλαμο (Chawla et al., 2011).

Υπάρχουν δύο τρόποι συμπίεσης:

- **Άμεση συμπίεση**: Κατά την άμεση συμπίεση, στο θάλαμο επεξεργασίας εισάγεται το υγρό τρόφιμο και συμπιέζεται από ένα έμβολο μικρής διαμέτρου το οποίο κινείται με τη βοήθεια μιας αντλίας πίεσης. Έτσι επιτυγχάνεται γρήγορη συμπίεση (Αλεξανδράκης, 2015). Ενδεικτικά, πίεση μεγέθους 680 MPa, μπορεί να συμπιέσει το υγρό τρόφιμο κατά 15%. Μετά τον απαραίτητο χρόνο που χρειάζεται για την επεξεργασία, ανοίγοντας τη βαλβίδα

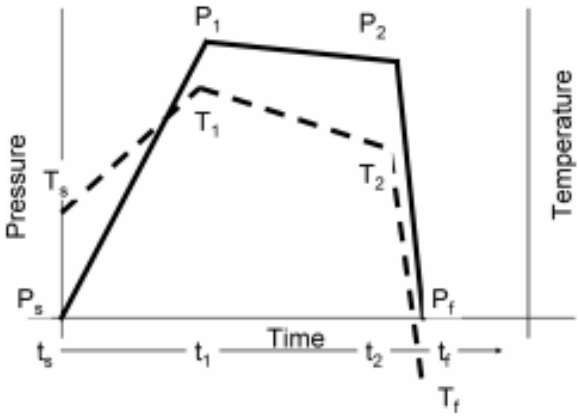
απελευθερώνεται η πίεση, αποσυμπιέζεται το τρόφιμο και έπειτα απαιτείται να μπει σε αποστειρωμένη δεξαμενή και να συσκευασθεί ασηπτικά (Balasubramaniam & Farkas, 2008; Chawla et al., 2011).

- **Έμμεση συμπίεση**: Κατά την έμμεση συμπίεση, το μέσο μεταφοράς της πίεσης αντλείται από έναν ενισχυτή πίεσης. Αφού πληρωθεί ο θάλαμος συμπίεσης με το προς επεξεργασία τρόφιμο και σφραγισθεί, γεμίζει με το μέσο μεταφοράς της πίεσης. Πρόκειται για ένα ρευστό χαμηλής συμπιεστότητας, όπως νερό ή γλυκερόλη, που διαβιβάζει την πίεση στο συσκευασμένο τρόφιμο. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται στα περισσότερα βιομηχανικά συστήματα. Το πλεονέκτημα της επεξεργασίας με έμμεση συμπίεση είναι ότι αποφεύγεται ο κίνδυνος μόλυνσης του προϊόντος, γιατί το τρόφιμο μπαίνει στη μονάδα Υπερυψηλής Πίεσης συσκευασμένο και δεν υπάρχει ανάγκη για καθάρισμα μεταξύ των χρήσεων (Balasubramaniam & Farkas, 2008; Chawla et al., 2011).

Η διεργασία εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τρείς παραμέτρους, την πίεση (P), την θερμοκρασία (T) και το χρόνο (t).

Κατά την επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση, με αύξηση της πίεσης ξεκινάει η συμπίεση του τροφίμου και παράλληλα πραγματοποιείται αδιαβατική αύξηση της θερμοκρασίας. Κατά τη διάρκεια της αδιαβατικής συμπίεσης το έργο που παράγει ο περιβάλλων χώρος στο σύστημα αυξάνει την εσωτερική ενέργεια του τροφίμου και άρα αυτό αυξάνει την θερμοκρασία. Σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα (Εικόνα 3.3), ξεκινώντας από ατμοσφαιρικές συνθήκες (P_S και T_S) η πίεση και η θερμοκρασία αυξάνονται και φτάνουν στις τιμές επεξεργασίας P_1 και T_1. Η αύξηση της θερμοκρασίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως από την αρχική θερμοκρασία, τη συμπιεστότητα του προϊόντος, και την πίεση επεξεργασίας P_1 που έχει αποφασισθεί. Το τρόφιμο επεξεργάζεται μεταξύ των χρόνων επεξεργασίας σε συνθήκες Υπερυψηλής Πίεσης t_1 και t_2. Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των χρόνων επεξεργασίας, παρατηρείται μικρή πτώση πίεσης από P_1 σε P_2, καθώς και μικρή πτώση θερμοκρασίας από T_1 σε T_2 εξαιτίας της απώλειας θερμότητας από το δοχείο πίεσης. Αμέσως μετά την εκτόνωση η πίεση από P_2 φθάνει σε ατμοσφαιρική πίεση P_f

και η θερμοκρασία πέφτει ακαριαία και φθάνει σε τιμή ελάχιστα χαμηλότερα από την αρχική (T_f) (Rastogi et al., 2007).



Εικόνα 3.3: Μεταβολή πίεσης και θερμοκρασίας κατά την επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση σε συναρτήσει με το χρόνο (Rastogi et al., 2007)

Ως μέσο συμπίεσης, χρησιμοποιείται κυρίως νερό ή γλυκερόλη. Αυτό συμβαίνει γιατί αυτά τα δύο ρευστά έχουν χαμηλή συμπιεστότητα. Όσον αφορά στο νερό, σε αδιαβατικές συνθήκες, για κάθε μεταβολή πίεσης κατά 100 MPa, αλλάζει θερμοκρασία κατά 3°C. Επιπλέον, επειδή τα περισσότερα τρόφιμα έχουν υψηλό ποσοστό νερού, κατά τη μεταβολή της πίεσης και με την ακόλουθη μεταβολή της θερμοκρασίας, αλλάζει και η εσωτερική θερμοκρασία των τροφίμων (Buzrul et al., 2008; Rasanayagam et al., 2003).

3.1.4 Πλεονεκτήματα επεξεργασίας τροφίμων με Υπερυψηλή Πίεση

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου συνοψίζονται παρακάτω:

- Είναι μη θερμική κατεργασία και επομένως δεν καταστρέφονται σημαντικά ποιοτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου σε αντίθεση με τις θερμικές μεθόδους επεξεργασίας
- Επιτρέπει την επεξεργασία του τρόφιμου σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών

- Επιτρέπει τη στιγμιαία μεταβολή της πίεσης μέσα στο σύστημα. Αυτό σημαίνει ότι με το κλείσιμο της βαλβίδας, η πίεση από ατμοσφαιρική αυξάνεται σε πολύ υψηλές πιέσεις (μέχρι 1200 MPa) σε ελάχιστο χρόνο
- Είναι ανεξάρτητη από το μέγεθος και τη γεωμετρία του τροφίμου που θα επεξεργαστεί σε αντίθεση με τις θερμικές μεθόδους (Farkas & Hoover, 2000)
- Προκαλεί απενεργοποίηση ή/και θανάτωση μικροοργανισμών και ενζύμων και αυτό συνδέεται με τη βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων, αφού δεν χρειάζεται η προσθήκη χημικών συντηρητικών και προσθέτων για να επιμηκυνθεί ο χρόνος ζωής τους (Rastogi et al., 2007; Truong et al., 2015).
- Βελτιστοποιεί τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, όπως η υφή και το χρώμα (Matser et al., 2000).

Παρόλο που η μέθοδος έχει διευκολύνει τις διαδικασίες επεξεργασίας και έχει βελτιστοποιήσει την ποιότητα των τροφίμων, πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η εγκατάσταση της μονάδας έχει πολύ υψηλό κόστος αγοράς, λειτουργίας και συντήρησης. Η εφαρμογή της είχε αρκετά περιορισμένη χρήση λόγω του υψηλού κόστους της ηλεκτρικής ενέργειας που απαιτείται για την επεξεργασία με αυτό να διορθώνεται με τον καιρό αφού έχουν αναπτυχθεί καινούργιες τεχνολογίες όπου κάνουν την επεξεργασία των τροφίμων με Υπερυψηλή Πίεση πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη (Cacace et al., 2020).

3.1.5 Επίδραση Υπερυψηλής Πίεσης στα ιχθυηρά

3.1.5.1 Γενικά

Η επεξεργασία των τροφίμων με Υπερυψηλή Πίεση έχει αντίκτυπο στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς επηρεάζει και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Στα ιχθυηρά η πιο συνηθισμένη τιμή επεξεργασίας που χρησιμοποιείται είναι μεταξύ 100-600 MPa για χρόνο 10-15 λεπτά (Oliveira et al., 2017).

3.1.5.2 Αλλαγές σε χρώμα και υφή

Η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση επηρεάζει άμεσα το χρώμα του ιχθυηρού, το οποίο είναι ένα βασικό στοιχείο που συνδέεται με την αποδεκτότητα του από τον καταναλωτή. Το τελικό χρώμα του είναι αποτέλεσμα πολλών μηχανισμών και αντιδράσεων (Oliveira et al., 2017). Η μορφή των μυών των ιχθυηρών διαφέρουν ανάλογα με το είδος τους. Στα περισσότερα ιχθυηρά οι μύες έχουν μια ελαφρώς διαφανή όψη, ενώ σε άλλα είναι κοκκινωποί. Όταν το ιχθυηρό επεξεργαστεί με Υπερυψηλή Πίεση, οι μύες του γίνονται αδιαφανής και συμβαίνει ένας ελαφρύς αποχρωματισμός (Ohshima et al., 1993). Οι μηχανισμοί που προκαλούν τις αλλαγές του χρώματος είναι αποτέλεσμα της οξείδωσης των λιπαρών παρουσία μετάλλων ως καταλύτη. Επιπλέον, η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση, προκαλεί συρρίκνωση των ιστών και των ινών καθώς και θρυμματισμό κάποιων μυϊκών ινών, με το πρώτο να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση μεγέθους του ιχθυηρού, και το δεύτερο το μαλάκωμα της υφής του (Oliveira et al., 2017).

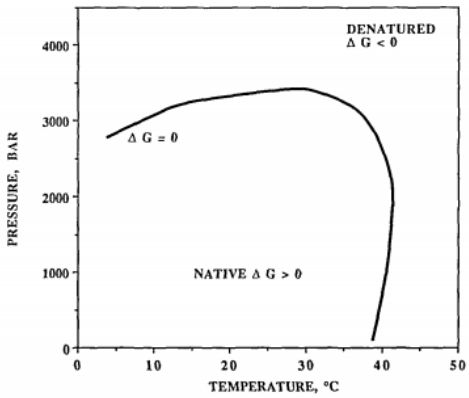
3.1.5.3 Επίδραση στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι μόρια τα οποία επηρεάζονται άμεσα όταν εκτεθεί το ιχθυηρό σε Υπερυψηλή Πίεση. Οι αλλαγές αφορούν κυρίως στην τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών, αλλά είναι πιθανόν να εμφανισθούν τροποποιήσεις και στην τριτοταγή, ακόμη και στην δευτεροταγή δομή τους. Πιέσεις μέχρι 150 MPa επιδρούν στην τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών, από 150 μέχρι 200 MPa στην τριτοταγή δομή, ενώ από 300-700 MPa στην δευτεροταγή δομή (Lullien-Pellerin & Balny, 2002). Οι πρωτεΐνες παρουσία Υψηλής Πίεσης διαχωρίζονται, ξεδιπλώνονται, μετουσιώνονται, συσσωματώνονται, ζελατινοποιούνται ανάλογα την τιμή της πίεσης που θα εφαρμοσθεί. Οι δεσμοί υδρογόνου και οι δισουλδιφικοί δεσμοί είναι πιο σταθεροί και δεν σπάνε εύκολα. Αντίθετα, οι ηλεκτροστατικοί δεσμοί και τα υδρόφοβα μόρια είναι πιο ευαίσθητα στην έκθεση σε Υπερυψηλή Πίεση και προκαλείται αποσταθεροποίησή τους λόγω μείωσης του όγκου του τροφίμου. Επομένως η εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης στο ιχθυηρό προκαλεί αλλαγές στις υδροφοβικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες με τη σειρά τους έχουν σημαντική

επίπτωση στη δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών (Oliveira et al., 2017; Schubring et al., 2003).

Κατά την εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης στο τρόφιμο αυξάνεται και η θερμοκρασία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μετουσίωση των πρωτεϊνών, δηλαδή το ξεδίπλωμα του πρωτεϊνικού μορίου (αλλαγή τεταρτοταγούς δομής). Η δευτεροταγής δομή μπορεί να επηρεαστεί μόνο σε πολύ υψηλές πιέσεις, που είναι πιο σπάνιο να εφαρμοστούν, άρα η α-έλικα ή τα β-πτυχωτά φύλλα παραμένουν αναλλοίωτα (Seefeldt et al., 2009). Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.4) φαίνεται η εξάρτηση της μετουσίωσης των πρωτεϊνών από τη θερμοκρασία και το χρόνο.

Όταν η πίεση αυξάνεται έως 100 MPa, η θερμοκρασία η οποία προκαλεί μετουσίωση στη πρωτεΐνη αυξάνεται, και εφόσον φθάσει σε μια πολύ υψηλή τιμή πίεσης, αρχίζει και μειώνεται. Έτσι το διάγραμμα πίεσης-χρόνου για τη μετουσίωση πρωτεϊνών, έχει μια ελλειπτική μορφή. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε θερμοκρασία δωματίου, απαιτούνται υψηλές πιέσεις για να επιτευχθεί η μετουσίωση, όπως φαίνεται και από το σχήμα (Masson, 1993).



Εικόνα 3.4: Εξάρτηση της μετουσίωσης των πρωτεϊνών από τη θερμοκρασία και το χρόνο (Masson, 1993)

3.1.5.4 Επίδραση στα λιπαρά

Οι υδρόβιοι οργανισμοί, χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά είναι ευαίσθητα στην οξείδωση, και αυτό επηρεάζει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων του αρώματος, του χρώματος, της υφής και της θρεπτικής αξίας. Έχει διαπιστωθεί ότι όταν εκτεθεί το ιχθυηρό σε συνθήκες Υπερυψηλής Πίεσης, τα λιπαρά συστατικά που βρίσκονται στους μύες του, επιταχύνουν την διαδικασία της οξείδωσης τους

(Ohshima et al., 1993). Στα συστατικά των ιχθυηρών υπάρχουν ανόργανοι και βιολογικοί καταλυτές όπως μέταλλα και ένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται με την αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης και υποβοηθούν τις αντιδράσεις οξείδωσης των λιπαρών (Medina-Meza et al., 2014).

Η οξείδωση των λιπαρών λόγω της επεξεργασίας με υψηλές πιέσεις εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η τιμή της εφαρμοζόμενης πίεσης, ο χρόνος επεξεργασίας και η χημική του σύσταση. Τα ιχθυηρά μεγαλύτερης ηλικίας είναι πιο ευαίσθητα στην Υπερυψηλή Πίεση, άρα ο ρυθμός οξείδωσης των λιπαρών τους είναι μεγαλύτερος. Επιπλέον όταν το ζωικό λίπος απομονωθεί και επεξεργαστεί με πίεση, είναι ιδιαίτερα σταθερό και δεν οξειδώνεται σε πιέσεις μέχρι 600-800 MPa, ενώ επηρεάζεται σε πολύ χαμηλές πιέσεις όταν βρίσκεται στον μυ του ιχθυηρού λόγω της δράσης πρωτεϊνών, ενζύμων και μετάλλων (Oliveira et al., 2017).

3.1.5.5 Επίδραση στο pH

Η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση εμφανίζει μικρή αύξηση στην τιμή του pH των ιχθυηρών, κατά 0.2-0.5 μονάδες. Παρόλα αυτά, σε κάποια από αυτά δεν έχει παρατηρηθεί αλλαγή στην τιμή του και υπάρχουν και κάποιες εξαιρέσεις με μείωση της μετά την έκθεση στην υψηλή πίεση. Επομένως, η επίδραση εξαρτάται και από το είδος του προϊόντος. Η αύξηση της τιμής του pH οφείλεται στη μετουσίωση των πρωτεϊνών, η οποία είναι πιο έντονη σε πιέσεις μεταξύ 400-500 MPa. Αυτό συμβαίνει γιατί τα δραστικά αλκαλικά αμινοξέα που προκύπτουν από τις αλλαγές τόσο στην τριτοταγή όσο και στην τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών αυξάνουν την τιμή του pH του ιχθυηρού (Oliveira et al., 2017).

3.1.5.6 Επίδραση στους μικροοργανισμούς

Τα αποτελέσματα της Υπερυψηλής Πίεσης στους μικροοργανισμούς του ιχθυηρού είναι σπουδαίου ενδιαφέροντος γιατί το μικροβιακό φορτίο είναι βασικό στοιχείο ποιότητας και διατηρησιμότητας του τροφίμου. Είναι γνωστό ότι η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση μειώνει κατά πολύ την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλά δεν μπορεί να την εξαλείψει πλήρως για όλους τους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, αν η

επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση συνδυαστεί και με μια άλλη μέθοδο επεξεργασίας μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη πιο αποτελεσματική μείωση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Ohshima et al., 1993).

Στους ζωντανούς υδρόβιους οργανισμούς, οι μικροοργανισμοί βρίσκονται περισσότερο στην εξωτερική επιφάνεια και σε κάποια εσωτερικά τμήματα. Μετά τη θανάτωση του ιχθυηρού η παρουσία βακτηρίων στους μύες είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης κατά την αλίευσή του και έπειτα από την επεξεργασία του (Teixeira et al., 2014).

Η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση μπορεί να προκαλέσει πολλές μεταβολές στα κύτταρα των μικροοργανισμών, επηρεάζοντας όχι μόνο τη δομή τους αλλά και τις μεταβολικές διεργασίες του ίδιου του μικροοργανισμού. Έτσι, εφαρμόζοντας Υπερυψηλή Πίεση στο τρόφιμο, προκαλείται καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών. Οι δομές λιπιδίων της μεμβράνης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες και με την εφαρμογή της πίεσης χάνουν τη ρευστότητά τους και γίνονται αδιαπέραστες σε νερό και άλλες ουσίες, ενώ οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-λιπιδίων που είναι απαραίτητες για τη βέλτιστη λειτουργία της μεμβράνης εξασθενούν. Επιπλέον, η εφαρμογή της Υπερυψηλής Πίεσης μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στο DNA των κυττάρων. Με την αύξηση της πίεσης, το μόριο DNA γίνεται πιο σταθερό και έτσι δεν επιτρέπει βασικές λειτουργίες για τη βιωσιμότητα του κυττάρου όπως η αναπαραγωγή, η μεταγραφή και η μετάφραση. Η κυτταρική διαίρεση με σκοπό τη δημιουργία θυγατρικών κυττάρων επηρεάζεται επίσης από την πίεση γιατί πολλές πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για αυτήν καταστρέφονται (Mota et al., 2013).

Η τεχνολογία της Υπερυψηλής Πίεσης προκαλεί μικροβιακές αλλοιώσεις σε πιέσεις μεγαλύτερες των 200 MPa, και θερμοκρασίες μικρότερες των 45°C (Farkas & Hoover, 2000). Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της Υπερυψηλής Πίεσης στους μικροοργανισμούς διαφέρουν ανάλογα το είδος του και την τιμή της πίεσης που θα εφαρμοσθεί (Cacace et al., 2020).

3.1.6 Χρήση της μεθόδου της Υπερυψηλής Πίεσης σε φιλέτα λαβρακιού

Το λαβράκι είναι ένα τρόφιμο το οποίο αλλοιώνεται πολύ εύκολα σε συνθήκες αποθήκευσης τόσο ψύξης όσο και κατάψυξης. Έτσι, προέκυψε η ανάγκη να χρησιμοποιηθεί μια μέθοδος η οποία θα παρατείνει τη διατηρησιμότητά του. Η χρήση της Υπερυψηλής Πίεσης επιτυγχάνει απενεργοποίηση των μικροοργανισμών του λαβρακίου καθώς και επιδρά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

Με βάση διάφορες μελέτες που έλαβαν χώρα λαμβάνονται τα παρακάτω:

- **Επίδραση της Υπερυψηλής Πίεσης στη μικροβιακή ανάπτυξη.** Με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά (Tsironi et al., 2019), έγινε εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης σε συνθήκες 600 MPa στους 25°C για 5 λεπτά σε φιλέτα λαβρακιού τα οποία στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε ψύξη (2°C) σε αερόβιες συνθήκες. Η επεξεργασία έδειξε ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων HP, ήταν ήδη πολύ μειωμένο σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα δείγματα, μείωση της τάξης των 3.5 log(cfu/g). Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα στα φιλέτα HP ήταν κάτω από το όριο αλλοίωσης (6-8 log(cfu/g)) μετά από 2 μήνες στους 2°C. Τα είδη *Pseudomonas* spp. αναπτύχθηκαν ταχύτερα, ενώ ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* και η τα είδη *Shewanella* spp. παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης μέχρι τους 2 μήνες αποθήκευσης. Οι ζύμες και οι μύκητες, όπως και τα είδη *Enterobacteriaceae* spp. ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης μέχρι την 11^{η} μέρα αποθήκευσης.

  Με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά (Truong et al., 2015), με αποθήκευση των δειγμάτων λαβρακιού στους 4°C και επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση για 5 λεπτά παρατηρήθηκε ότι όταν εφαρμόσθηκε πίεση 200 MPa, η μείωση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ήταν της τάξης των 0.8 log(cfu/g). Παράλληλα, όταν εφαρμόσθηκε πίεση 300 MPa η μείωση ήταν της τάξης των 2 log(cfu/g), στα 400 MPa 3.2 log(cfu/g) και στα 500 MPa 4.5 log(cfu/g). Στην εφαρμογή πίεσης 300-500 MPa, επιτεύχθηκε αύξηση του χρόνου ζωής των δειγμάτων τουλάχιστον 7 μέρες.
- **Επίδραση Υπερυψηλής Πίεσης στην υφή:** Με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά (Tsironi et al., 2019), η υφή των φιλέτων λαβρακιού επηρεάζεται και

αυτή μετά την εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης σε συνθήκες 600 MPa για 5 λεπτά. Η σκληρότητα και η συνεκτικότητα αυξήθηκαν αρκετά στα φιλέτα μετά την εφαρμογή της μεθόδου. Η προσκολλησιμότητα ήταν μια παράμετρος που δεν επηρεάσθηκε ιδιαίτερα. Επιπρόσθετα, στα φιλέτα HP, με τη χρήση μικροσκοπίου φαίνεται ότι στην αρχή της αποθήκευσής τους, οι μυϊκές ίνες φαινόνταν πιο συμπαγείς, ενώ μετά την ανάλυση στους 2 μήνες αποθήκευσης, ήταν πιο κομματιασμένες και λιγότερο συμπαγείς. Αυτή η αλλαγή οφείλεται στο ότι ο μυϊκός ιστός είναι πιο ευαίσθητος στην αλλοίωση μετά τη θανάτωση του ιχθύος. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και με εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης 500 MPa για 5 λεπτά και αποθήκευση των φιλέτων λαβρακιού 4°C (Chéret et al., 2005).

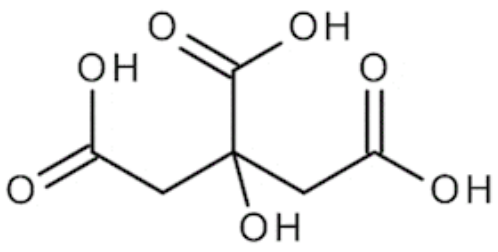
- **Επίδραση Υπερυψηλής Πίεσης στο χρώμα:** Με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά (Chéret et al., 2005), την μέρα που θανατώθηκε το ιχθυηρό οι μύες του είχαν λαμπερή, λεία, λευκή και ημιδιάφανη εμφάνιση. Με εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης 500 MPa για 5 λεπτά και αποθήκευση των φιλέτων λαβρακιού σε συνθήκες ψύξης (4°C) παρατηρήθηκαν αλλαγές στους δείκτες χρώματος. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε ότι η παράμετρος L αυξήθηκε και τα φιλέτα γίνονται πιο θαμπά και λευκά. Οι παράμετροι a (κόκκινο χρώμα) και b (μπλε χρώμα) παρέμειναν σταθερές κατά την αποθήκευση του φιλέτου στους 4°C, αλλά παρατηρήθηκε μείωση της a και αύξηση της b με την εφαρμογή των 500 MPa.

3.2 Χημικές μέθοδοι επεξεργασίας

3.2.1 Κιτρικό οξύ

3.2.1.1 Γενικά

Τα οξέα που προκύπτουν από τα φρούτα, χρησιμοποιούνται ευρέως για παρασκευή είτε βελτιστοποίηση προϊόντων σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς, όπως την ποτοποιία, την βιομηχανία τροφίμων, την φαρμακοβιομηχανία ως χημικό υποκατάστατο. Ένα τέτοιο οξύ είναι και το κιτρικό οξύ. Παγκοσμίως παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα σε εκατομμύρια τόνους το χρόνο, με τη ζήτησή του χρόνο με το χρόνο, ολοένα να αυξάνεται. Επιπλέον, είναι πολύ σημαντικό ότι συμμετέχει σε μία σειρά από ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ζωντανοί οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, παράγουν κιτρικό οξύ μέσω οξείδωσης λιπαρών, υδρογονανθράκων και πρωτεϊνών, έτσι ώστε να το μετατρέψουν σε ενέργεια (κύκλος κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs) (Apelblat et al., 2014).



Εικόνα 3.5: Χημικός τύπος κιτρικού οξέος

3.2.1.2 Σύνθεση κιτρικού οξέος

Το κιτρικό οξύ, είναι ασθενές οργανικό τρικαρβοξυλικό οξύ με μοριακό βάρος 192.12g/mol με χημικό τύπο $C_6H_8O_7$. Είναι φυσικό συστατικό πολλών φυτών και ζωικών ιστών. Επίσης είναι βασικό συστατικό πολλών φρούτων και λαχανικών, κυρίως εσπεριδοειδών. Παρακάτω φαίνεται η ποσότητα του κιτρικού οξέος που υπάρχει τόσο στα φρούτα όσο και σε διάφορα σημεία του ανθρώπινου σώματος.

Πίνακας 3.1: Ποσότητα κιτρικού οξέος τόσο σε εσπεριδοειδή, όσο και σε σημεία του ανθρώπινου σώματος

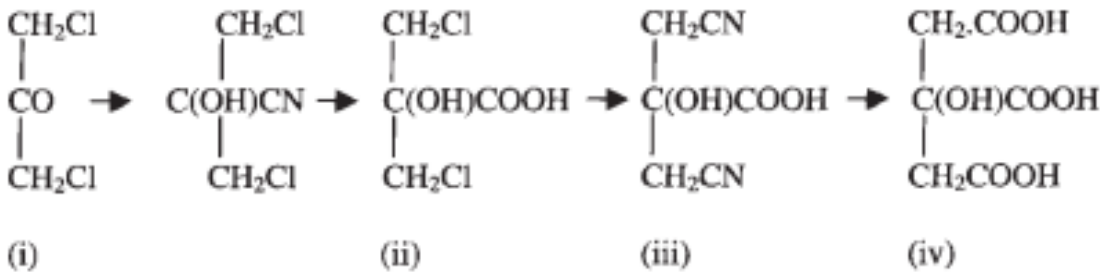
Είδος	**Ποσότητα κιτρικού οξέος**
Λεμόνια	4.0-8.0 % του ξηρού βάρους
Μαύρο φραγκοστάφυλο	1.5-3.0 % του ξηρού βάρους
Γκρέιπ φρουτ	1.2-2.1 % του ξηρού βάρους
Πορτοκάλια	0.6-1.3 % του ξηρού βάρους
Αίμα	10-25 ppm
Κόκκαλα	7500 ppm
Θηροειδής αδένας	750-900 ppm
Μαστικός αδένας	3000 ppm
Μητρικό γάλα	500-1250 ppm
Ουρία	100-750 ppm

Η κανονική του μορφή είναι άχρωμη κρυσταλλική σκόνη είτε άνυδρη είτε ένυδρη. Στην ένυδρη μορφή του αντιστοιχεί ένα μόριο νερού σε ένα μόριο κιτρικού οξέος. Έπειτα από έρευνες διαπιστώθηκε ότι η μετατροπή του ένυδρου κιτρικού οξέος σε άνυδρο συμβαίνει σε θερμοκρασία 36.3^{o}C. Η πυκνότητα του άνυδρου κιτρικού οξέος είναι ρ=1.665 g/cm^3 στους 18°C, και έχει σημείο ζέσεως τους 156-157°C. Η πυκνότητα του ένυδρου κιτρικού οξέος είναι ρ=1.542 g/cm^3 στους 25°C.

Το κιτρικό οξύ κρυσταλλώνεται από υψηλής θερμοκρασίας υγρά διαλύματα σε άνυδρη μορφή (χωρίς μόρια νερού) ως άχρωμη κρυσταλλική σκόνη. Αντίθετα, η ένυδρη μορφή του κρυσταλλώνεται από χαμηλής θερμοκρασίας διαλύματα και ο κρύσταλλος χάνει την υγρασία αν θερμανθεί στους 70-75°C και τήκεται σε θερμοκρασία κατά μέσο όρο 145°C (Apelblat et al., 2014).

Το όνομά του (citric acid) το πήρε από το λατινικό *Citrus,* που σημαίνει εσπεριδοειδές. Αρχικά απομονώθηκε από το χυμό του λεμονιού από έναν Σουηδό επιστήμονα, τον Carl Scheele το 1784. Έτσι από το 1824, οι βιομηχανίες της εποχής το παρήγαγαν από τα λεμόνια, γιατί είχαν εκτιμήσει ότι είναι μία ουσία σπουδαίας βιολογικής σημασίας, αλλά έπειτα αφού οι απαιτήσεις σε κιτρικό οξύ αυξάνονταν, προσπάθησαν να

βρεθούν και άλλοι τρόποι παραγωγής του σε βιομηχανική κλίμακα. Αρχικά, μια πρώτη προσπάθεια για την παρασκευή του πειραματικά και όχι από απομόνωση από φρούτο ή λαχανικό, ήταν η σύνθεσή του από γλυκερόλη (1880). Αυτή η μέθοδος σύνθεσης του κιτρικού οξέος, φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 3.6: Μέθοδος σύνθεσης κιτρικού οξέος από γλυκερόλη (Kristiansen et al., 1998).

Έτσι, προστίθεται στη γλυκερόλη υδροχλωρικό οξύ, και προκύπτει διχλωροακετόνη. Στην διχλωροακετόνη, προστίθεται υδροκυάνιο (HCN), και έπειτα υδροχλωρικό οξύ (HCl) και προκύπτει διχλωροακετονικό οξύ. Αυτό μετά μετατρέπεται σε δικυανο-ακετονικό οξύ με χρήση κυανιούχου καλίου (KCN) που με υδρόλυση, μετατρέπεται σε κιτρικό οξύ (Kristiansen et al.,1998, Apelblat et al., 2014).

Άλλη μέθοδος παρασκευής του κιτρικού οξέος προέκυψε 10 χρόνια μετά, με πρώτη ύλη τον ακετοξικό εστέρα, ο οποίος αντιδράει στοιχειομετρικά με ένα μόριο χλωρίου (Cl_2). Επίσης, ο Lawrence το 1897 πρότεινε μια διαφορετική σύνθεση, με συμπύκνωση του οξικού αιθυλεστέρα με βρωμοοξεικό αιθυλεστέρα, παρουσία ψευδαργύρου. Το 1908 ο Ferrario πρότεινε έναν άλλον τρόπο απόκτησης κιτρικού οξέος που ήταν η υδρόλυση του κιτρικού τριαιθυλεστέρα που παρασκευάζεται από την αντίδραση Lawrence, δηλαδή την συμπύκνωση του οξαλικού αιθυλεστέρα με το βρωμοοξεικό αιθυλεστέρα, με τη διαφορά ότι αντί ψευδάργυρο θα γίνεται παρουσία μαγνησίου. Από το 1989 και μετά υπάρχει πληθώρα ιδεών και μεθόδων για την παρασκευή κιτρικού οξέος από ολεφινικές διόλες οι οποίες με αντίδραση με τετραοξείδιο δινιτρογόνου δίνουν κιτρικό οξύ (Apelblat et al., 2014).

Όμως αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι παραπάνω μέθοδοι χημικής σύνθεσης κιτρικού οξέος είναι πολυδάπανες, γιατί οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση του είναι πιο ακριβές από ότι το ίδιο το κιτρικό οξύ. Επίσης, λόγω του γεγονότος ότι η σύνθεση αποτελείται από πολλά στάδια, η απόδοση της συνολικής αντίδρασης είναι χαμηλή. Τέλος γίνεται και χρήση επικίνδυνων ενώσεων (π.χ. HCN), που μεγεθύνουν το πρόβλημα της βιομηχανικής σύνθεσης του κιτρικού οξέος (Kristiansen et al., 1998). Πέρα από αυτές τις κλασσικές μεθόδους χημικής σύνθεσης του κιτρικού οξέος, υπάρχουν και εναλλακτικοί τρόποι απόκτησής του, όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs, όπου το προϊόν προκύπτει με ενζυμική σύνθεση (Apelblat et al., 2014).

3.2.1.3 Χρήσεις κιτρικού οξέος

Το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται στην παρασκευή τροφίμων, γλυκισμάτων, ποτών καθώς και στον φαρμακευτικό τομέα, και γενικά είναι συστατικό που βρίσκει εφαρμογές σε πολλές βιομηχανίες. Ο τρόπος που θα το διαχειριστεί κάθε βιομηχανία, εξαρτάται από τα τρία βασικά του χαρακτηριστικά που είναι η οξύτητά του, η γεύση του και η ικανότητά του να σχηματίζει άλατα. Το κιτρικό οξύ μπορεί να σχηματίσει πολλά μεταλλικά άλατα σχηματίζοντας σύμπλοκα με χαλκό, σίδηρο, μαγγάνιο, μαγνήσιο και ασβέστιο. Έτσι μια ευρέως διαδεδομένη χρήση του είναι να χορηγείται σε ασθενείς ως αντιπηκτικό ή συντηρητικό του αίματος, αφού λειτουργεί ως συμπλοκοποιητής. Επίσης λειτουργεί ως καλό αντιοξειδωτικό σε λίπη και έλαια, όπου μειώνει την πιθανότητα οξείδωσής τους, η οποία γίνεται παρουσία μετάλλων όπως ο σίδηρος. Επιπλέον, είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα ενισχυτικά γεύσης και αρώματος. Τέλος, τα τελευταία χρόνια, έχει χρήση και για περιβαλλοντικό σκοπό, αφού χρησιμοποιείται για να απομακρυνθεί το διοξείδιο του θείου, που είναι τοξικό, από τα καυσαέρια. Έτσι, το κιτρικό οξύ, σχηματίζει συμπλοκο-ιόν, το οποίο αντιδρά με το υδρόθειο (H_2S) και δίνει μόριο θείου. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται οι πιο βασικές χρήσεις του κιτρικού οξέος (Kristiansen et al., 1998).

Πίνακας 3.2: Χρήσεις κιτρικού οξέος σε τομείς όπως τα τρόφιμα, η φαρμακευτική και βιομηχανία παραγωγής (Kristiansen et al., 1998)

Τομέας	Ιδιότητα	Χρήση
Τρόφιμα		
Ποτά	Οξυντικό	Ενισχυτικό γεύσης
Γλυκά	Ενισχυτικό γεύσης	Οξυντικό
Λίπη και έλαια	Αντιοξειδωτικό	Συμπλοκοποίηση με μέταλλα
Κατεψυγμένα τρόφιμα	Αντιοξειδωτικό	Συντήρηση τροφίμου
Φαρμακευτική		
Αναβράζοντα δισκία	Οξύ	Ενισχυτικό γεύσης
Βιταμίνες	Αντιοξειδωτικό	
Αντιπηκτικά	Απομονώνει τις ουσίες που πήζουν το αίμα	Ρυθμιστής pH
Καλλυντικά	Ρυθμιστής	Αντιοξειδωτικό
Βιομηχανία		
Καθαρισμός μετάλλων	Απομονώνει τα μέταλλα, κάνοντας σύμπλοκα	
Απορρυπαντικά	Ρυθμιστής pH	

3.2.1.4 Χρήση κιτρικού οξέος στη βιομηχανία τροφίμων

Η τιμή του pH των τροφίμων επηρεάζεται αρκετά από πολλούς παράγοντες όπως η μικροβιακή ανάπτυξη και η διαχείριση που έχει το τρόφιμο κατά την επεξεργασία, όπως η προσθήκη οξέων είτε για ζύμωση, είτε για χρήση ως συντηρητικό του τροφίμου. Οξέα όπως είναι το κιτρικό οξύ, που βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε φρούτα και λαχανικά, επηρεάζουν την οξύτητά τους. Για την επεξεργασία των τροφίμων, η χρήση των οξέων χαμηλής τιμής pH, έχει ως στόχο είτε να φθάσει το τρόφιμο σε μια ικανοποιητική οξύτητα, είτε να λειτουργεί ως συντηρητικό, δηλαδή να περιορίζει τη μικροβιακή δράση. Από την άλλη, οι ουσίες υψηλής τιμής pH δεν

χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα στη βιομηχανία για επεξεργασία, όμως έχουν την ικανότητα να συμβάλλουν στην μικροβιολογική σταθερότητα.

Οποιαδήποτε αλλαγή στο περιβάλλον ανάπτυξης του μικροοργανισμού μπορεί να προκαλέσει μικρές ή μεγάλες αλλαγές στην πορεία του, από το να αυξήσει ή να μειώσει τον ρυθμό ανάπτυξής του μέχρι να τον απενεργοποιήσει πλήρως και να τον θανατώσει. Για να επηρεάσει η τιμή του pH την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και κυρίως τους παθογόνους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στα τρόφιμα, απαιτείται η χρήση ουσιών με ιδιαίτερα χαμηλή τιμή pH. Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες σχετικά με την επίδραση της τιμής του pH στη μικροβιακή ανάπτυξη και στην αλλοίωση του τροφίμου. Παρακάτω φαίνονται τιμές pH όπου αναπτύσσονται κάποιοι βασικοί μικροοργανισμοί στα τρόφιμα (Lund et al., 2000).

Πίνακας 3.3: Εύρος pH που αναπτύσσονται βασικοί μικροοργανισμοί τροφίμων

Μικροοργανισμός	Ελάχιστο pH για ανάπτυξή του	Μέγιστο pH για ανάπτυξή του
Acetobacter spp.	4.5	9.0
Bacillus acidocaldarius	2.5	5.5
Lactobacillus acetotolerans	3.3	6.3-6.8
Pseudomonas	4.4	
Clostridium botulinum	4.6	
Escherichia coli	4.4	9.0
Salmonella spp.	3.8	9.5
Staphylococcus aureus	4.0	10

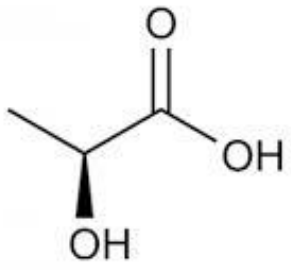
Ο μηχανισμός δράσης του κιτρικού οξέος και κατ' επέκταση των περισσότερων οργανικών οξέων προς τους μικροοργανισμούς είναι ο εξής. Το κιτρικό οξύ, όταν βρεθεί σε επαφή με το τρόφιμο προς επεξεργασία, μπορεί να εισχωρήσει στα κύτταρα των μικροοργανισμών μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Έπειτα, θα ιοντιστεί, και το θετικό κομμάτι του που είναι τα ιόντα υδρογόνου, θα μειώσουν το pH στο εσωτερικό του κυττάρου και έτσι θα μεταβληθεί η πορεία ανάπτυξης των μικροοργανισμών ή ακόμη και θα σταματήσει (Hill et al., 1995). Το αρνητικό τμήμα

του μορίου που είναι το ανιοντικό μέρος του κιτρικού οξέος, θα συσσωρευθεί στο κύτταρο και θα σταματήσει πολλές μεταβολικές λειτουργίες του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να θανατωθούν πλήρως οι μικροοργανισμοί (Hall et al., 1995).

3.2.2 Γαλακτικό οξύ

3.2.2.1 Γενικά

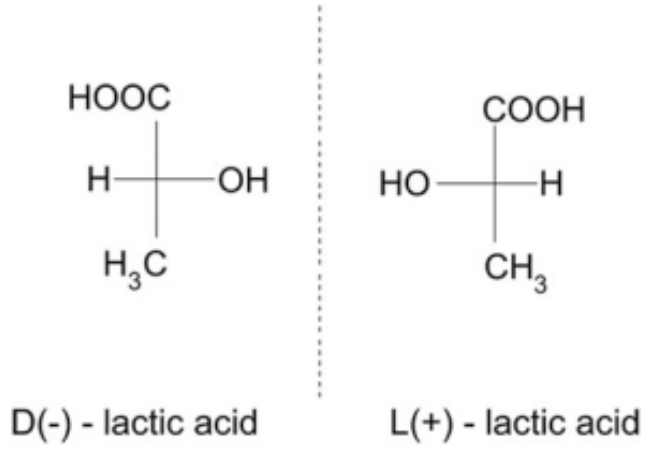
Το γαλακτικό οξύ είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα οργανικά οξέα που χρησιμοποιείται σε εργαστηριακό και βιομηχανικό επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων και των βιομηχανιών τροφίμων. Έχει συντακτικό τύπο $CH_3CH(OH)CO_2H$ ή $C_3H_6O_3$. Οι χημικές και οι φυσικές του ιδιότητες είναι αυτές που το καθιστούν ένα ιδανικό συστατικό για εργαστηριακή χρήση. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο ισομερή (το L-γαλακτικό οξύ και το D-γαλακτικό οξύ), που ως μείγμα, μπορεί να λειτουργήσει ως ρυθμιστής οξύτητας σε κάποια τρόφιμα με σκοπό να απενεργοποιήσει ή και να θανατώσει μικροοργανισμούς ευαίσθητους στις αντίστοιχες τιμές pH.



Εικόνα 3.7: Χημικός τύπος γαλακτικού οξέος

Το ανεπεξέργαστο γαλακτικό οξύ είναι άχρωμο και άοσμο υδροσκοπικό υγρό με ήπια όξινη γεύση . Ο χημικός του τύπος αποτελείται από μια αλυσίδα άνθρακα, με ένα κεντρικό χειρόμορφο άτομο και δύο άτομα άνθρακα στις άκρες. Μια ομάδα υδροξυλίου συνδέεται με το κεντρικό άτομο άνθρακα, ενώ ένας από τους άνθρακες στην άκρη είναι μέρος καρβοξυλίου και αντίστοιχα ο άλλος είναι μέρος μεθυλίου. Δεν συμπεριλαμβάνεται στα δραστικά οξέα γιατί έχει μερική διάσταση στο νερό (pK_a=3.86). Το μοριακό του βάρος είναι 90.08 g/mol. Έχει σημείο βρασμού τους 122^oC και σημείο τήξεως 17^oC.

Υπάρχουν δύο οπτικά ενεργές ισομερείς μορφές του γαλακτικού οξέος, το L(+)-γαλακτικό οξύ και το D(-)-γαλακτικό οξύ. Το L-γαλακτικό οξύ είναι το βιολογικό ισομερές και βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα. Με ανάμειξη των δύο ισομερών προκύπτει ένα λευκό άνυδρο κρυσταλλικό στερεό με χαμηλό σημείο τήξεως (Ameen & Caruso, 2000). Τα δύο αυτά ισομερή, συνήθως συντίθενται με ζύμωση με τη βοήθεια κατάλληλων μικροοργανισμών (Jiménez et al., 2014).



Εικόνα 3.8: Τα δύο ισομερή του γαλακτικού οξέος (D και L) (Ameen & Caruso, 2000)

3.2.2.2 Σύνθεση γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ, μπορεί να παραχθεί με διάφορους τρόπους, είτε με χημική αντίδραση, είτε με μικροβιακή σύνθεση. Οι πρώτες δύο μέθοδοι αφορούν στην χημική σύνθεση, ενώ η τελευταία στη μικροβιακή.

- **Υδρόλυση παραγώγων του γαλακτικού οξέος.** Το γαλακτικό οξύ μπορεί εύκολα να παραχθεί από τα παράγωγά του με συγκεκριμένες τεχνικές. Μια αρκετά διαδεδομένη ουσία για την παραπάνω χημική σύνθεση είναι το λακτονιτρίλιο ($CH_3CHOHCN$).

  Αρχικά, το λακτονιτρίλιο παράγεται από την αντίδραση μεταξύ υδροκυανίου (HCN) και αιθανάλης (CH_3CHO) σε αλκαλικό περιβάλλον και κάτω από συνθήκες υψηλής πίεσης. Έπειτα, το προϊόν που προκύπτει, χρειάζεται να αντιδράσει με ένα ισχυρό οξύ, όπως το θειικό οξύ (H_2SO_4), έτσι ώστε να παραχθεί το γαλακτικό οξύ το οποίο είναι ακατέργαστο και θα πρέπει να

συμπυκνωθεί και να καθαριστεί. Έτσι χρησιμοποιείται μεθανόλη (CH_3OH) η οποία παράγει έναν γαλακτικό εστέρα μεθυλίου. Ο εστέρας καθαρίζεται με απόσταξη και υδρολύεται με υδατικό οξικό διάλυμα προς γαλακτικό οξύ. Η μεθανόλη ανακτάται με τον ίδιο τρόπο.

Η διαδικασία παραγωγής γαλακτικού οξέος από το λακτονιτρίλιο φαίνεται παρακάτω.

$$HCN + CH_3CHO \xrightarrow{\text{αλκαλικό διάλυμα}} H_3C - CHOH - CN \ (\mathbf{1})$$

$$CH_3CH(OH)CN + H_2O + \frac{1}{2}H_2SO_4 \xrightarrow{\text{υδρόλυση}} CH_3CH(OH)COOH + \frac{1}{2}(NH_4)_2SO_4 \ (\mathbf{2})$$

$$CH_3CH(OH)COOH + CH_3OH \xrightarrow{\text{εστεροποίηση}} CH_3CH(OH)COOCH_3 + H_2O \ (\mathbf{3})$$

$$CH_3CH(OH)COOCH_3 + H_2O \xrightarrow{\text{υδρόλυση}} CH_3CH(OH)COOH + CH_3OH \ (\mathbf{4})$$

- **Οξείδωση προπανίου με χρήση νιτρικού οξέος.** Πρόκειται για μια άλλη μέθοδο παραγωγής γαλακτικού οξέος από προπάνιο ($CH_3CH_2CH_3$). Το αλκάνιο οξειδώνεται με HNO_3 παρουσία οξυγόνου και προκύπτει ένα αμινοξύ, το οποίο με υδρόλυση παράγει γαλακτικό οξύ (Ameen & Caruso, 2000).

$$CH_3CH_2CH_3 + HNO_3 \xrightarrow{O_2} CH_3CHCNO_2COOH \ (\mathbf{1})$$

$$CH_3CHCNO_2COOH + H_2O \xrightarrow{\text{υδρόλυση}} CH_3CH(OH)COOH + HNO_3 \ (\mathbf{2})$$

- **Ζύμωση με γαλακτικά βακτήρια.** Αυτή είναι μια μέθοδος μικροβιακής σύνθεσης γαλακτικού οξέος από μικροοργανισμούς. Η ζύμωση είναι μια βιοχημική διαδικασία στην οποία μόρια υδατανθράκων (π.χ. γλυκόζη) μετατρέπονται με την βοήθεια μικροοργανισμών σε ενέργεια, γαλακτικό οξύ και άλλα υποπροϊόντα ανάλογα με το είδος του γαλακτικού βακτηρίου (Ameen & Caruso, 2000). Τα περισσότερα γαλακτικά βακτήρια παράγουν L-γαλακτικό οξύ, ενώ η μειοψηφία παράγει D-γαλακτικό οξύ (Jiménez et al., 2014). Υπάρχουν δύο βασικές διεργασίες της ζύμωσης. Στην πρώτη επικρατέστερο προϊόν είναι το γαλακτικό οξύ, και στη δεύτερη το τελικό προϊόν είναι μείγμα που αποτελείται από γαλακτικό οξύ, άλλα οργανικά οξέα και αιθυλική αλκοόλη (Ameen & Caruso, 2000).

3.2.2.3 Χρήσεις του γαλακτικού οξέος

Στις βιομηχανίες, και κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων, υπάρχει η ανάγκη να εφαρμόζονται μέθοδοι για τη συντήρηση των τροφίμων, και κυρίως των φρέσκων φρούτων και λαχανικών, των κρεάτων και των ιχθυηρών (Paramithiotis et al., 2017). Το γαλακτικό οξύ είναι ένα συστατικό που χρησιμοποιείται για ήπια επεξεργασία τροφίμων, έτσι ώστε να αυξηθεί ο χρόνος ζωής τους. Είναι μη πτητικό, άοσμο υγρό και χαρακτηρίζεται ως μια ασφαλή ουσία για να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο τροφίμων. Έχει ήπια όξινη γεύση και είναι πολύ καλό συντηρητικό. Τέλος χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικός παράγοντας του pH και ως αναστολέας της βακτηριακής αλλοίωσης στα τρόφιμα.

Μία νέα χρήση του γαλακτικού οξέος (κυρίως των αλάτων του) είναι ο καθαρισμός των θανατωμένων πουλερικών ή ιχθυηρών, όπου αυξάνεται ο χρόνος ζωής τους, αφού μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη κυρίως των αναερόβιων μικροοργανισμών όπως το *Clostridium botulinum*.

Επιπρόσθετα, μια άλλη χρήση του γαλατικού οξέος είναι ότι μπορεί να παράγει γαλακτωματοποιητές. Οι γαλακτωματοποιητές είναι εστέρες με το ένα άκρο του υδρόφιλο και το άλλο λιπόφιλο, που ο ρόλος τους είναι να ενώσουν δύο ουσίες που δεν αναμιγνύονται. Έτσι, οι εστέρες των λιπαρών οξέων παράγονται από ένα λιπαρό οξύ, όπως η γλυκερόλη, και ένα οργανικό οξύ, όπως το οξικό, το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ.

Επιπλέον, το γαλακτικό οξύ και τα παράγωγά του χρησιμοποιούνται κατά κόρον στον φαρμακευτικό τομέα, για παραγωγή καλλυντικών και ιδιαίτερα αλοιφών, λοσιόν, παρεντερικών διαλύματων και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών για ιατρικές εφαρμογές. Τα άλατά του έχουν σπουδαία χρήση στον ιατρικό κλάδο. Το άλας νατρίου του χρησιμεύει για παρεντερικές εφαρμογές και αιμοκάθαρση. Το άλας ασβεστίου του χρησιμοποιείται για θεραπεία ανεπάρκειας ασβεστίου και στην οδοντιατρική ως παράγοντας για αντιμετώπιση της τερηδόνας. Παράγωγα του όπως ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι ενεργό συστατικό σε πολλά παρασκευάσματα κατά της ακμής.

Τέλος, το γαλακτικό οξύ ως αντιδρών, μπορεί με διάφορες διαδικασίες να παράγει προϊόντα τα οποία είναι οικολογικά και χρήσιμα σε διάφορους τομείς. Στον παρακάτω πίνακα, με αρχικό συστατικό το γαλακτικό οξύ και με τους μηχανισμούς και τις αντιδράσεις που παρουσιάζονται, παράγονται μερικά από αυτά τα προϊόντα (Datta et al., 1995).

Πίνακας 3.4: Οικολογικά προϊόντα που παράγονται από γαλακτικό οξύ, καθώς και ο τρόπος παραγωγής τους

Μηχανισμός	**Προϊόντα**
Πολυμερισμός	Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή (πολυγαλακτικό οξύ)
Εστεροποιήση και καταλυτική αφυδάτωση	Προπυλενογλυκόλη
Καταλυτική αφυδάτωση	Ακρυλικό οξύ
Παράγωγα γαλακτικού οξέος	«Πράσινοι» διαλύτες

3.2.3 Εξυγίανση ιχθυηρών με χρήση οργανικών οξέων

Μια μορφή επεξεργασίας για να αυξηθεί ο χρόνος ζωής των ιχθυηρών, είναι η εμβάπτιση τους σε υδατικά διαλύματα οργανικών οξέων τα οποία σε κατάλληλες συγκεντρώσεις μπορούν να το πετύχουν. Έτσι, προτιμώνται οξέα τα οποία είναι χαμηλού μοριακού βάρους, μη τοξικά και εύκολα διαθέσιμα (García-Soto et al., 2014). Επίσης, η συγκέντρωση οξέος που θα χρησιμοποιηθεί για επεξεργασία πρέπει να είναι η κατάλληλη έτσι ώστε να μειώσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών του ιχθυηρού αλλά και να μην επηρεάσει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του (Sanjuás-Rey et al., 2011).

Έτσι σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναφορά (Farid et al., 1998), φιλέτα ιχθυηρού εμβαπτίσθηκαν σε διαφορετικά διαλύματα οργανικών οξέων (οξικού, κιτρικού, υδροχλωρικού, γαλακτικού, μηλικού και τρυγικού) έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν η μέθοδος εξυγίανσης αυξάνει το χρόνο ζωής τους. Τα κάθε διάλυμα είχε συγκέντρωση 2% και ο χρόνος εμβάπτισης ήταν 10 λεπτά και έπειτα αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Σύμφωνα με τη μικροβιολογική ανάλυση, παρουσιάσθηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα που εμβαπτίστηκαν στο οξύ σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα

δείγματα. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο στα δείγματα που είχαν εμβαπτιστεί στο HCl έλαβε μείωση της τάξης των 2 log(CFU/g). Μετά ακολουθεί το δείγμα εμβαπτισμένο σε μηλικό οξύ με μείωση έως 1.2 logCFU/g.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναφορά (Sallam, 2007), φιλέτα ιχθυηρού εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα οξικού, γαλακτικού και κιτρικού νατρίου 2.5% το καθένα για 10 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους 1°C. Παρατηρήθηκε μικρή μείωση της τιμής του pH μεταξύ των επεξεργασμένων με οξέα και των ανεπεξέργαστων δειγμάτων από την πρώτη μέτρηση, της τάξης 0,13 μονάδες για το δείγμα που έχει εμβαπτιστεί στο οξικό νάτριο. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια αποθήκευσης όλων των δειγμάτων παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του pH, η οποία είναι πιο έντονη στα ανεπεξέργαστα δείγματα σε σχέση με τα φιλέτα που έχουν εμβαπτισθεί στα οργανικά οξέα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναφορά (Farid et al., 1998), σε φιλέτα που εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα οξέος 2.5% (οξικό, κιτρικό, υδροχλωρικό, γαλακτικό, μηλικό και τρυγικό) παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του L σε σχέση με το δείγμα που εμβαπτίσθηκε στο νερό, δηλαδή τα φιλέτα έγιναν πιο θαμπά και λευκά. Τη μεγαλύτερη αύξηση της τιμής του L την έλαβε το δείγμα στο οποίο έγινε επεξεργασία με κιτρικό οξύ και τη μικρότερη αύξηση το δείγμα στο οποίο έγινε επεξεργασία με μηλικό οξύ.

4 Πειραματικό Μέρος - Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Εισαγωγή

Από τη βιβλιογραφική μελέτη που παρουσιάστηκε στα προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, φαίνεται η σημαντικότητα της επεξεργασίας των τροφίμων και πιο συγκεκριμένα των ιχθυηρών με σκοπό την επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Τα ιχθυηρά είναι τρόφιμα τα οποία έχουν υψηλή θέση στην προτίμηση των καταναλωτών λόγω των πολλών θρεπτικών στοιχείων που παρέχουν. Όμως, είναι μια κατηγορία τροφίμων που αλλοιώνεται πολύ εύκολα και ανήκουν στα ιδιαίτερα ευπαθή τρόφιμα. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα καθαρισμένα και φιλεταρισμένα ιχθυηρά, τα οποία έχουν υποστεί ήδη μια μορφή επεξεργασίας άρα έχουν υψηλότερο αρχικό μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τα ολόκληρα. Έτσι, με χρήση διάφορων ενναλακτικών μεθόδων επεξεργασίας, πέρα από την κλασσική συντήρηση, όπως είναι η χρήση της μη θερμικής διεργασίας της Υπερυψηλής Πίεσης και άλλων μεθόδων εξυγίανσης όπως είναι η εμβάπτιση του ιχθυηρού σε νερό και διαλύματα κιτρικού ή γαλακτικού οξέος, μελετάται η δραστικότητα των μεθόδων και κατά πόσο μπορεί να επεκταθεί ο χρόνος ζωής του ιχθυηρού.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εφαρμογή των μεθόδων της Υπερυψηλής Πίεσης και της εξυγίανσης με νερό και με διαλύματα γαλακτικού και κιτρικού οξέος διαφόρων συγκεντρώσεων καθώς και ο συνδυασμός των μεθόδων, που έχουν ως στόχο την επέκταση του χρόνου ζωής φιλέτων λαβρακιού. Ο προσδιορισμός της διατηρησιμότητας έγινε μέσω της μικροβιακής ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, έγινε μικροβιακή ανάλυση σε διαδοχικές μέρες σε φιλέτα λαβρακιού, τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 0±0.4^{o}C και είχε γίνει χρήση των παρακάτω μεθόδων: επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση, εξυγίανση με νερό και με διαλύματα κιτρικού ή γαλακτικού οξέος σε διάφορες συγκεντρώσεις καθώς και η συνδυαστική επεξεργασία. Τέλος, πέρα από την μικροβιολογική ανάλυση, έγινε και μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους όπως η μέτρηση της υφής, του χρώματος, της τιμής του pH, και της οξείδωσης των λιπαρών και πως όλα αυτά μεταβάλλονται.

4.2 Πειραματικός Σχεδιασμός

Όπως ήδη αναφέρθηκε, αντικείμενο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η εφαρμογή των μεθόδων της Υπερυψηλής Πίεσης και της εξυγίανσης με νερό και διαλύματα κιτρικού και γαλακτικού οξέος διαφόρων συγκεντρώσεων καθώς και ο συνδυασμός των μεθόδων, σε φιλέτα λαβρακιού αποθηκευμένα στους 0±0.4^{o}C. Μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας στο χρόνο ζωής τους καθώς και οι μικροβιολογικές και φυσικοχημικές μεταβολές τους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης, ποιοτικά και ποσοτικά. Επομένως, σε ένα μέρος από το σύνολο των δειγμάτων έγινε εξυγίανση με νερό και με διαλύματα κιτρικού και γαλακτικού οξέος. Έγινε επιλογή των δύο συγκεκριμένων οξέων γιατί χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστατικά τροφίμων. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα τόσο κιτρικού όσο και γαλακτικού οξέος, συγκεντρώσεων 200, 800, 1200, 1500, 1800 και 7500 ppm καθώς και καθαρό νερό και έγινε εμβάπτιση των φιλέτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στα δείγματα προσδιορίσθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροβιακού φορτίου των φιλέτων λαβρακιού (Ολική μεσόφιλη χλωρίδα, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta,* ζύμες/μύκητες, *Enterobacteriaceae* spp. και βακτηρίων που παράγουν H_2S) καθώς και η μεταβολή της τιμής του pH, του χρώματος, της υφής και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων.

Στα υπόλοιπα δείγματα, έγινε εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης. Συγκεκριμένα, τα φιλέτα λαβρακιού υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση σε συνθήκες 300 MPa και 25°C για 5 λεπτά, αφού πρώτα συσκευάσθηκαν σε συνθήκες κενού προκειμένου να επιτευχθεί ομοιόμορφη μεταφορά της πίεσης στο τρόφιμο. Κάποια δείγματα υποβλήθηκαν σε συνδυαστική επεξεργασία με εξυγίανση με διάλυμα κιτρικού οξέος 200 και 7500ppm και γαλακτικού οξέος 7500ppm για 10 λεπτά και με χρήση Υπερυψηλής Πίεσης (300MPa - 5 λεπτά), με σκοπό να μελετηθεί πιθανή συνεργιστική δράση των δύο διαφορετικών μεθόδων έναντι της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση της επιμήκυνσης του χρόνου ζωής των φιλέτων. Στα δείγματα αυτά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έγινε μικροβιολογική ανάλυση, μελέτη της μεταβολής της τιμής του pH, του χρώματος, της υφής καθώς και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης των φιλέτων λαβρακιού στους 0±0.4^{o}C.

4.3 Πειραματική Διαδικασία

4.3.1 Παραλαβή νωπών φιλέτων λαβρακιού

Ολόκληρα λαβράκια αλιεύτηκαν από Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια, φιλετοποιήθηκαν από εταιρεία παραγωγής ιχθυηρών και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Η παραλαβή έγινε μία ή δύο μέρες μετά την αλίευσή τους. Τα φιλέτα φέρονταν σε κιβώτια από πολυστυρένιο τα οποία είχαν επαρκή ποσότητα πάγου. Τέλος, μια μεμβράνη τοποθετήθηκε στο πάνω και στο κάτω μέρος του κιβωτίου, για την αποφυγή τραυματισμού των φιλέτων από τον πάγο.

4.3.2 Εξυγίανση νωπών φιλέτων λαβρακιού

Σε 4 κύκλους πειραμάτων τα φιλέτα εμβαπτίσθηκαν για 10 λεπτά σε διαλύματα καθαρού νερού (Water), κιτρικού οξέος συγκέντρωσης 200, 800, 1200, 1500, 1800 και 7500 ppm (Citric200, 800, 1200, 1500, 1800 και 7500 αντίστοιχα) και γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 200, 800, 1500 και 7500 ppm (Lactic200, 800, 1500 και 7500 αντίστοιχα). Από το σύνολο των δειγμάτων Citric200, Citric7500 και Lactic7500, ένα μέρος υποβλήθηκε σε επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση για να μελετηθεί πιθανή συνεργιστική δράση.

Σε κάθε κύκλο πειραμάτων μελετήθηκαν και αναλύθηκαν και τα αντίστοιχα ανεπεξέργαστα δείγματα (δείγματα Control).

4.3.3 Συσκευασία και αποθήκευση των φιλέτων λαβρακιού

Αφού ολοκληρώθηκε η εξυγίανση, τα φιλέτα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες με υψηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο, οι οποίες δεν σφραγίσθηκαν προκειμένου το τρόφιμο να βρίσκεται σε αερόβιες συνθήκες. Τα φιλέτα τα οποία μεταφέρθηκαν στην μονάδα Υπερυψηλής Πίεσης συσκευάσθηκαν υπό κενό σε σακούλα από πολυστρωματικό υλικό πολυαιθυλενίου-αλουμινίου-πολυπροπυλενίου, με το τελευταίο να είναι και το υλικό που έρχεται σε επαφή με το δείγμα. Για την αποφυγή επαφής των δειγμάτων με το μέσο συμπίεσης κατά την

εφαρμογή της Υπερυψηλής Πίεσης, τα δείγματα συσκευάσθηκαν πάλι υπό κενό σε δεύτερη συσκευασία.

Κατόπιν αποθηκεύτηκαν σε θαλάμους ψύξης σε θερμοκρασία 0±0.4^{o}C για να μελετηθεί η διατηρησιμότητά τους και να γίνει ο έλεγχος των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους. Η θερμοκρασία των θαλάμων ελέγχονταν με τη χρήση καταγραφικών θερμοκρασίας.

4.3.4 Επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η μονάδα Food Unit FPU 1.01 της εταιρείας Resato International BV (Roden, The Netherlands) που ανήκει στον εξοπλισμό του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π. και του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «ΔΗΜΗΤΡΑ» και λειτουργεί στις εγκαταστάσεις του τελευταίου στη Λυκόβρυση Αττικής.

Εικόνα 4.1: Η μονάδα της Υπερυψηλής Πίεσης του ιδρύματος ΕΘΙΑΓΕ. Στην πρώτη εικόνα, φαίνεται ολοκληρωμένη η μονάδα με τους δύο θαλάμους επεξεργασίας, τον μεγάλο των 1.5L , και τη συστοιχία των 6 μικρών κυλινδρικών θαλάμων των 42 mL. Στην δεύτερη εικόνα φαίνεται από μια καλύτερη οπτική ο μεγάλος θάλαμος ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα

Αποτελείται από τη γεννήτρια Υπερυψηλής Πίεσης που είναι συνδεδεμένη με δύο τύπους θαλάμων πίεσης. Ο πρώτος - και αυτός που χρησιμοποιήθηκε στη

συγκεκριμένη διπλωματική εργασία - αφορά μεγάλα και ογκώδη τρόφιμα και ο δεύτερος χρησιμοποιείται για μικρού μεγέθους δείγματα. Πιο αναλυτικά, ο πρώτος τύπος θαλάμου επεξεργασίας είναι κυλινδρικός χωρητικότητας 1.5L και ο δεύτερος αποτελείται από μια συστοιχία 6 μικρότερων κυλινδρικών θαλάμων 42mL ο καθένας, που μπορούν να λειτουργήσουν ανεξάρτητα. Όλοι οι θάλαμοι περιτριγυρίζονται από μονωτικά υλικά υψηλής ποιότητας ώστε να υπάρχει ασφάλεια ότι η θερμοκρασία και η πίεση είναι σταθερή κατά την επεξεργασία.

Το συγκεκριμένο σύστημα, το οποίο χαρακτηρίζεται ως πιλοτικό, λειτουργεί σε πιέσεις από 100 έως 1000MPa και έχει τη δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας από 0 έως 90°C. Ως μέσο μεταφοράς της πίεσης χρησιμοποιεί πολυγλυκόλη βαθμού ιξώδους κατά ISO 15. Το σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή που περιέχει ειδικά λογισμικά για την καταγραφή και τον έλεγχο της πίεσης και της θερμοκρασίας του συστήματος ανά 1-10 δευτερόλεπτα.

Κατά την εφαρμογή της Υπερυψηλής Πίεσης στα φιλέτα λαβρακιού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Τα συσκευασμένα υπό κενό φιλέτα τοποθετήθηκαν στον κύλινδρο του θαλάμου επεξεργασίας που είναι πληρωμένος με πολυγλυκόλη. Ο θάλαμος σφραγίσθηκε από το πώμα του και η μονάδα τέθηκε σε λειτουργία. Ελέγχοντας το λογισμικό και μόλις η πίεση στο θάλαμο έφθασε την επιθυμητή, ο θάλαμος απομονώθηκε με το κλείσιμο της βαλβίδας απομόνωσης και τα φιλέτα συμπιέσθηκαν για 5 λεπτά. Όταν πέρασε ο χρόνος της επεξεργασίας, ανοίχθηκε η βαλβίδα απομόνωσης, το σύστημα εκτονώθηκε και παραλήφθηκαν τα δείγματα μετά το άνοιγμα του θαλάμου.

Μετά το πέρας της διεργασίας, τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π., πραγματοποιήθηκε ασηπτική μεταφορά των δειγμάτων σε σακούλες υπό αερόβιες συνθήκες και αποθηκεύτηκαν στο θάλαμο ψύξης του εργαστηρίου στους 0±0.4^{o}C μέχρι να αναλυθούν.

Εικόνα 4.2: Φιλέτο λαβρακιού αμέσως μετά την επεξεργασία του με Υπερυψηλή Πίεση

4.4 Αναλυτικές μέθοδοι

4.4.1 Μικροβιακή ανάλυση

4.4.1.1 Γενικά

Για τον υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα φιλέτων λαβρακιού, ακολουθήθηκε η μέθοδος της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε τρυβλία. Τα στάδια που περιλαμβάνονταν στην μέθοδο ήταν η αποστείρωση των υποστρωμάτων και των εργαλείων που χρησιμοποιήθηκαν, η δειγματοληψία μαζί με την προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων, ο ενοφθαλμισμός στα τρυβλία και τέλος η επώαση τους και η καταμέτρηση των αποικιών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία προσδιορίσθηκαν:

- Η **Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα** (Total Viable Counts, TVC) σε υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA, Biolife, Italy)
- Οι **Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.)** σε επιλεκτικό υπόστρωμα Cetrimide Agar (CFC, Merck, Γερμανία)

- Ο μικροοργανισμός ***Brochothrix thermosphacta*** σε επιλεκτικό θρεπτικό υλικό Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar (STAA, Biolife, Italy)
- Οι **Ζύμες/Μύκητες** σε επιλεκτικό υπόστρωμα Rose Bengal Chloramphenicon Agar (RBC, Neogen, UK)
- Τα **Εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.)** σε επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Biolife, Italy)
- Τα **βακτήρια που παράγουν H_2S *(πχ. Shewanella putrefaciens)*** σε επιλεκτικό υπόστρωμα Lyngby Iron Agar (IA, Condalab, Ισπανία)

4.4.1.2 Αποστείρωση εργαλείων και υποστρωμάτων

Για κάθε μικροβιολογική ανάλυση ήταν απαραίτητο να αποστειρωθούν τα υποστρώματα, τα εργαλεία και ο χώρος εργασίας. Επομένως σε κλίβανο αποστείρωσης τοποθετήθηκαν τα υποστρώματα τα οποία προορίζονταν για την ενσωμάτωση στα τρυβλία, το αραιωτικό υγρό Ringer και tips δύο μεγεθών (1mL και 100μL). Όσον αφορά στο επιλεκτικό υπόστρωμα VRBG η αποστείρωσή του πραγματοποιείται κατά τον βρασμό του και δεν χρειάστηκε να τοποθετηθεί στον κλίβανο αποστείρωσης.

Η αποστείρωση πραγματοποιήθηκε σε αυτόκλειστο της εταιρείας Sanyo (LabAutoclave) σε θερμοκρασία 121°C για 15 λεπτά. Έπειτα, όλα τα θρεπτικά υλικά μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 50°C για να παραμείνουν ρευστά, ενώ τα υπόλοιπα υλικά τοποθετήθηκαν μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (MN 120, NUVE, Τουρκία) όπου και πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων.

4.4.1.3 Δειγματοληψία

Έπειτα ακολούθησε η δειγματοληψία των φιλέτων λαβρακιού. Από το μέρος της ράχης και κοιλιάς λήφθηκαν 10g δείγματος με τη χρήση λαβίδας και μαχαιριού. Το δείγμα τοποθετήθηκε μέσα σε αποστειρωμένη πλαστική σακούλα και μετά προστέθηκαν 90g ορού Ringer (αραίωση 1:10 ή 10^{-1}). Το μείγμα ομογενοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη χρήση Stomacher (Interscience, Ιταλία) για 1

λεπτό. Με αυτόν τον τρόπο το μικροβιακό φορτίο από το δείγμα του φιλέτου διαχύθηκε στον ορό.

4.4.1.4 Τεχνική διαδοχικών αραιώσεων

Πριν την επίστρωση ή την ενσωμάτωση του δείγματος στα υποστρώματα, ήταν απαραίτητο να προετοιμαστούν οι διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού μικροβιακού φορτίου. Συνηθίζεται να γίνεται για κάθε δείγμα 2 ή 3 διαδοχικές αραιώσεις ανάλογα το υπόστρωμα. Σε κάθε δειγματοληψία οι επιθυμητές αραιώσεις εξαρτώνται από τις συνθήκες επεξεργασίας και τον χρόνο αποθήκευσης του κάθε δείγματος.

Κατά τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν 9mL ορού Ringer για κάθε αραίωση που χρειάζεται πέρα από την πρώτη, με αυτή να είναι το μείγμα που είχε ομογενοποιηθεί στο Stomacher. Από το ομογενοποιημένο μείγμα λήφθηκε 1mL και τοποθετήθηκε στον δοκιμαστικό σωλήνα των 9mL Ringer με πολύ καλή ανάδευση έτσι ώστε να το μικροβιακό φορτίο να διαχυθεί σε όλο το υγρό ($2^{η}$ αραίωση ή 10^{-2} ή 1:100). Από αυτόν λήφθηκε 1mL και προστέθηκε σε επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα των 9mL Ringer ($3^{η}$ αραίωση ή 10^{-3} ή 1:1000). Η ίδια διαδικασία συνεχίστηκε έως ότου επιτευχθούν οι απαραίτητες αραιώσεις που απαιτεί η δειγματοληψία.

4.4.1.5 Επίστρωση – Ενσωμάτωση δειγμάτων στα υποστρώματα

Έπειτα από την προετοιμασία των δεκαδικών διαδοχικών αραιώσεων προετοιμάσθηκαν τα υποστρώματα. Σε αυτό το στάδιο υπάρχουν δύο διαφορετικές διαδικασίες ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών που πρόκειται να μελετηθούν: καλλιέργεια σε αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες. Υπό αερόβιες συνθήκες αναπτύσσονται η ολική μεσόφιλη χλωρίδα, οι ψευδομονάδες, ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta,* καθώς και οι ζύμες/μύκητες. Αντίθετα, υπό αναερόβιες συνθήκες αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί *Enterobacteriaceae* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H_2S (π.χ. *Shewanella putrefaciens*).

- **Μέθοδος της επίστρωσης**. Για τις αερόβιες καλλιέργειες, ποσότητα από 10mL από το θρεπτικό υλικό διανεμήθηκε στα τρυβλία και αφέθηκε να

στερεοποιηθεί. Λήφθηκαν από κάθε αραίωση 100μL, ενοφθαλμίστηκαν στο αντίστοιχο υπόστρωμα και απλώθηκαν σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση ελαστικού πολυμερικού ραβδίου με κυκλική απόληξη. Έτσι το εμβόλιο επιστρώθηκε σε όλο το θρεπτικό υπόστρωμα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλες τις αραιώσεις και πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις ανά αραίωση.

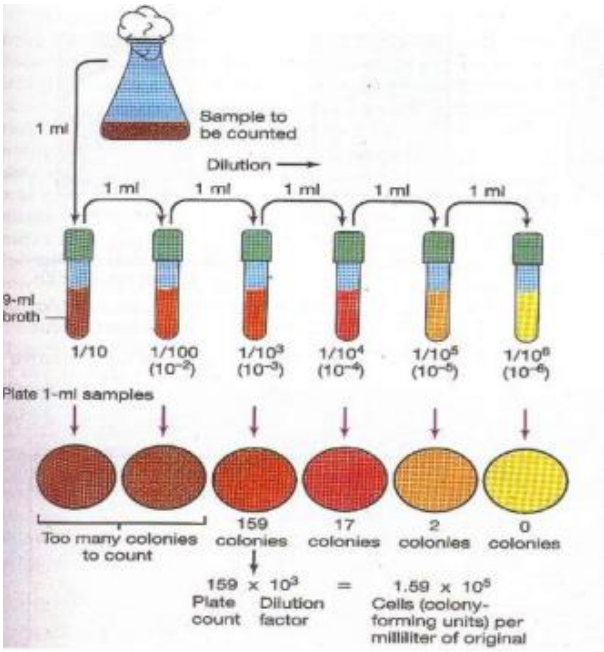
- **Μέθοδος της ενσωμάτωσης**. Όσον αφορά στις αναερόβιες καλλιέργειες, λήφθηκαν από κάθε αραίωση 1mL δείγματος και τοποθετήθηκαν σε ένα άδειο τρυβλίο και έπειτα 10mL υποστρώματος κάλυψε την επιφάνεια του τρυβλίου. Το τρυβλίο ανακινήθηκε καλά έτσι ώστε το υγρό διάλυμα και το υπόστρωμα να ομογενοποιηθούν και η ανάπτυξη των μικροβίων να γίνει σε όλη την έκταση του τρυβλίου. Η θερμοκρασία του υποστρώματος έπρεπε να είναι 50-60°C, έτσι ώστε να μην θανατωθούν οι μικροοργανισμοί της καλλιέργειας. Το ομογενές μείγμα δείγματος-υποστρώματος αφέθηκε να στερεοποιηθεί και ακολουθήσε δεύτερη επίστρωση από το υπόστρωμα έτσι ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της πρώτης.

4.4.1.6 Επώαση και καταμέτρηση αποικιών

Μετά τον εμβολιασμό του δείγματος στο υπόστρωμα, οι μικροοργανισμοί ανάλογα τη θερμοκρασία ανάπτυξής τους αφέθηκαν να επωαστούν. Το PCA, το CFC, το STAA, το RBC και το Iron Agar αποθηκεύτηκαν στους 25°C, ενώ το VRBG στους 37°C. Οι χρόνοι επώασης ήταν οι εξής:

- 72h για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα, τις ζύμες/μύκητες, και τα βακτήρια που παράγουν H_2S (π.χ. *Shewanella putrefaciens*)
- 48h για τις ψευδομονάδες και τον μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta*
- 18-24h για τα εντεροβακτήρια

Μετά την επώαση καταμετρήθηκαν οι αναπτυσσόμενες αποικίες. Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε σε μία αραίωση, τέτοια ώστε να υπάρχουν 20-200 αποικίες ανά τρυβλίο.



Εικόνα 4.3: Διαδικασία μικροβιακής ανάπτυξης που περιλαμβάνει την αποστείρωση των υποστρωμάτων, τις διαδοχικές αραιώσεις, τον εμβολιασμό στο υπόστρωμα και η επώαση και καταμέτρηση των αποικιών

4.4.2 Μέτρηση pH

Η μέτρηση των τιμών του pH πραγματοποιήθηκε με χρήση μιας συσκευής μέτρησης pH (pH-meter 338, AMEL Instruments, Milan, Italy). Η μέτρηση έγινε στο ομογενοποιημένο διάλυμα της αραίωσης 1:10. Για τη λήψη της μέτρησης το γυάλινο ηλεκτρόδιο 12mm βυθίστηκε και καταγράφθηκε η ένδειξη της τιμής. Επαναλήφθηκε η διαδικασία για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η μέτρηση του pH γίνονταν πάντα μετά τη μικροβιολογική ανάλυση, για να μην μολυνθεί το δείγμα.

Εικόνα 4.4: Συσκευή μέτρησης pH pH-meter 338, AMEL Instruments

4.4.3 Μέτρηση χρώματος

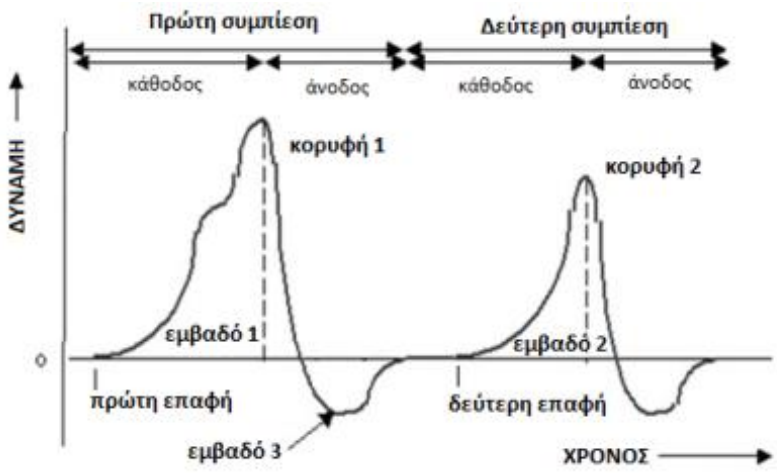
Επίσης μετρήθηκαν και οι παράμετροι του χρώματος του φιλέτου λαβρακιού, για να παρατηρηθεί ο ρυθμός που αλλοιώθηκε αυτό το χαρακτηριστικό κατά την αποθήκευση του. Η μετρήσεις των τιμών του χρώματος έγιναν με το χρωματόμετρο Minolta CR-200 (Minolta Company, Ιαπωνία). Πριν από κάθε μέτρηση γίνεται βαθμονόμηση του οργάνου με τη λευκή πλάκα βαθμονόμησης (L=97.5, a=-0.31, b=-3.83). Η μέτρηση έγινε στην εσωτερική πλευρά των φιλέτων σε δύο σημεία στην αρχή του φιλέτου και στη μέση, και η κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε δύο φορές. Με βάση τα παραπάνω, λαμβάνεται η τιμή του χρώματος E η οποία δίνεται από τον τύπο:

$$E = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2}$$

4.4.4 Μέτρηση υφής

Για την μέτρηση της υφής των φιλέτων λαβρακιού, χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής υφής TA.XT2i (Stable Micro Systems, Ηνωμένο Βασίλειο). Ο αναλυτής ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος έχει το απαραίτητο λογισμικό για την απεικόνιση των διαγραμμάτων (Exponent, Stable Micro Systems, Ηνωμένο Βασίλειο). Οι μετρήσεις σε κάθε δείγμα λήφθηκαν από την εσωτερική πλευρά του σε δύο σημεία ένα στην αρχή του φιλέτου και ένα στη μέση. Στο κάθε σημείο ο αναλυτής ήταν ρυθμισμένος να κάνει δύο κύκλους συμπίεσης με κυλινδρικό στέλεχος διαμέτρου 20mm, οι οποίοι παρομοιάζουν την διαδικασία της μάσησης. Από το γράφημα του αναλυτή υφής λήφθηκαν οι μετρήσεις για την σκληρότητα, η οποία ορίζεται ως η μέγιστη δύναμη που απαιτείται για να συμπιεστεί το τρόφιμο ανάμεσα στους γομφίους του στόματος. Με βάση το διάγραμμα η σκληρότητα ισούται με το ύψος της μέγιστης κορυφής (Ταούκης et al., 2019, Chandra & Shamasundar, 2015).

Παρακάτω φαίνεται ένα τυπικό διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση υφής ενός τροφίμου.



Εικόνα 4.5: Διάγραμμα ανάλυσης υφής (Ταούκης et al., 2019)

4.4.5 Προσδιορισμός οξείδωσης των λιπαρών (TBARS)

Η οξείδωση των λιπαρών προσδιορίσθηκε με την ανάλυση αντιδρώντων ουσιών με το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA). Η μέθοδος μετράει τη μηλονική αλδεΰδη (MDA) και βασίζεται στον προσδιορισμό του συμπλόκου που σχηματίζεται από την αντίδραση της MDA με το διάλυμα TBA (Løvaas, 1992). Σε ιχθυηρά άριστης ποιότητας, η τιμή TBA είναι μικρότερη των 3mg MDA/kg προϊόντος, και σε καλής ποιότητας ιχθυηρά η τιμή είναι μεταξύ 3-5mg MDA/kg προϊόντος. Τα όρια κατανάλωσης είναι 7-8mg MDA/kg προϊόντος (Cadun et al., 2005).

Αρχικά παρασκευάσθηκε το διάλυμα TBA: Διαλύθηκαν 0.375g TBA, 15g τριχλωρικού οξέος (TCA), 1.76mL HCL 12N σε 82.9mL H_2O. Το διάλυμα αναδεύθηκε για 50-60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα 10g δείγματος φιλέτου λαβρακιού από την περιοχή της ουράς πολτοποιήθηκαν με 30 mL απιονισμένο νερό και 1mL από το ομογενοποιημένο διάλυμα μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2mL του διαλύματος TBA και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 98°C για 15 λεπτά και στην συνέχεια αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά στους 5°C, λήφθηκε το υπερδιήθημα και τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο στα 532nm.

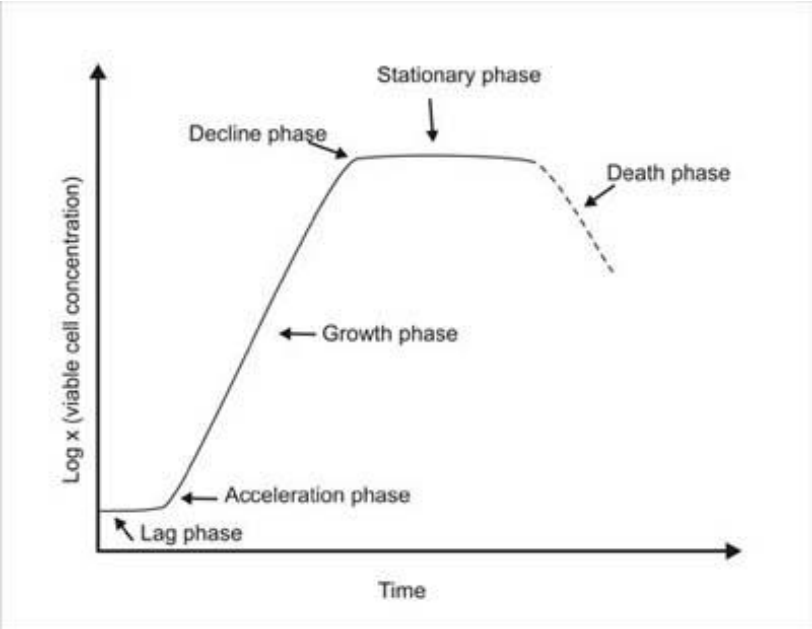
4.5 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

4.5.1 Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης

Όταν ο κάθε μικροοργανισμός βρεθεί σε περιβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξή του, με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό και την ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης, πολλαπλασιάζεται με μια συγκεκριμένη κινητική ανάπτυξης που μπορεί να αποτυπωθεί από την τυπική καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης η οποία αποτελείται από τέσσερις συγκεκριμένες φάσεις. Αυτές οι φάσεις είναι κατά χρονολογική σειρά οι παρακάτω:

- Λανθάνουσα φάση
- Εκθετική φάση
- Φάση στασιμότητας
- Φάση θανάτου

Οι φάσεις φαίνονται αναλυτικά στο παρακάτω διάγραμμα που είναι η κλασσική καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών:



Εικόνα 4.6: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών

Όπως αποτυπώνεται και στο διάγραμμα, στην αρχή της καμπύλης υπάρχει ένας σχεδόν σταθερός ρυθμός ανάπτυξης και έπειτα ξεκινάει ο κυτταρικός

πολλαπλασιασμός. Έτσι λοιπόν, στην λανθάνουσα φάση τα κύτταρα προσαρμόζονται στο περιβάλλον τους και για αυτό εκείνη τη χρονική περίοδο υπάρχει σχεδόν μηδενικός ρυθμός ανάπτυξης. Στην εκθετική φάση, τα κύτταρα του μικροοργανισμού αναπτύσσονται ραγδαία με εκθετικό ρυθμό και καταναλώνουν τα θρεπτικά συστατικά του υλικού ανάπτυξής του. Σε αυτή τη φάση η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων έχει ως στόχο την παραγωγή καινούργιων κυττάρων, έτσι ώστε να επιτευχθεί η δημιουργία αποικιών. Από ένα σημείο και έπειτα, η συσσώρευση των μεταβολιτών είναι τόσο μεγάλη που ο ρυθμός ανάπτυξης αρχίζει και μειώνεται μέχρι που φθάνει σε μηδενικά επίπεδα (φάση στασιμότητας). Η διάρκεια αυτής της φάσης εξαρτάται από το μικροοργανισμό και την ανάπτυξή του. Στη φάση αυτή, απελευθερώνονται τοξίνες από τους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα τη θανάτωση τους και όσο περνάει ο χρόνος ο ρυθμός της θανάτωσης των μικροοργανισμών είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό ανάπτυξής τους με αποτέλεσμα την πτώση της καμπύλης (φάση θανάτου) (Ταούκης et al., 2019).

4.5.2 Υπολογισμός μικροβιακού φορτίου

Μετά την επώαση των μικροοργανισμών στα τρυβλία στην απαιτούμενη θερμοκρασία, μετρούνται οι αποικίες του κάθε δείγματος για τον κάθε διαφορετικό μικροοργανισμό στην αραίωση όπου εμφανίζονται 20-200 αποικίες. Για τους αερόβιους μικροοργανισμούς τα δεδομένα προκύπτουν στο 0.1mL διαλύματος και για τους αναερόβιους στο 1mL διαλύματος. Επιπλέον οι μετρήσεις πρέπει να αναχθούν στην μηδενική αραίωση και για ποσότητα 1g (γίνεται παραδοχή 1mL=1g). Λαμβάνοντας υπόψη ότι πρέπει να υπολογισθεί ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων για κάθε δείγμα στην συγκεκριμένη αραίωση που θα κριθεί κατάλληλη προκύπτουν οι παρακάτω εξισώσεις για τον υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου:

- Για τους αερόβιους μικροοργανισμούς:

$$logN = \log(\alpha\rho\iota\theta\mu\acute{o}\varsigma\ \alpha\pi o\iota\kappa\iota\acute{\omega}\nu) + \alpha\rho\iota\theta\mu\acute{o}\varsigma\ \alpha\rho\alpha\acute{\iota}\omega\sigma\eta\varsigma + 1$$

- Για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς:

$$logN = \log(\alpha\rho\iota\theta\mu\acute{o}\varsigma\ \alpha\pi o\iota\kappa\iota\acute{\omega}\nu) + \alpha\rho\iota\theta\mu\acute{o}\varsigma\ \alpha\rho\alpha\acute{\iota}\omega\sigma\eta\varsigma$$

Το μικροβιακό φορτίο εκφράζεται σε logCFU/g.

4.5.3 Υπολογιστικά μοντέλα ποιοτικής υποβάθμισης ιχθύων

4.5.3.1 Μοντέλο Monod

Υπάρχουν πολλά υπολογιστικά μοντέλα που περιγράφουν την μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα, τα οποία βασίζονται στην περιγραφή των σιγμοειδών καμπυλών ανάπτυξης μικροβίων. Το επικρατέστερο υπολογιστικό εργαλείο αποτελεί το μοντέλο Monod, το οποίο είναι ταυτόχρονα απλό αλλά ακριβές. Από την εξίσωση Monod υπολογίζεται ο χρόνος διατήρησης του τροφίμου, που είναι το επικρατές ζητούμενο. Η εξίσωση περιγράφεται παρακάτω:

$$Εξίσωση\ Monod : N = N_O \cdot e^{kt}\ (1)$$

όπου:

- N είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών τον χρόνο t (μετράται σε CFU/g)
- N_O είναι το αρχικό μικροβιακό φορτίο και
- k ο ρυθμός ανάπτυξης

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να πάρει και την παρακάτω μορφή:

$$logN = logN_O + k' \cdot t\ \ (2)$$

όπου k’ είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που ισούται με

$$k' = k \cdot loge$$

Έτσι, μπορεί να υπολογιστεί ο χρόνος διατήρησης του ιχθύος που ισούται με:

$$t_{SL} = t_T + t_{lagphase}$$

όπου :

- t_{SL} είναι ο χρόνος διατήρησης του τροφίμου
- t_T ο χρόνος ο οποίος υπολογίζεται από το μοντέλο του Monod για αποδεκτό όριο αλλοίωσης logN= 7 logCFU/g
- $t_{lagphase}$ ο χρόνος της λανθάνουσας φάσης

Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στο μοντέλο Baranyi Growth Model, όπου προσαρμόζονται εκεί οι μετρήσεις των μικροβιακών αναλύσεων, με χρήση του λογισμικού Dmfit software (IFR, Institute of Food Research, Reading, UK).

4.5.3.2 Μοντέλο Baranyi

Το μοντέλο Baranyi (Baranyi & Roberts, 1995) αποτελεί ένα μοντέλο μικροβιακής ανάπτυξης το οποίο αποσκοπεί να δώσει μια πιο μηχανιστική περιγραφή για την διάρκεια της λανθάνουσας φάσης η οποία αποτελεί μια διαδικασία προσαρμογής σε ένα νέο περιβάλλον. Είναι σιγμοειδές μοντέλο και προσδιορίζει τον ειδικό ρυθμό της ανάπτυξης, τον αρχικό και τον τελικό μικροβιακό πληθυσμό και τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης.

Η θεωρία του μοντέλου Baranyi έχει ως αρχή το γεγονός ότι η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζεται άμεσα από το περιβάλλον τους. Αν γίνει η υπόθεση ότι η επίδραση του αρχικού περιβάλλοντος είναι αμελητέα, μετά τον εμβολιασμό η μικροβιακή ανάπτυξη περιγράφεται από την παρακάτω διαφορική εξίσωση:

$$x' = \mu(x) \cdot x$$

$$x(0) = x_o \qquad (0 < x_o < x_{max})$$

όπου x η συγκέντρωση των κυττάρων η οποία θεωρείται ότι είναι ομοιογενώς κατανεμημένη στο περιβάλλον ανάπτυξης και μ(x) ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης.

Αν γίνει η υπόθεση ότι το αρχικό περιβάλλον ανάπτυξης είναι διαφορετικό από το περιβάλλον ανάπτυξης των μικροοργανισμών μετά τον εμβολιασμό, η μικροβιακή ανάπτυξη περιγράφεται από την παρακάτω διαφορική εξίσωση:

$$x' = \alpha(t) \cdot \mu(x) \cdot x \qquad (0 < t)$$

$$x(0) = x_o \qquad (0 < x_o < x_{max})$$

όπου μ(x) ο δυνητικός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και α(t)· μ(x) ο πραγματικός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Στην ουσία η α(t) αποτελεί μια συνάρτηση προσαρμογής από το αρχικό περιβάλλον στο περιβάλλον ανάπτυξης μετά τον εμβολιασμό.

Αν θεωρηθεί ότι η λύση της πρώτης διαφορικής εξίσωσης είναι η f(t), τότε η g(t) είναι η λύση της δεύτερης διαφορικής εξίσωσης με α(t) μια συνάρτηση προσαρμογής όπου ισχύει:

$$g(t) = f[A(t)] \text{ όπου } A(t) = \int_0^1 a(\tau) \cdot d\tau$$

Για την επίλυση του παραπάνω συστήματος θεωρείται η συνάρτηση προσαρμογής της μορφής

$$\alpha_n(t) = \frac{t^n}{\lambda^n + t^n}$$

όπου λ και n θετικές παράμετροι με την λ να ονομάζεται παράμετρος λανθάνουσας φάσης (lag parameter) και την $\alpha_n(t)$ συνάρτηση προσαρμογής τάξης n.

Για τον υπολογισμό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης δεν είναι απαραίτητη η συλλογή δεδομένων στη φάση στασιμότητας. Το μοντέλο του Baranyi περιγράφει μόνο τη λανθάνουσα και την εκθετική φάση.

5 Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων

5.1 Εισαγωγή

Σε αυτό το κεφάλαιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που επεξηγήθηκαν αναλυτικά προηγουμένως. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εξασφάλιση της ποιότητας και την αύξηση της διατηρησιμότητας των ιχθυηρών έχει στρέψει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών στην μικροβιολογία πρόρρησης η οποία έχει σκοπό να ποσοτικοποιήσει και να προβλέψει τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών. Αυτό γίνεται με ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων όπου οι συνεχείς αναλύσεις σε επίπεδο μικροβιολογίας, αναλύσεις χρώματος, υφής, pH και οξείδωσης λιπαρών δίνουν τη δυνατότητα να μελετηθεί η υποβάθμιση της ποιότητας των ιχθυηρών που έχουν υποστεί διαφορετικές μορφές επεξεργασίας κατά την αποθήκευσή τους στους 0±0.4^{o}C.

5.2 Μελέτη της μικροβιακής αλλοίωσης των δειγμάτων

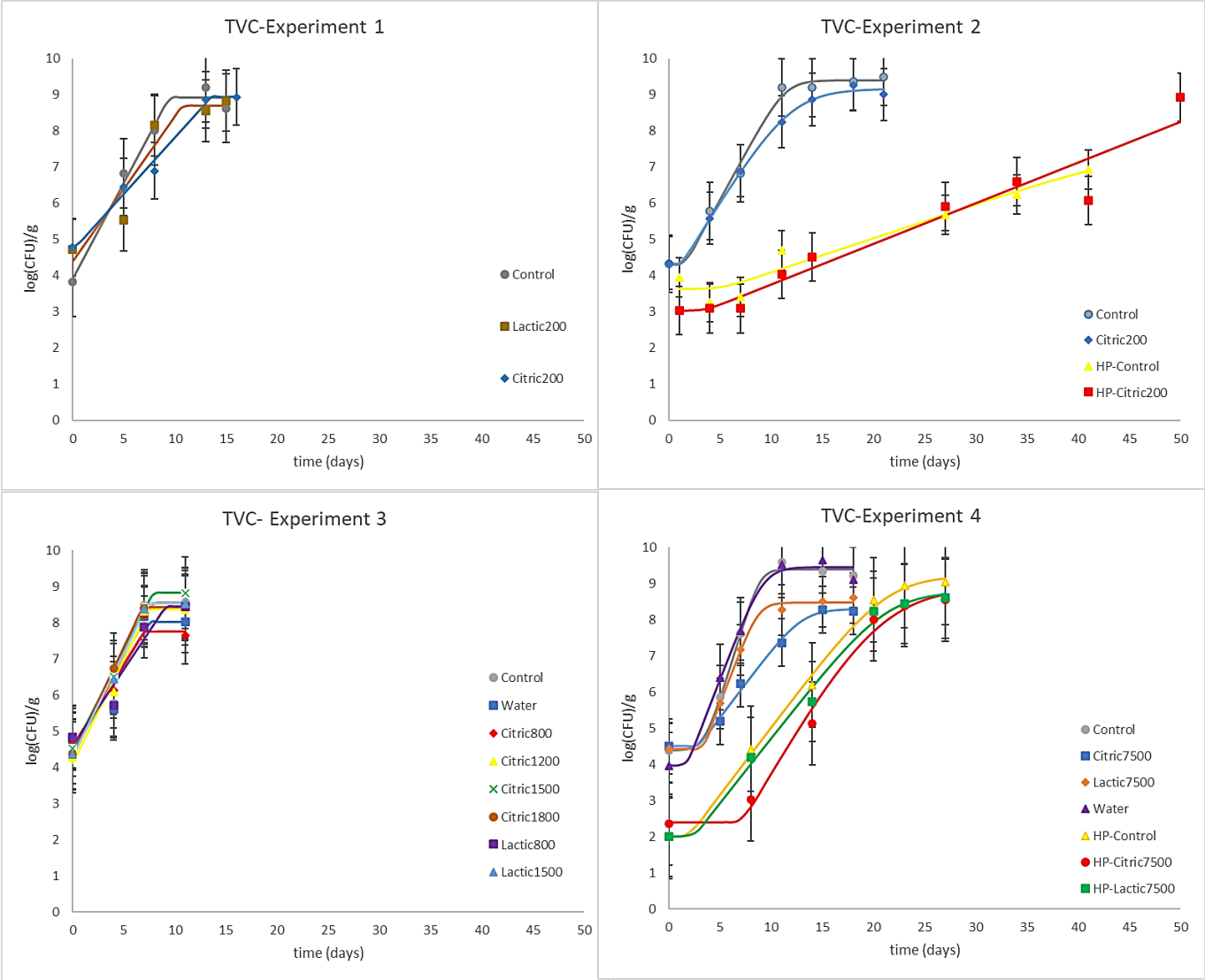
5.2.1 Εισαγωγή

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων στους 0±0.4^{o}C. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 πειράματα στα οποία μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων κιτρικού και γαλακτικού οξέος μεμονωμένων ή σε συνδυασμό με την εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης. Προσδιορίστηκε ο πληθυσμός επιλεγμένων αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Total Viable Count-TVC), Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.), *Brochothrix thermosphacta*, ζύμες/μύκητες, εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.) και βακτήρια που παράγουν H_2S (πχ. *Shewanella putrefaciens*)) σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης στους 0±0.4^{o}C. Πιο αναλυτικά, οι μεταχειρίσεις που μελετήθηκαν στα 4 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία παρατίθενται παρακάτω:

- **Experiment 1:** Ανεπεξέργαστα δείγματα (Control), δείγματα που έχουν εμβαπτιστεί σε διάλυμα κιτρικού οξέος 200ppm (Citric200) και σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 200ppm (Lactic200) για 10 λεπτά αντίστοιχα,
- **Experiment 2:** Ανεπεξέργαστα δείγματα (Control), δείγματα που έχουν εμβαπτιστεί σε διάλυμα κιτρικού οξέος 200ppm (Citric200) για 10 λεπτά και τα αντίστοιχα που έχουν υποστεί επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση 300 MPa για 5 λεπτά (HP-Control, HP-Citric200),
- **Experiment 3:** Ανεπεξέργαστα δείγματα (Control), δείγματα που έχουν εμβαπτιστεί σε νερό (Water), σε διάλυμα κιτρικού οξέος 800,1200,1500 και 1800ppm (Citric800, Citric1200, Citric1500, Citric1800) και σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 800 και 1500ppm (Lactic800, Lactic1500) για 10 λεπτά αντίστοιχα,
- **Experiment 4:** Ανεπεξέργαστα δείγματα (Control), δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε νερό (Water), σε διάλυμα κιτρικού οξέος 7500ppm (Citric7500), σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 7500ppm (Lactic7500) για 10 λεπτά αντίστοιχα, καθώς και τα αντίστοιχα δείγματα που έχουν υποστεί επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση 300 MPa για 5 λεπτά (HP-Control, HP-Citric7500, HP-Lactic7500).

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του μοντέλου Baranyi σε κάθε περίπτωση και προσδιορίσθηκαν οι ρυθμοί ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού στην εκθετική φάση. Στα διαγράμματα, τα σημεία αποτελούν τις μέσες τιμές των πειραματικών δεδομένων και οι συνεχείς γραμμές προκύπτουν από την εφαρμογή του μοντέλου Baranyi.

5.2.2 Μικροβιακή ανάπτυξη της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας



Διάγραμμα 5.1: Μεταβολή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (TVC) σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0±0.4^{o}C ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

Από τα διαγράμματα είναι εμφανές ότι τα δείγματα που έχουν επεξεργαστεί με Υπερυψηλή Πίεση έχουν πιο αργή ανάπτυξη του συγκεκριμένου πλήθους μικροοργανισμών σε σχέση με τα δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε οξέα. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας μόνο για συγκέντρωση οξέων 7500ppm, ενώ για 200-1800ppm δεν φαίνεται κάποια διαφοροποίηση σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα δείγματα. Κατά το συνδυασμό των μεθόδων (HP-Citric200, HP-Citric7500, HP-Lactic7500) παρατηρείται για

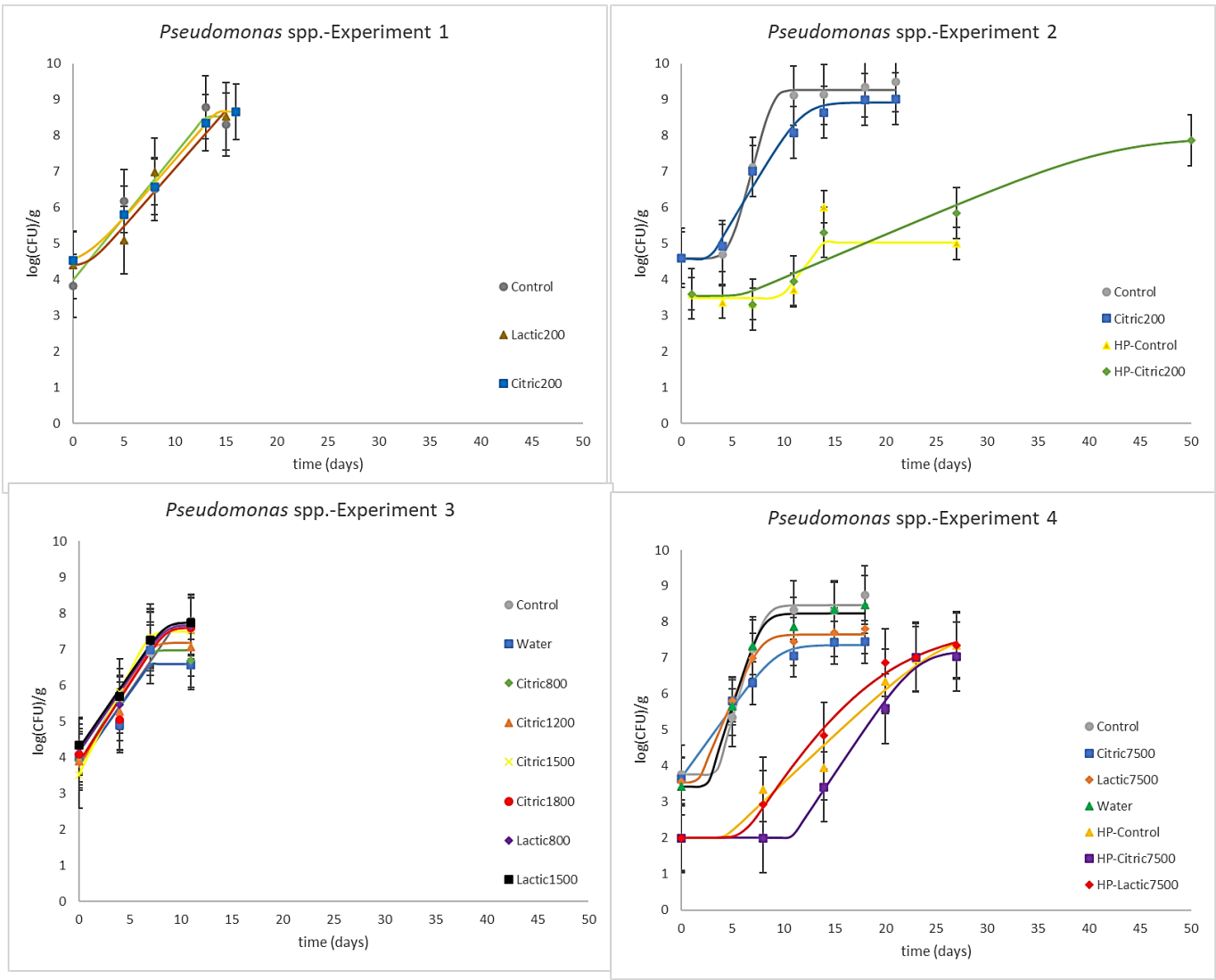
συγκέντρωση 7500ppm μικρή μείωση της ανάπτυξης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας η οποία δεν επιβεβαιώνει σαφή συνέργεια.

Μετά το τέλος της εκθετικής φάσης, ακολουθεί η φάση στασιμότητας όπου για τα δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε νερό και οξέα συγκέντρωσης 200-1800ppm εμφανίζεται στο διάστημα 9.0-9.5 log(CFU)/g, για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε οξέα συγκέντρωσης 7500ppm στην τιμή των 8 log(CFU)/g, και για τα δείγματα που έχουν επεξεργαστεί μόνο με Υπερυψηλή Πίεση ή και με τις δύο μεθόδους στην τιμή των 9.0 log(CFU)/g και 8.0 log(CFU)/g αντίστοιχα.

Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κυμαίνεται μεταξύ του 3.30-4.70 log(CFU)/g για τα δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε νερό και οξέα ενώ για τα δείγματα που έχουν επεξεργαστεί με Υπερυψηλή Πίεση είναι στο όριο ανίχνευσης (≤ 2.0 log(CFU)/g). Αξίζει να σημειωθεί ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων που έχουν επεξεργαστεί με Υπερυψηλή Πίεση είναι μειωμένο σε σχέση με τα άλλα δείγματα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί με την εφαρμογή πιέσεων μεγαλύτερων των 200MPa, μετουσιώνονται πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κυτταρική διαίρεση με τη δημιουργία θυγατρικών κυττάρων να περιορίζεται και έτσι να επιτυγχάνεται επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε αρκετά μεγάλο βαθμό (Farkas & Hoover, 2000).

Τέλος όπως φαίνεται και από το διάγραμμα (Διάγραμμα 5.1), τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με Υπερυψηλή Πίεση έχουν πολύ μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση που συγκεκριμένα για το δείγμα της συνδυαστικής επεξεργασίας με εμβάπτιση σε κιτρικό οξύ 7500ppm (HP-Citric7500) φθάνει τις 7 μέρες. Η λανθάνουσα φάση για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε οξέα συγκέντρωσης 7500ppm κυμαίνεται μεταξύ 2-3 ημερών ενώ για τα υπόλοιπα φθάνει μέχρι τη 1 μέρα.

5.2.3 Μικροβιακή ανάπτυξη των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.)



Διάγραμμα 5.2: Μεταβολή του αριθμού των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0±0.4°C ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

Για τον μικροοργανισμό *Pseudomonas* spp., φαίνεται ότι μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης έχουν τα δείγματα που έχουν επεξεργαστεί με Υπερυψηλή Πίεση, όπως και προηγουμένως. Ταχύτερη ανάπτυξη ψευδομονάδων εμφανίζεται στα δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε νερό και σε οξέα, χωρίς να παρατηρείται διαφοροποίηση στη μεταβολή για συγκεντρώσεις 200-1800ppm ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση οξέων (7500ppm) προκαλεί επιβράδυνση της ανάπτυξής τους. Παρομοίως, για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε κιτρικό οξύ συγκέντρωσης 7500ppm και επεξεργάσθηκαν και

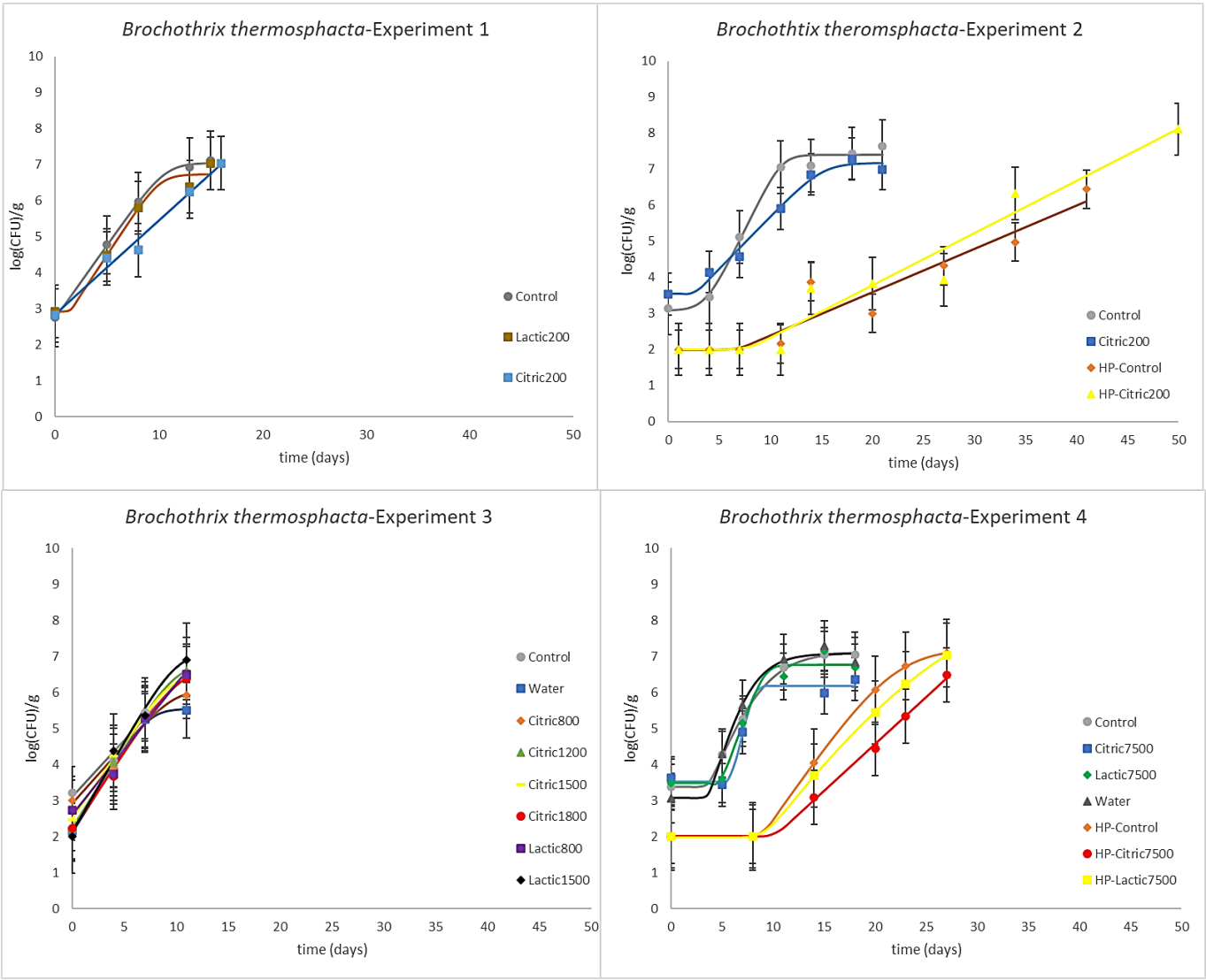
με Υπερυψηλή Πίεση (HP-Citric7500), παρατηρείται μικρή μείωση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Pseudomonas spp.*.

Η φάση στασιμότητας για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση παρατηρείται στην τιμή 7.0 log(CFU)/g, ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα οι τιμές είναι υψηλότερες με 7.0-7.5 log(CFU)/g για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε οξέα συγκέντρωσης 7500ppm και 8.5-9.0 log(CFU)/g για τα υπόλοιπα ανάλογα τη συγκέντρωση του οξέος. Παρατηρώντας το 2° πείραμα φαίνεται ότι η φάση στασιμότητας του δείγματος που επεξεργάσθηκε μόνο με Υπερυψηλή Πίεση εμφανίζεται πολύ χαμηλότερα και συγκεκριμένα στην τιμή 5 log(CFU)/g.

Το αρχικό μικροβιακό φορτίο είναι μειωμένο για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση και συγκεκριμένα μέχρι 3.5 log(CFU)/g ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα είναι μεταξύ του 3.5-4.6 log(CFU)/g. Επίσης σε όλα τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση εμφανίζεται έντονη λανθάνουσα φάση με τη μεγαλύτερη να παρατηρείται στο δείγμα της συνδυαστικής επεξεργασίας με κιτρικό οξύ συγκέντρωσης 7500ppm (HP-Citric7500) που αντιστοιχεί σε 10 μέρες. Στα υπόλοιπα δείγματα που εξυγιάνθηκαν με νερό και οξέα φθάνει μέχρι τις 3 μέρες.

Τέλος, συγκρίνοντας το φορτίο των ψευδομονάδων με το αντίστοιχο της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (TVC), συμπεραίνεται ότι οι ψευδομονάδες είναι από τους κύριους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς για τα ιχθυηρά κατά τη συντήρησή τους σε συνθήκες ψύξης (0°C) το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία. (Gram and Huss, 1996, Parlapani et al., 2015).

5.2.4 Μικροβιακή ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta*



Διάγραμμα 5.3: Μικροβιακή ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0±0.4ºC ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

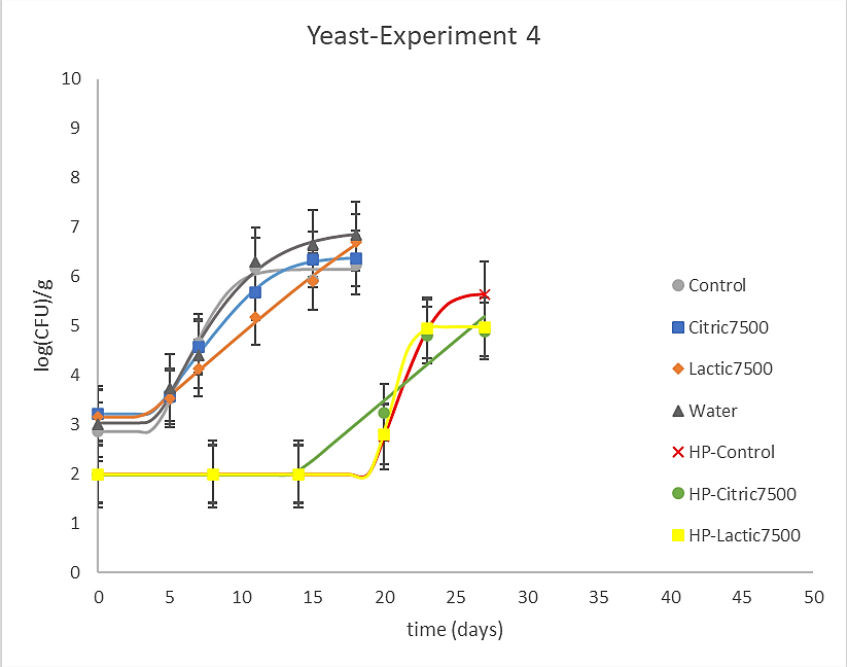
Από τα αποτελέσματα ανάπτυξης του *Brochothrix thermosphacta*, παρατηρήθηκε μικροβιακή αδρανοποίηση για τα δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε οξέα συγκέντρωσης 7500ppm, ενώ για συγκεντρώσεις 200-1800ppm δεν φάνηκε διαφοροποίηση στην ανάπτυξη σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα δείγματα. Τα δείγματα που έχουν επεξεργαστεί με Υπερυψηλή Πίεση έχουν πολύ χαμηλότερους ρυθμούς αλλοίωσης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, όπως και χαμηλότερο αρχικό μικροβιακό φορτίο το οποίο προσδιορίστηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης

(≤2log(CFU)/g). Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των υπόλοιπων δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 2.0-3.5 log(CFU)/g.

Η συνδυαστική επεξεργασία για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό φαίνεται να επιβραδύνει ακόμη περισσότερο την αλλοίωση για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε οξέα συγκέντρωσης 7500ppm προ της επεξεργασίας με Υπερυψηλή Πίεση. Αντίθετα, για τη συνδυαστική επεξεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης με εμβάπτιση σε κιτρικό οξύ συγκέντρωσης 200ppm δεν υπάρχει διαφοροποίηση στη μεταβολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta.*

Εμφανής είναι η λανθάνουσα φάση των δειγμάτων που επεξεργάσθηκαν με τη μέθοδο της Υπερυψηλής Πίεσης. Λανθάνουσα φάση εμφανίζεται και στα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν στις υψηλές συγκεντρώσεις οξέος των 7500ppm (Citric7500 και Lactic7500) που είναι 4-5 μέρες. Για τα υπόλοιπα δείγματα φθάνει μέχρι 1 μέρα. Η φάση στασιμότητας ανάλογα το δείγμα κυμαίνεται μεταξύ 6.5-7.0 log(CFU)/g.

5.2.5 Μικροβιακή ανάπτυξη των ζυμών/μυκήτων



Διάγραμμα 5.4: Μεταβολή του αριθμού των ζυμών/μυκήτων σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0°C για το 4° πείραμα

Παραπάνω παρουσιάζεται το διάγραμμα της μεταβολής του αριθμού των ζυμών/ μυκήτων σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0±0.4°C μόνο για το 4° πείραμα. Στα υπόλοιπα πειράματα όσον αφορά στα δείγματα που εμβαπτίστηκαν σε νερό και σε διαλύματα οξέων, η συγκέντρωση μέχρι 1800ppm δεν ήταν αρκετή έτσι ώστε να προκαλέσει μείωση της ανάπτυξης των συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Η συγκέντρωση των 7500ppm είναι ικανή να επιβραδύνει την ανάπτυξη των ζυμών/μυκήτων.

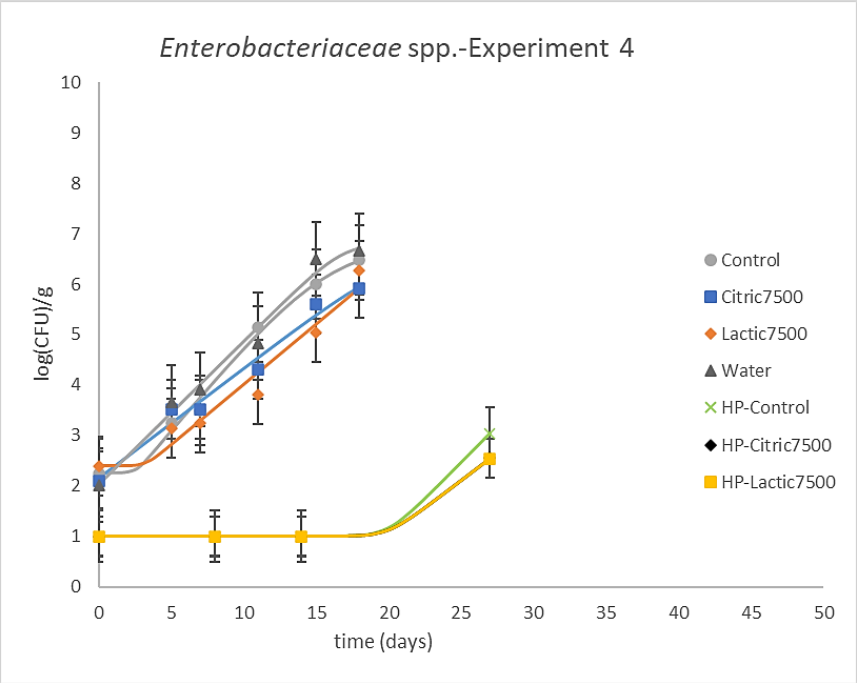
Όσον αφορά στο 2° πείραμα, η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση 300 MPa κατάφερε να απενεργοποιήσει τις ζύμες/μύκητες και ο αριθμός του μικροβιακού φορτίου στα συγκεκριμένα δείγματα (HP-Control και HP-Citric200) ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (≤2 log(CFU)/g) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν μηδενικός.

Με βάση το 4° πείραμα, με την εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης 300 MPa για 5 λεπτά, παρατηρείται επιβράδυνση της ανάπτυξης του αριθμού των ζυμών/μυκήτων. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο για τα δείγματα που εφαρμόστηκε Υπερυψηλή Πίεση είναι

και σε αυτήν την περίπτωση χαμηλότερο σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και κάτω από το όριο ανίχνευσης (≤2 log(CFU)/g). Για τα υπόλοιπα δείγματα κυμαίνεται μεταξύ του 2.80-3.60 log(CFU)/g. Λανθάνουσα φάση εμφανίζουν τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση η οποία φθάνει τις 19 μέρες και η φάση στασιμότητας είναι μεταξύ 5.0-5.5 log(CFU)/g. Για τα υπόλοιπα δείγματα είναι 6.0-6.5 log(CFU)/g και η λανθάνουσα φάση παρατηρείται τις πρώτες 3 μέρες.

Τέλος, η συνδυαστική επεξεργασία Υπερυψηλής Πίεσης και εξυγίανσης με οργανικά οξέα φαίνεται να μην επηρεάζει την ανάπτυξη των ζυμών/μυκήτων.

5.2.6 Μικροβιακή ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.)



Διάγραμμα 5.5: Μεταβολή του αριθμού των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae* spp.) σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0±0.4ºC για το 4ο πείραμα

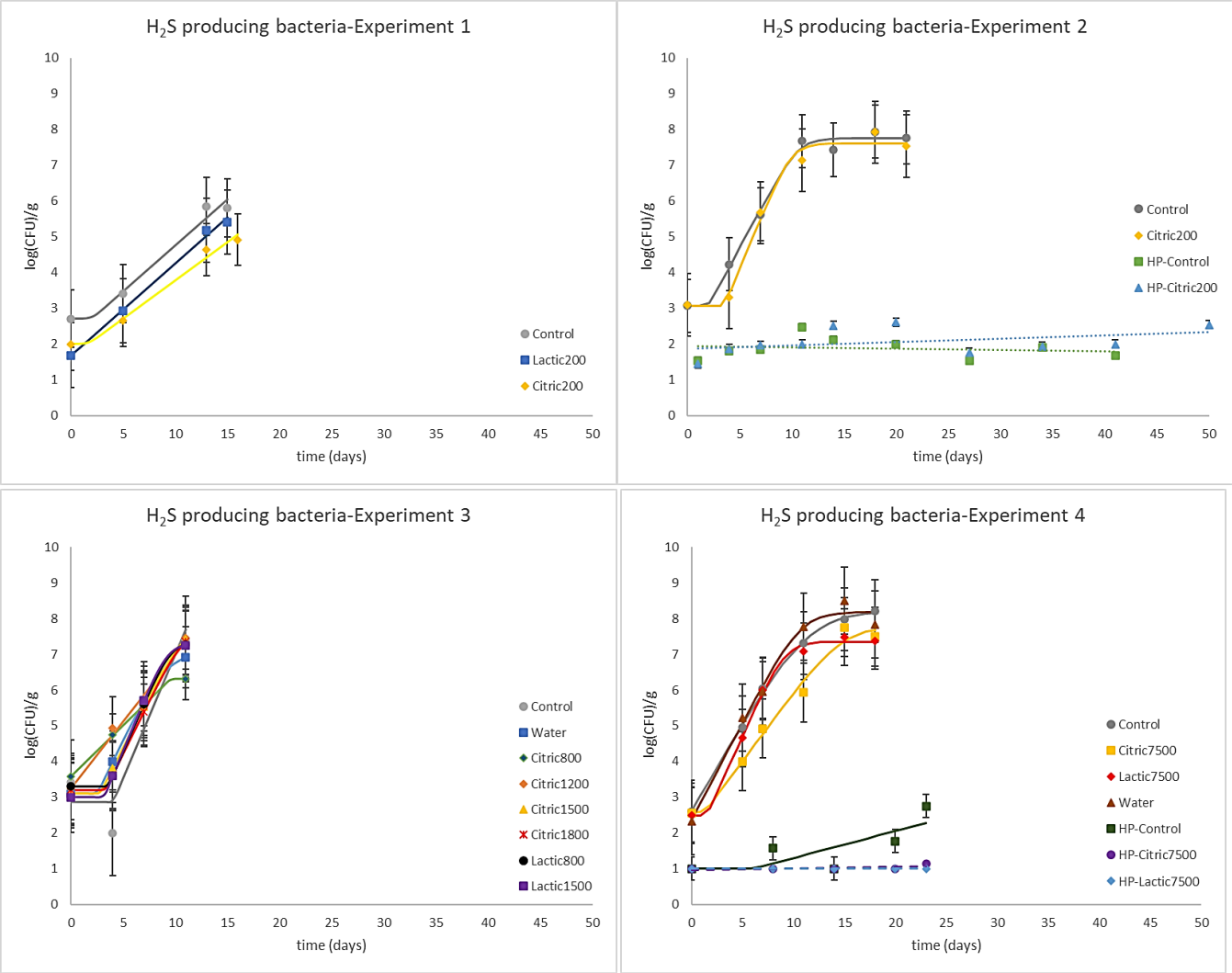
Από τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων 1,2,3 δεν παρατηρήθηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε νερό και σε κιτρικό και γαλακτικό οξύ συγκέντρωσης 200 μέχρι 1800ppm. Αντίθετα, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, η συγκέντρωση οξέος 7500ppm προκάλεσε επιβράδυνση της ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων. Επιπλέον για τα δείγματα του 2ου πειράματος που επεξεργάστηκαν με Υπερυψηλή Πίεση 300 MPa για 5 λεπτά (HP-Control, HP-Citric200) ο αριθμός του μικροβιακού φορτίου ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (≤1log(CFU)/g) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν μηδενικός.

Με βάση το διάγραμμα, χαμηλότερος ρυθμός ανάπτυξης παρατηρήθηκε στα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση, καθώς και η μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση που αντιστοιχεί σε 19 μέρες. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο για αυτά τα δείγματα είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης (≤1 log(CFU)/g). Για τα υπόλοιπα δείγματα κυμαίνεται μεταξύ 2.60-3.80 log(CFU)/g ανάλογα τη συγκέντρωση του

οξέος. Όταν οι καμπύλες φθάσουν στη φάση στασιμότητας, ο αριθμός των εντεροβακτηρίων ανά γραμμάριο για τα δείγματα που εξυγιάνθηκαν με οξέα συγκέντρωσης 200-1800ppm ισούται με 4.0-5.0 log(CFU)/g, ενώ με συγκέντρωση 7500ppm 5.0-6.0 log(CFU)/g.

Και σε αυτήν την περίπτωση μικροοργανισμών, η συνδυαστική επεξεργασία δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων.

5.2.7 Μικροβιακή ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν H_2S



Διάγραμμα 5.6: Μεταβολή του αριθμού των βακτηρίων που παράγουν H_2S σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης στους 0±0.4ºC , ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

Από τα αποτελέσματα του διαγράμματος παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα της Υπερυψηλής Πίεσης υπήρξε μερική και σε κάποιες περιπτώσεις ολική απενεργοποίηση της ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν H_2S. Συγκεκριμένα, στα δείγματα που επεξεργάστηκαν και με τις δύο μεθόδους (HP-Citric200, HP-Citric7500, HP-Lactic7500) έγινε απενεργοποίηση των βακτηρίων και ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μηδενικός. Στα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε οξέα δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση στη μεταβολή του αριθμού των βακτηρίων που

παράγουν H_2S σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκεντρώσεις 200-1800ppm. Αντίθετα, για συγκέντρωση 7500ppm παρατηρείται πιο αργή ανάπτυξη.

Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κυμαίνεται μεταξύ 2.0-3.60 log(CFU)/g, ενώ για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με Υπερυψηλή Πίεση είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης (≤1log(CFU)/g). Η φάση στασιμότητας των βακτηρίων που παράγουν H_2S για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε οξέα είναι μεταξύ 7.0-8.0 log(CFU)/g. Η λανθάνουσα φάση είναι εμφανής για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση (HP-Control) η οποία ισούται με 6 μέρες, ενώ για τα δείγματα της εμβαπτίσθηκαν σε οργανικά οξέα, φθάνει μέχρι 2 μέρες.

5.2.8 Εφαρμογή του μοντέλου Baranyi για τον προσδιορισμό του ρυθμού αλλοίωσης του κάθε μικροοργανισμού

Παρακάτω παρουσιάζονται τα δεδομένα που αφορούν στο ρυθμό ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού (k) ανά δείγμα καθώς και ο χρόνος της λανθάνουσας φάσης ($t_{lagphase}$) έπειτα από την εφαρμογή του μοντέλου Baranyi:

5.2.8.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC)

Πίνακας 5.1: Ρυθμός ανάπτυξης k ($days^{-1}$), χρόνος λανθάνουσας φάσης $t_{lagphase}$ (days) και το R^2 της προσαρμογής με βάση το μοντέλο *Baranyi* για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC)

	rate (k) ($days^{-1}$)	$t_{lagphase}$ (days)	R^2
Experiment 1			
Control	0,53	0,00	0.942
Citric200	0,40	0,00	0.955
Lactic200	0,31	0,22	0.830
Experiment 2			
Control	0,52	1,53	0.981
Citric200	0,45	1,22	0.995
HP-Control	0,21	4,10	0.890
HP-Citric200	0,22	2,52	0.894
Experiment 3			
Control	0,53	0,00	0.800
Water	0,47	0,00	0.827
Citric800	0,45	0,00	0.877
Citric1200	0,57	0,00	0.957
Citric1500	0,55	0,00	0.990
Citric1800	0,60	0,00	0.999
Lactic800	0,42	0,00	0.834
Lactic1500	0,57	0,00	0.992
Experiment 4			
Control	0,92	3,46	0.992
Citric7500	0,38	2,85	0.988
Lactic7500	0,74	3,28	0.991
Water	0,73	1,71	0.981
HP-Control	0,37	1,90	0.990
HP-Citric7500	0,49	7,14	0.977
HP-Lactic7500	0,36	2,41	0.980

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι το χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης του ολικού μικροβιακού φορτίου εμφανίζουν τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση και τον υψηλότερο τα δείγματα που έχουν εμβαπτιστεί σε νερό και οξέα συγκέντρωσης 200-1800ppm. Παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των δειγμάτων που έχουν εμβαπτισθεί σε διάλυμα κιτρικού οξέος 7500ppm (Citric7500). Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και από το διάγραμμα της μεταβολής της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (TVC) συναρτήσει του χρόνου (Διάγραμμα 5.1).

5.2.8.2 *Ψευδομονάδες (Pseudomonas* spp.)

Πίνακας 5.2: Ρυθμός ανάπτυξης k (days^{-1}), χρόνος λανθάνουσας φάσης $t_{lagphase}$ (days) και το R^2 της προσαρμογής με βάση το μοντέλο Baranyi για τις ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.)

	rate (k) (days^{-1})	$t_{lagphase}$ (days)	R^2
Experiment 1			
Control	0,35	0,00	0.947
Citric200	0,32	1,60	0.993
Lactic200	0,33	1,48	0.859
Experiment 2			
Control	1,07	4,62	0.993
Citric200	0,47	2,74	0.969
HP-Control	0,36	8,66	0.850
HP-Citric200	0,12	4,86	0.854
Experiment 3			
Control	0,41	0,00	0.905
Water	0,40	0,00	0.872
Citric800	0,48	0,00	0.893
Citric1200	0,48	0,00	0.880
Citric1500	0,57	0,00	0.999
Citric1800	0,44	0,00	0.834
Lactic800	0,42	0,00	0.926
Lactic1500	0,41	0,00	0.971
Experiment 4			
Control	0,99	3,41	0.985
Citric7500	0,39	0,00	0.979
Lactic7500	0,66	1,56	0.989
Water	0,90	2,52	0.975
HP-Control	0,26	4,22	0.937
HP-Citric7500	0,42	10,80	0.986
HP-Lactic7500	0,51	6,05	0.985

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι τους χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης παρουσιάζουν τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση καθώς και αυτά που εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος 7500ppm (Citric7500). Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στη μεταβολή της μικροβιακής ανάπτυξης των

ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) για τα δείγματα που έχουν εμβαπτισθεί σε οξέα συγκέντρωσης 200-1800ppm.

5.2.8.3 Brochothrix thermosphacta

Πίνακας 5.3: Ρυθμός ανάπτυξης k ($days^{-1}$), χρόνος λανθάνουσας φάσης $t_{lagphase}$ (days) και το R^2 της προσαρμογής με βάση το μοντέλο Baranyi για το μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta*

	rate (k) ($days^{-1}$)	$t_{lagphase}$ (days)	R^2
Experiment 1			
Control	0,40	0,00	0.997
Citric200	0,44	1,40	0.943
Lactic200	0,26	0,00	0.923
Experiment 2			
Control	0,58	3,62	0.985
Citric200	0,29	2,60	0.976
HP-Control	0,12	5,72	0.867
HP-Citric200	0,15	6,73	0.921
Experiment 3			
Control	0,31	0,00	0.956
Water	0,46	0,00	0.982
Citric800	0,32	0,00	0.930
Citric1200	0,45	0,00	0.999
Citric1500	0,42	0,00	0.999
Citric1800	0,43	0,00	0.977
Lactic800	0,36	0,00	0.950
Lactic1500	0,50	0,00	0.971
Experiment 4			
Control	0,78	3,67	0.997
Citric7500	0,72	5,78	0.950
Lactic7500	0,75	4,81	0.951
Water	1,91	3,67	0.979
HP-Control	0,40	8,80	0.999
HP-Citric7500	0,26	10,13	0.995
HP-Lactic7500	0,42	7,08	0.999

Παρόμοια προκύπτει ότι, οι ρυθμοί ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* δεν εμφανίζουν διαφοροποίηση για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε νερό και οξέα σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα δείγματα. Εμφανής μείωση του

ρυθμού ανάπτυξης παρατηρείται για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση και σε αυτήν την περίπτωση.

5.2.8.4 Ζύμες/Μύκητες

Πίνακας 5.4: Ρυθμός ανάπτυξης k (days^{-1}), χρόνος λανθάνουσας φάσης $t_{lagphase}$ (days) και το R^2 της προσαρμογής με βάση το μοντέλο Baranyi για τις ζύμες/μύκητες

	rate (k) (days^{-1})	$t_{lagphase}$ (days)	R^2
Experiment 2			
Control	0,29	2,60	0.959
Citric200	0,42	5,00	0.995
HP-Control	-	-	
HP-Citric200	-	-	
Experiment 3			
Control	0,19	0,00	0.856
Water	0,25	0,00	0.909
Citric800	0,15	0,00	0.826
Citric1200	0,16	0,00	0.851
Citric1500	0,41	3,51	0.999
Citric1800	0,14	0,00	0.938
Lactic800	0,14	0,00	0.895
Lactic1500	0,19	0,00	0.951
Experiment 4			
Control	0,64	3,99	0.981
Citric7500	0,40	3,83	0.991
Lactic7500	0,26	3,28	0.991
Water	0,70	4,05	0.977
HP-Control	0,32	19,07	0.999
HP-Citric7500	0,24	13,76	0.870
HP-Lactic7500	0,26	19,35	0.999

Στα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση του 2^{ου} πειράματος δεν έγινε εφαρμογή του μοντέλου Baranyi γιατί δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των ζυμών/μυκήτων καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο ρυθμός ανάπτυξης των ζυμών/μυκήτων φαίνεται να είναι μειωμένος για τα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε διαλύματα οξέος 7500ppm ενώ για χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση στην τιμή του. Επιπλέον για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση του 4^{ου} πειράματος, παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης

και συνεργιστική δράση για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν και με τις δύο μεθόδους (HP-Citric7500, HP-Lactic7500).

5.2.8.5 Εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.)

Πίνακας 5.5: Ρυθμός ανάπτυξης k (days^{-1}), χρόνος λανθάνουσας φάσης $t_{lagphase}$ (days) και το R^2 της προσαρμογής με βάση το μοντέλο Baranyi για τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.)

	rate (k) (days^{-1})	$t_{lagphase}$ (days)	R^2
Experiment 1			
Control	0,23	2,17	0.869
Citric200	0,28	3,49	0.940
Lactic200	0,24	1,54	0.945
Experiment 2			
Control	0,11	0,00	0.900
Citric200	0,23	4,77	0.843
HP-Control	-	-	
HP-Citric200	-	-	
Experiment 3			
Control	0,12	0,00	0.885
Water	0,20	0,00	0.994
Citric800	0,18	0,00	0.987
Citric1200	0,14	0,00	0.832
Citric1500	0,24	0,00	0.914
Citric1800	0,17	2,96	0.889
Lactic800	0,17	3,87	0.999
Lactic1500	0,23	0,00	0.965
Experiment 4			
Control	0,34	2,57	0.980
Citric7500	0,21	0,00	0.949
Lactic7500	0,24	3,26	0.887
Water	0,28	0,00	0.962
HP-Control	0,29	19,94	0.999
HP-Citric7500	0,22	19,94	0.999
HP-Lactic7500	0,21	19,94	0.999

Η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση 300 MPa οδήγησε στην απενεργοποίηση της ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων στα δείγματα του 2^{ου} πειράματος και έτσι δεν έγινε εφαρμογή του μοντέλου. Με βάση τα αποτελέσματα του 4^{ου} πειράματος, η συγκέντρωση οξέος 7500ppm μείωσε το ρυθμό ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων εν

αντιθέσει με τις συγκεντρώσεις 200-1800ppm που δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση. Χαμηλότεροι ρυθμοί ανάπτυξης φαίνονται για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση με επιπλέον να παρατηρείται συνδυαστική δράση σε αυτά που επεξεργάσθηκαν και με τις δύο μεθόδους.

5.2.8.6 Βακτήρια που παράγουν H_2S

Πίνακας 5.6: Ρυθμός ανάπτυξης k ($days^{-1}$), χρόνος λανθάνουσας φάσης $t_{lagphase}$ (days) και το R^2 της προσαρμογής με βάση το μοντέλο Baranyi για τα βακτήρια που παράγουν H_2S

	rate (k) ($days^{-1}$)	$t_{lagphase}$ (days)	R^2
Experiment 1			
Control	0,26	2,03	0.938
Citric200	0,26	0,04	0.965
Lactic200	0,21	1,67	0.987
Experiment 2			
Control	0,55	2,05	0.984
Citric200	0,70	3,52	0.973
HP-Control	-	-	
HP-Citric200	-	-	
Experiment 3			
Control	0,69	4,02	0.891
Water	0,61	2,52	0.960
Citric800	0,28	0,00	0.999
Citric1200	0,37	0,00	0.980
Citric1500	0,58	0,00	0.936
Citric1800	0,59	3,28	0.892
Lactic800	0,67	3,55	0.876
Lactic1500	0,70	3,15	0.916
Experiment 4			
Control	0,50	0,00	0.998
Citric7500	0,39	1,28	0.960
Lactic7500	0,63	1,48	0.992
Water	0,54	0,00	0.973
HP-Control	0,08	6,00	0.891
HP-Citric7500	-	-	
HP-Lactic7500	-	-	

Με βάση τον πίνακα, παρατηρείται αδρανοποίηση στην ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν H_2S έπειτα από την εφαρμογή της Υπερυψηλής Πίεσης και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης στα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε κιτρικό οξύ συγκέντρωσης

7500ppm. Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των βακτηρίων που παράγουν H_2S.

5.3 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής (shelf life)

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι ο κύρια αιτία αλλοίωσης των φιλέτων λαβρακιού είναι η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC). Επομένως ο χρόνος ζωής στους 0ºC κάθε δείγματος υπολογίστηκε βάσει τους ρυθμούς αλλοίωσης του συγκεκριμένου πλήθους μικροοργανισμών. Για τα ανεπεξέργαστα δείγματα δίνεται εύρος τιμών χρόνου ζωής λόγω του ότι έγινε μικροβιακή ανάλυση και στα 4 πειράματα. Για τις συνθήκες επεξεργασίας που επαναλήφθηκαν και σε επόμενο πείραμα λαμβάνεται μέσος όρος. Ως αποδεκτό όριο αλλοίωσης ορίζεται η τιμή 7 log(CFU)/g. Να σημειωθεί ότι ο χρόνος ζωής προσδιορίζεται από την στιγμή που παραλαμβάνονται τα φιλέτα λαβρακιού στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Πίνακας 5.7: Χρόνος ζωής στους 0ºC σε μέρες με βάση την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC) για όλες τις διαφορετικές επεξεργασίες που υποβλήθηκαν τα φιλέτα λαβρακιού

	Χρόνος ζωής (days)	
Control	4-6 μέρες	
Water	5 μέρες	
Citric200	6 μέρες	
Citric800	5 μέρες	
Citric1200	5 μέρες	
Citric1500	4 μέρες	
Citric1800	4 μέρες	
Citric7500	9 μέρες	
Lactic200	7 μέρες	
Lactic800	5 μέρες	
Lactic1500	4 μέρες	
Lactic7500	8 μέρες	
HP-Control	20 μέρες (2º πείραμα)	15 μέρες (4º πείραμα)
HP-Citric200	20 μέρες	
HP-Citric7500	16 μέρες	
HP-Lactic7500	16 μέρες	

Με βάση τον Πίνακα 5.7 επιβεβαιώνεται ότι οι τιμές του χρόνου ζωής των φιλέτων λαβρακιού είναι αρκετά χαμηλές αφού πρόκειται για ένα προϊόν με αρκετά υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο το οποίο αλλοιώνεται πολύ γρήγορα. Όπως ήταν αναμενόμενο, υψηλότερους χρόνους ζωής έχουν τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με Υπερυψηλή Πίεση (300MPa-5 λεπτά), με τη μέθοδο να οδηγεί στην επιβράδυνση της ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Όσον αφορά στα υπόλοιπα δείγματα, παρατηρούνται ελάχιστες διαφορές στις τιμές του χρόνου ζωής. Πιο συγκεκριμένα, η εμβάπτιση σε νερό, σε διάλυμα κιτρικού οξέος συγκέντρωσης 200,800,1200,1500 και 1800ppm και γαλακτικού οξέος 200,800 και 1500ppm για 10 λεπτά αντίστοιχα, δεν πέτυχε αύξηση της διατηρησιμότητας των φιλέτων λαβρακιού γεγονός που δηλώνει σημαντική υποβάθμιση και αλλοίωση των δειγμάτων. Αντίθετα, η υψηλότερη συγκέντρωση διαλύματος κιτρικού και γαλακτικού οξέος 7500ppm οδήγησε σε αύξηση του χρόνου ζωής των φιλέτων κατά τουλάχιστον 3 και 2 ημέρες αντίστοιχα.

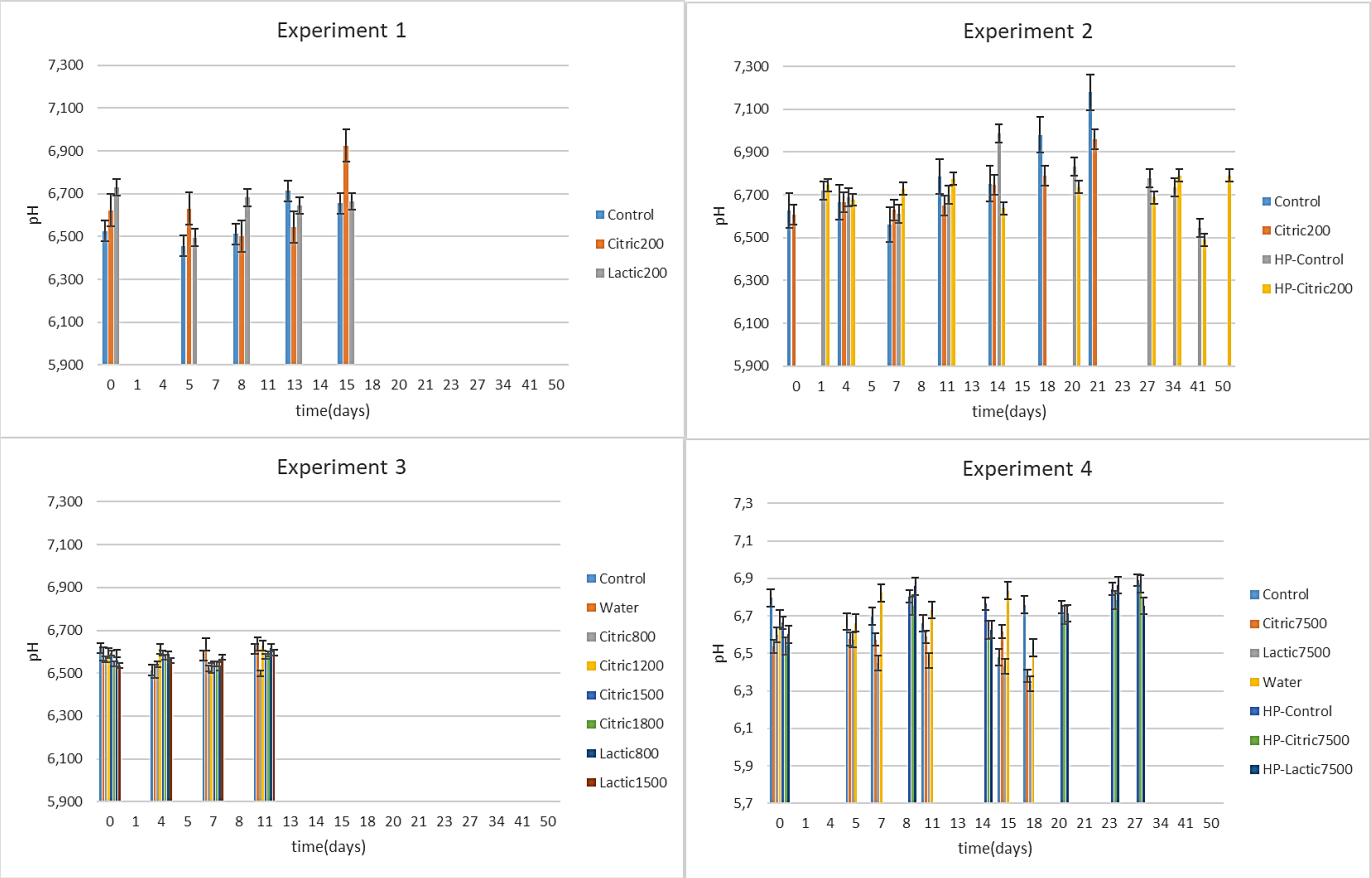
Στην περίπτωση της συνδυαστικής επεξεργασίας, παρατηρήθηκε οριακή αύξηση του χρόνου ζωής των φιλέτων λαβρακιού για συγκέντρωση οξέων 7500ppm. Επομένως προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν μπορεί να τεκμηριωθεί συνεργιστική δράση των δύο μεθόδων υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Οι διαφορές στις τιμές του χρόνου ζωής των δειγμάτων Υπερυψηλής Πίεσης οφείλονται στο γεγονός ότι η διατηρησιμότητα εξαρτάται από το αρχικό μικροβιακό φορτίο και τις συνθήκες ανάπτυξης των φιλέτων λαβρακιού.

Συμπερασματικά, η μέθοδος εξυγίανσης οδήγησε σε επιμήκυνση του χρόνου ζωής των φιλέτων λαβρακιού μόνο στην περίπτωση των διαλυμάτων οξέων υψηλής συγκέντρωσης (εμβάπτιση σε κιτρικό και γαλακτικό οξύ συγκέντρωσης 7500ppm για 10 λεπτά). Πιο επιτυχής μέθοδος στην αύξηση της διατηρησιμότητάς τους φαίνεται να είναι η επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση (300MPa για 5 λεπτά) που οδήγησε σε αύξηση του χρόνου ζωής των δειγμάτων με επιβραδύνση της ανάπτυξης του μικροβιακού φορτίου.

5.4 Μέτρηση της μεταβολής της τιμής του pH

Ο δείκτης που θα μελετηθεί παρακάτω είναι η τιμή του pH και πως αυτή μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των φιλέτων λαβρακιού στους 0±0.4ºC. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό δείκτη για την μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων και κυρίως των ιχθυηρών, γιατί καθώς αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί παράγουν μεταβολικές ουσίες οι οποίες επηρεάζουν την τιμή του. Πιο συγκεκριμένα, ο μικροοργανισμός *Pseudomonas* spp. ο οποίος είναι από τους βασικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς των ιχθυηρών, παράγει κυρίως αλκαλικά μεταβολικά προϊόντα που αυξάνουν την τιμή του pH, ενώ τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.) παράγουν κυρίως οξέα (Gram and Huss, 1996). Επιπλέον λόγω του φαινομένου της νεκρικής ακαμψίας η παραγωγή γαλακτικού οξέος στο μυϊκό ιστό των φιλέτων μπορεί να επηρεάσει την τιμή του pH (Belitz et al., 2009).

Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα της μεταβολής των τιμών του pH σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης των φιλέτων λαβρακιού.



Διάγραμμα 5.7: Μεταβολή της τιμής του pH σε συνάρτηση με το χρόνο κατά την αποθήκευση των φιλέτων λαβρακιού στους 0±0.4ºC ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

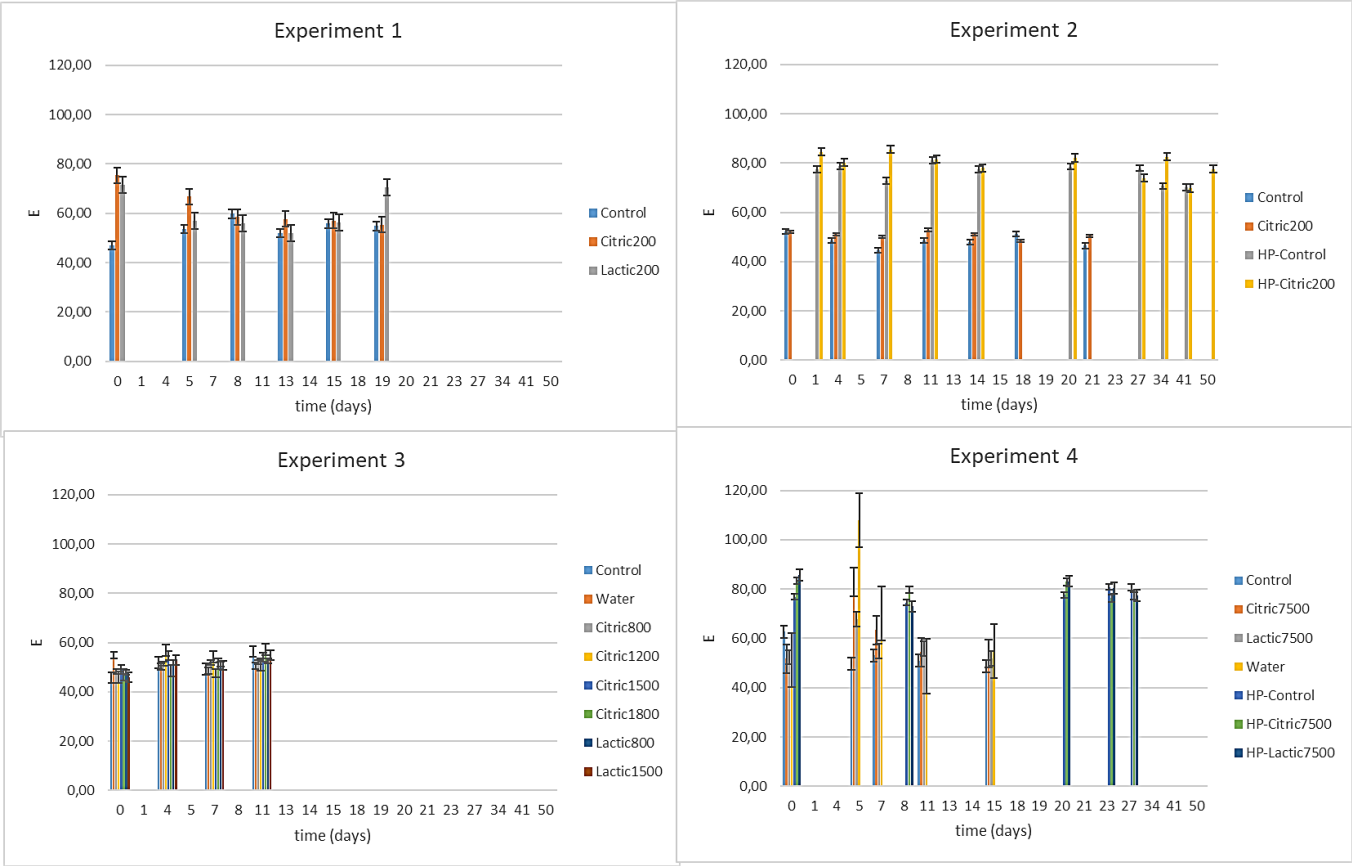
Από τα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 5.7) παρατηρούνται αυξομειώσεις στην τιμή του pH γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε ορισμένες μικροβιολογικές και μεταβολικές δραστηριότητες που συμβαίνουν στον μυϊκό ιστό των φιλέτων λαβρακιού όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Επιπλέον η εξυγιάνση με οξέα και κυρίως η συγκέντρωση των 7500ppm, φάνηκε να οδηγεί σε μείωση της αρχικής τιμής του (χρόνος 0) κατά 0.2 μονάδες.

Η εφαρμογή της Υπερυψηλής Πίεσης δεν τροποποίησε ιδιαιτέρως την τιμή του pH, γιατί η πίεση δεν ήταν αρκετή έτσι ώστε να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες και να δώσουν αλκαλικά αμινοξέα (Oliveira, 2017).

Τέλος, για κάθε συνθήκη, δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για τη μεταβολή της τιμής του pH σε συνάρτηση με το χρόνο. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μεταβολές στη τιμή του συγκεκριμένου δείκτη κατά την αποθήκευση ιχθυηρών σε συνθήκες ψύξης είναι στατιστικά μη σημαντικές (Belitz et al., 2009). Επομένως, το γενικό συμπέρασμα είναι ότι δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την επεξεργασία που υπέστη το φιλέτο λαβρακιού ούτε από το χρόνο αποθήκευσης. Ανεξαρτήτως δείγματος και ημέρας αποθήκευσης, οι τιμές του pH κυμαίνονται μεταξύ 6,5-6,9.

5.5 Ανάλυση χρώματος

Το χρώμα είναι ένας πολύ σημαντικός δείκτης ποιότητας ο οποίος αφορά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ιχθυηρού. Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα του δείκτη Ε του χρώματος σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης των φιλέτων λαβρακιού στους 0±0.4ºC.

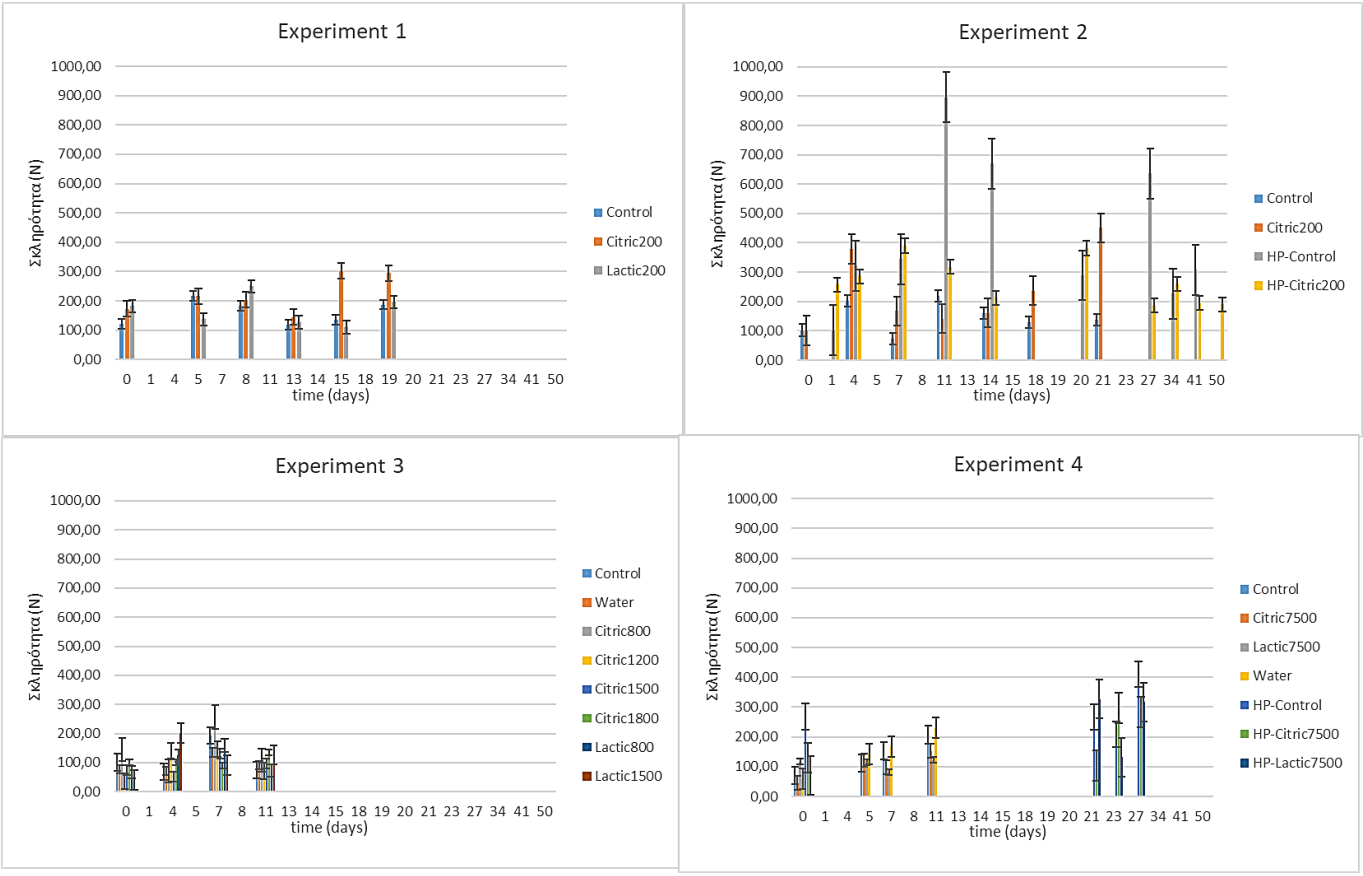


Διάγραμμα 5.8: Μεταβολή του δείκτη Ε σε συνάρτηση με το χρόνο κατά την αποθήκευση των φιλέτων λαβρακιού στους 0±0.4ºC ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

Από το διάγραμμα (Διάγραμμα 5.8) φαίνεται ότι δεν μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για τη μεταβολή του δείκτη Ε σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρόλα αυτά, παρατηρείται ότι η τιμή του επηρεάζεται από την συνθήκη επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται εμφανής διαφορά με υψηλότερες τιμές του δείκτη Ε στα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση. Αυτό επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί με αύξηση της πίεσης ο δείκτης L αυξάνεται (Cheret et al., 2005). Η επεξεργασία με νερό και οξέα φαίνεται ότι δεν προκαλεί διαφοροποίηση στις τιμές που λαμβάνει ο συγκεκριμένος δείκτης οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 48-67, ενώ για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση μεταξύ 76-85.

5.6 Ανάλυση υφής

Κατά την ανάλυση υφής θα εξεταστεί το μέγεθος της σκληρότητας:

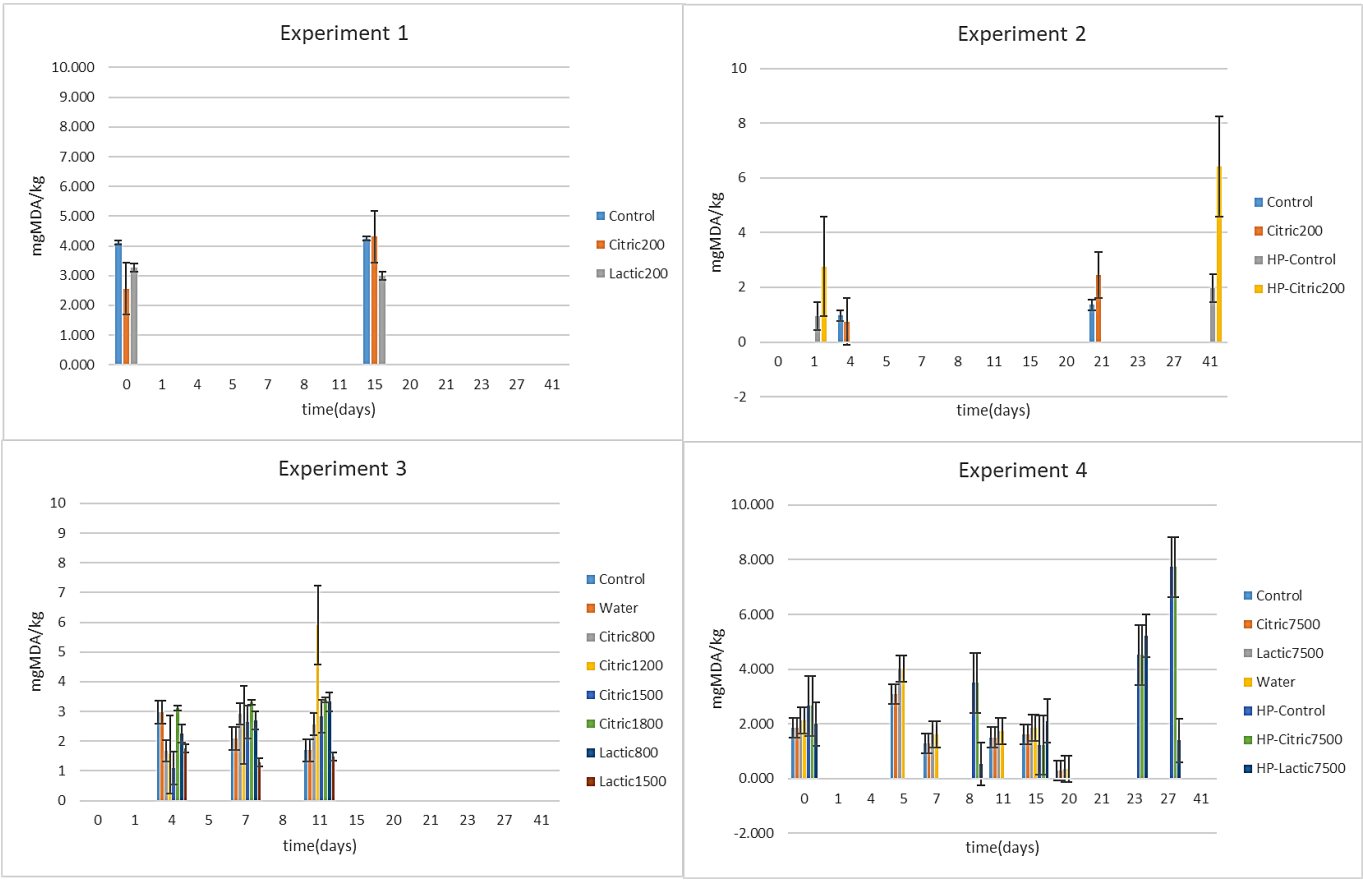


Διάγραμμα 5.9: Μεταβολή της σκληρότητας με την πάροδο του χρόνου σε φιλέτα λαβρακιού αποθηκευμένα στους 0±0.4ºC ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

Από το διάγραμμα της δύναμης της σκληρότητας (Διάγραμμα 5.7) δεν παρατηρείται κάποια σαφή τάση της μεταβολής της σε συνάρτηση με το χρόνο. Φαίνεται ότι και σε αυτήν την περίπτωση, μεγαλύτερες τιμές σκληρότητας παρατηρούνται στα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Tsironi et al., 2019). Όσον αφορά στα δείγματα που εμβαπτίσθηκαν σε νερό και οξέα δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 35-450N. Για τα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση οι τιμές βρίσκονται μεταξύ 100-890N.

5.7 Προσδιορισμός οξείδωσης λιπαρών (TBARS)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η πορεία της οξείδωσης των λιπαρών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 0±0.4ºC για επιλεγμένες μέρες δείγματοληψίας:



Διάγραμμα 5.10: Μεταβολή της οξείδωσης των λιπαρών συναρτήσει του χρόνου σε φιλέτα λαβρακιού αποθηκευμένα στους 0±0.4ºC ανά πείραμα για κάθε επεξεργασία

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, σε καμία συνθήκη επεξεργασίας δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την οξείδωση των λιπαρών συναρτήσει του χρόνου. Παρόλα αυτά συγκρίνοντας τα δείγματα, μετά την εφαρμογή της Υπερυψηλής Πίεσης η οξείδωση των λιπαρών αυξήθηκε και σε κάποια δείγματα φθάνει ακόμη και στα όρια κατανάλωσης (7-8 mg MDA/kg). Επομένως συμπεραίνεται ότι η οξείδωση των λιπαρών δεν αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φιλέτων λαβρακιού.

6 Συζήτηση Αποτελεσμάτων, Συμπεράσματα και Προτάσεις

Αντικείμενο της μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν η εφαρμογή των μεθόδων της Υπερυψηλής Πίεσης και της εξυγίανσης με υδατικά διαλύματα κιτρικού και γαλακτικού οξέος διαφόρων συγκεντρώσεων καθώς και ο συνδυασμός τους, που έχουν ως στόχο την επέκταση του χρόνου ζωής φιλέτων λαβρακιού κατά την αποθήκευσή τους στους 0±0.4^{o}C. Ο προσδιορισμός της διατηρησιμότητας έγινε μέσω μικροβιολογικών αναλύσεων με τη μικροβιακή ανάπτυξη να περιγράφεται με χρήση μοντέλου πρόρρησης (μοντέλο Baranyi). Το ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εξασφάλιση της ποιότητας των ιχθυηρών οδηγεί τους επιστήμονες να ανακαλύψουν νέες εναλλακτικές μεθόδους για την παραγωγή προϊόντων με μεγάλη διατηρησιμότητα και τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Επομένως, σε ένα μέρος από το σύνολο των δειγμάτων, έγινε εξυγίανση με νερό και υδατικά διαλύματα κιτρικού και γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 200, 800, 1200, 1500, 1800, και 7500 ppm όπου πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση των φιλέτων λαβρακιού για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στα υπόλοιπα δείγματα έγινε επεξεργασία με χρήση Υπερυψηλής Πίεσης 300 MPa για 5 λεπτά. Κάποια δείγματα υποβλήθηκαν σε συνδυαστική επεξεργασία με εξυγίανση με διάλυμα κιτρικού οξέος 200 και 7500ppm και γαλακτικού οξέος 7500ppm για 10 λεπτά καθώς και με χρήση Υπερυψηλής Πίεσης στα 300 MPa για 5 λεπτά, με σκοπό να μελετηθεί πιθανή συνεργιστική δράση των δύο διαφορετικών μεθόδων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής των φιλέτων λαβρακιού. Σε όλα δείγματα έγινε μικροβιολογική ανάλυση, μελέτη της μεταβολής της τιμής του pH, του χρώματος, της υφής καθώς και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων σε συνάρτηση με το χρόνο.

Ο χρόνος ζωής των δειγμάτων υπολογίσθηκε από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC) με αποδεκτό όριο αλλοίωσης το 7 log(CFU)/g. Επιπλέον λαμβάνεται υπόψη ότι η επεξεργασία και

ανάλυση των δειγμάτων έγινε έπειτα από 2 μέρες από την αλίευσή τους, το οποίο προστίθεται στο συνολικό χρόνο ζωής των φιλέτων λαβρακιού.

- **Στο 1ο πείραμα** όπου πραγματοποιήθηκε μόνο η μέθοδος της εξυγίανσης, παρατηρήθηκε πιο αργή μικροβιακή ανάπτυξη για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και το μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta*. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο δεν επηρεάστηκε για κανένα μελετώμενο μικροοργανισμό. Συμπερασματικά η συγκέντρωση των διαλυμάτων (200ppm) φάνηκε ότι δεν ήταν αρκετή έτσι ώστε να προκληθεί σημαντική αύξηση στο χρόνο ζωής των φιλέτων λαβρακιού.

Πίνακας 6.1: Χρόνος ζωής σε μέρες με βάση την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC) για τα φιλέτα λαβρακιού του 1ου πειράματος

	Shelf life (days)
Control	7 μέρες
Citric200	8 μέρες
Lactic200	9 μέρες

- **Στο 2ο πείραμα** όπου έγινε εξυγίανση των φιλέτων, επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση και συνδυαστική εφαρμογή τους, παρατηρήθηκε ότι υψηλή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης για όλους τους μικροοργανισμούς είχαν τα φιλέτα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση. Επίσης στην περίπτωση αυτή ήταν μειωμένο και το αρχικό μικροβιακό φορτίο όπου για τα βακτήρια που παράγουν H_2S, τις ζύμες/μύκητες και για τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae* spp.) ήταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος κάτω από το όριο ανίχνευσης (≤1 log(CFU)/g για τα βακτήρια που παράγουν H_2S και τα εντεροβακτήρια, και ≤2 log(CFU)/g για τις ζύμες/μύκητες). Ο συνδυασμός των μεθόδων δεν οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση του χρόνου ζωής των φιλέτων λαβρακιού.

Πίνακας 6.2: Χρόνος ζωής σε μέρες με βάση την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC) για τα φιλέτα λαβρακιού του 2ου πειράματος

	Shelf life (days)
Control	8 μέρες
Citric200	9 μέρες
HP-Control	22 μέρες
HP-Citric200	22 μέρες

- **Στο 3ο πείραμα** όπου έγινε εξυγίανση των φιλέτων λαβρακιού σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων, παρατηρήθηκε αρκετά υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο για όλους τους μικροοργανισμούς (για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα κυμαίνονταν μεταξύ 4.10-4.60 log(CFU)/g). Για κανέναν μικροοργανισμό δεν παρατηρήθηκε επιβράδυνση στην ανάπτυξή του, γεγονός που σημαίνει ότι οι τιμές των συγκεντρώσεων δεν ήταν αρκετές έτσι ώστε να προκληθεί αύξηση του χρόνου ζωής των φιλέτων λαβρακιού. Επιπλέον η εμβάπτιση σε νερό δεν οδήγησε σε καμία διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Πίνακας 6.3: Χρόνος ζωής σε μέρες με βάση την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC) για τα φιλέτα λαβρακιού του 3ου πειράματος

	Shelf life (days)
Control	6 μέρες
Water	7 μέρες
Citric800	7 μέρες
Citric1200	7 μέρες
Citric1500	6 μέρες
Citric1800	6 μέρες
Lactic800	7 μέρες
Lactic1500	6 μέρες

- **Στο 4ο πείραμα** επιλέχθηκε να γίνει αύξηση της συγκέντρωσης των οξέων με ένα μέρος των δειγμάτων να υποβληθεί και σε επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση έτσι ώστε να μελετηθεί πιθανή συνεργιστική δράση. Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των 7500ppm προκάλεσε πιο αργή ανάπτυξη κυρίως για τους

μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp., Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC) και ζύμες/μύκητες. Η επεξεργασία με νερό δεν οδήγησε σε καμία διαφοροποίηση στη μεταβολή. Σε ακόμη καλύτερα αποτελέσματα οδήγησε η μέθοδος της Υπερυψηλής Πίεσης, με το αρχικό μικροβιακό φορτίο να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης και συγκεκριμένα για τα βακτήρια που παράγουν H_2S δεν αυξήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και ο ρυθμός ανάπτυξης τους ήταν μηδενικός. Κατά τον συνδυασμό των μεθόδων, παρατηρήθηκε οριακή αύξηση του χρόνου ζωής (1 ημέρα) και έτσι θεωρείται ότι δεν μπορεί να επικυρωθεί ότι λειτούργησαν συνεργιστικά για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC).

Πίνακας 6.4: Χρόνος ζωής σε μέρες με βάση την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC) για τα φιλέτα λαβρακιού του 4ου πειράματος

	Shelf life (days)
Control	8 μέρες
Citric7500	11 μέρες
Lactic7500	10 μέρες
Water	7 μέρες
HP-Control	17 μέρες
HP-Citric7500	18 μέρες
HP-Lactic7500	18 μέρες

Συμπερασματικά, η εξυγιάνση με νερό και κιτρικό και γαλακτικό οξύ είχε σημαντική επίδραση στην μείωση του ρυθμού αλλοίωσης των φιλέτων λαβρακιού, μόνο στην συγκέντρωση των 7500ppm όπου παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου ζωής κατά 2-3 μέρες. Η μέθοδος της Υπερυψηλής Πίεσης φάνηκε πολύ δραστική με σημαντική μείωση του αρχικού μικροβιακού φορτίου και επακόλουθα την επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και την αύξηση του χρόνου ζωής, που έφθασε τις 14 μέρες. Ο συνδυασμός των μεθόδων προκάλεσε οριακή αύξηση του χρόνου ζωής των φιλέτων λαβρακιού, και έτσι η συνέργεια τους δεν μπορεί να τεκμηριωθεί.

Όσον αφορά στη τιμή του pH, διατηρήθηκε πρακτικά σταθερή κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, με μικρές ανοδικές και καθοδικές τάσεις που

οφείλονταν σε μικροβιολογικές και μεταβολικές δραστηριότητες που συμβαίνουν στο μυϊκό ιστό των φιλέτων λαβρακιού. Το εύρος των τιμών pH που καταγράφηκαν για όλα τα δείγματα ήταν μεταξύ 6.5-6.9.

Ο δείκτης του χρώματος δεν εμφάνισε διαφοροποίηση στη μεταβολή του συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξησή του στα δείγματα που υποβλήθηκαν σε Υπερυψηλή Πίεση.

Από την ανάλυση υφής προκύπτει το ίδιο συμπέρασμα για την σκληρότητα η οποία λάμβανε υψηλότερες τιμές δύναμης στα δείγματα που επεξεργάσθηκαν με Υπερυψηλή Πίεση χωρίς σαφή τάση μεταβολής συναρτήσει του χρόνου.

Τέλος, από την οξείδωση των λιπαρών (TBARS), δεν εξήχθησαν συμπεράσματα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι με χρήση της μεθόδου της Υπερυψηλής Πίεσης προκύπτουν προϊόντα υψηλής ποιότητας, μικροβιακά πιο σταθερά με αυξημένη διατηρησιμότητα. Από την μέθοδο της εξυγίανσης φάνηκε ότι η τιμή της συγκέντρωσης των οξέων είναι καθοριστική και σε αυξημένες τιμές πραγματοποιείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών και αύξηση του χρόνου ζωής των δειγμάτων. Η συνδυαστική εφαρμογή δεν προκάλεσε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση του χρόνου ζωής υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Για ένα προϊόν όπως το φιλέτο λαβρακιού που έχει αρκετά υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο, άρα αλλοιώνεται με γρήγορους ρυθμούς, κρίνεται σκόπιμο να μελετηθούν μέθοδοι περαιτέρω επιβράδυνσης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Σχετικά με την Υπερυψηλή Πίεση, εκτός από την εφαρμογή που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, μπορούν να αναζητηθούν διαφορετικές συνθήκες όπως αύξηση της πίεσης, αύξηση του χρόνου εφαρμογής ή αυξομείωση της έντασης στον ίδιο χρόνο επεξεργασίας (δημιουργία παλμών). Όσον αφορά στην μέθοδο της εξυγίανσης προτείνεται η αύξηση της συγκέντρωσης καθώς και ο συνδυασμός δύο ή και παραπάνω οξέων στο διάλυμα εμβάπτισης για να μελετηθεί πιθανή συνεργιστική δράση των οξέων. Επιπλέον, για τα ιχθυηρά με υψηλή λιποπεριεκτικότητα που οξειδώνονται εύκολα, προτείνεται η μελέτη μεθόδων που επιβραδύνουν τα φαινόμενα οξείδωσης όπως προσθήκη αντιοξειδωτικών ή/και αντιμικροβιακών παραγόντων. Τέλος, μπορούν να προταθούν και άλλοι μη θερμικές

μέθοδοι επεξεργασίας που αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη όπως είναι η χρήση Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων καθώς και η χρήση ενναλακτικών συσκευασιών αποθήκευσης.

7 Βιβλιογραφία

Ameen, S. M., & Caruso, G. (2017). Lactic acid in the food industry. Springer (May).

Apelblat, A. (2014). Citric acid. Springer (December 2014)

Balasubramaniam, V. M., & Farkas, D. (2008). High-pressure food processing. *Food Science and Technology International*, *14*(5), 413–418.

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, *26*(2), 199–218.

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P.. 2009. Food Chemistry. *Springer*. 4th Revised and extended edition. Pages 617-639

Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A., Bozoglu, F., & Demazeau, G. (2008). Compression heating of selected pressure transmitting fluids and liquid foods during high hydrostatic pressure treatment. *Journal of Food Engineering*, *85*(3), 466–472.

Cacace, F., Bottani, E., Rizzi, A., & Vignali, G. (2020). Evaluation of the economic and environmental sustainability of high pressure processing of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *60* (December 2019).

Cadun, A., Cakli, S., & Kisla, D. (2005). A study of marination of deepwater pink shrimp (Parapenaeus longirostris, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry*, *90*(1–2), 53–59.

Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (Sparus aurata) and sea bass (Dicentrarchus labrax) while stored in ice. *Food Control*, *18*(5), 391–397.

Chandra, M. V., & Shamasundar, B. A. (2015). Texture profile analysis and functional properties of gelatin from the skin of three species of fresh water fish. *International Journal of Food Properties*, *18*(3), 572–584.

Chawla, R., Patil, G. R., & Singh, A. K. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing: A review. *Journal of Food Science and Technology*, *48*(3), 260–268.

Chéret, R., Chapleau, N., Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., & De Lamballerie, M. (2005). Effects of high pressure on texture and microstructure of sea bass (Dicentrarchus labrax L.) fillets. *Journal of Food Science*, *70*(8), e477–e483.

Datta, R., Tsai, S., Bonsignore, P., Moon, S., & Frank, J. R. (1995). *and Lactic Acid Derivatives*. *16*, 221–231.

Ανόργ.

Farid, M., Bal'a, A., & Marshall, D. L. (1998). Organic acid dipping of catfish fillets: Effect on color, microbial load, and Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*, *61*(11), 1470–1474.

Farkas, D. F., & Hoover, D. G. (2000). High pressure processing. *Journal of Food Science*, *65*(8 SPEC. SUPPL.), 47–64.

García-Soto, B., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. P. (2014). Use of citric and lactic acids in ice to enhance quality of two fish species during on-board chilled storage. *International Journal of Refrigeration*, *40*, 390–397.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 121–137.

Gutiérrez, E., Lozano, S., & Guillén, J. (2020). Efficiency data analysis in EU aquaculture production. *Aquaculture*, *520*(December 2019).

Haard, N. F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, *25*(4), 289–307.

Hall, H. K., Karem, K. L., & Foster, J. W. (1995). Molecular Responses of Microbes to Environmental pH stress. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 37, Issue C).

Hill, C., O'Driscoll, B., & Booth, I. (1995). Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, *28*(2), 245–254.

Jiménez, A., Peltzer, M., & Ruseckaite, R. (Eds.). (2014). Poly (lactic acid) science and technology: processing, properties, additives and applications (No. 12). *Royal Society of Chemistry* (November).

Kaimakoudi, E., Polymeros, K., Schinaraki, M.-G., & Batzios, C. (2013). Consumers' Attitudes towards Fisheries Products. *Procedia Technology*, *8*(Haicta), 90–96.

Kaitaranta, J. K. (1992). Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *69*(8), 810–813.

Kristiansen, B., Linden, J., & Mattey, M. (Eds.). (1998). Citric acid biotechnology. *CRC press*.

Kyrana, V. R., & Lougovois, V. P. (2002). Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (Dicentrarchus labrax) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, *37*(3), 319–328.

Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. *In Advances in fish science and technology: papers presented at the Jubilee conference of the Torry Research Station, Aberdeen, Scotland*, 23-27 July 1979, edited by JJ Connell and staff of Torry Research Station. Farnham, Surrey, England, Fishing News Books, 1980.

Løvaas, E. (1992). A sensitive spectrophotometric method for lipid hydroperoxide determination. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *69*(8), 777–783.

Lullien-Pellerin, V., & Balny, C. (2002). High-pressure as a tool to study some proteins' properties: Conformational modification, activity and oligometric dissociation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *3*(3), 209–221.

Lund, B., Baird-Parker, A. C., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W., & Gould, G. W. (Eds.). (2000). Microbiological safety and quality of food (Vol. 1). *Springer Science & Business Media.*

Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, *9*(4), 611–628.

Matser, A. M., Stegeman, D., Kals, J., & Bartels, P. V. (2000). Effects of high pressure on colour and texture of fish. *High Pressure Research*, *19*(1–6), 109–115.

Medina-Meza, I. G., Barnaba, C., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2014). Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *22*, 1–10.

Mokrani, D., Oumouna, M., & Cuesta, A. (2018). Fish farming conditions affect to European sea bass (Dicentrarchus labrax L.) quality and shelf life during storage in ice. *Aquaculture*, *490*(December 2017), 120–124.

Mota, M. J., Lopes, R. P., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2013). Microorganisms under high pressure - Adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, *31*(8), 1426–1434.

Ohshima, T., Ushio, H., & Koizumi, C. (1993). High-pressure processing of fish and fish products. *Trends in Food Science and Technology*, *4*(11), 370–375.

Oliveira, F. A. de, Neto, O. C., Santos, L. M. R. dos, Ferreira, E. H. R., & Rosenthal, A. (2017). Effect of high pressure on fish meat quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *66*, 1–19.

Paramithiotis, S. (Ed.). (2017). Lactic acid fermentation of fruits and vegetables. *CRC Press* (Febrouary).

Parlapani, F. F., Haroutounian, S. A., Nychas, G. J. E., & Boziaris, I. S. (2015). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2°C. *Food Microbiology*, *50*, 44–53.

Perdikaris, C., & Paschos, I. (2010). Organic aquaculture in Greece: A brief review. *Reviews in Aquaculture*, *2*(2), 102–105.

Poli, B. M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Mecatti, M., Lupi, P., Gualtieri, M., & Franci, O. (2001). Quality outline of European sea bass (Dicentrarchus labrax) reared in Italy: Shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture*, *202*(3–4), 303–315.

Rasanayagam, V., Balasubramaniam, V. M., Ting, E., Sizer, C. E., Bush, C., & Anderson, C. (2003). Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*, *68*(1), 254–259.

Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(1), 69–112.

Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2002). Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(3), 555–564.

Sallam, K. I. (2007). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry*, *101*(2), 592–600.

Sanjuás-Rey, M., García-Soto, B., Barros-Velázquez, J., Fuertes-Gamundi, J. R., & Aubourg, S. P. (2011). Effect of a two-step natural organic acid treatment on microbial activity and lipid damage during blue whiting (Micromesistius poutassou) chilling. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(5), 1021–1030.

Schubring, R., Meyer, C., Schlüter, O., Boguslawski, S., & Knorr, D. (2003). Impact of high pressure assisted thawing on the quality of fillets from various fish species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *4*(3), 257–267.

Seefeldt, M. B., Ouyang, J., Froland, W. A., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (2009). High-pressure refolding of bikunin: Efficacy and thermodynamics. *Protein Science*, *13*(10), 2639–2650.

Teixeira, B., Fidalgo, L., Mendes, R., Costa, G., Cordeiro, C., Marques, A., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2014). Effect of high pressure processing in the quality of sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets: Pressurization rate, pressure level and holding time. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *22*, 31–39.

Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B., & Aksnes, A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *146*(3), 395–401.

Truong, B. Q., Buckow, R., Stathopoulos, C. E., & Nguyen, M. H. (2015). Advances in High-Pressure Processing of Fish Muscles. *Food Engineering Reviews*, *7*(2), 109–129.

Tsironi, T., Anjos, L., Pinto, P. I. S., Dimopoulos, G., Santos, S., Santa, C., Manadas, B., Canario, A., Taoukis, P., & Power, D. (2019). High pressure processing of European sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets and tools for flesh quality and shelf life monitoring. *Journal of Food Engineering*, *262*(May), 83–91.

Tsironi, T., Houhoula, D., & Taoukis, P. (2020). Hurdle technology for fish preservation. *Aquaculture and Fisheries*, *5*(2), 65–71.

Αλεξανδράκης Ζ. Σ. (2015). Μελέτη Βιοχημικών, Καταλυτικών και Δομικών μεταβολών φυτικών ενζύμων σε συνθήκες Υπερυψηλής Πίεσης. Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα.

Γκάνιας, Κ. (2015). Καλλιέργεια ιχθύων: Παραδείγματα και εφαρμογές από την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια.

Ταούκης, Π., Τζιά, Κ. (2019). Χημεία, Μικροβιολογία και Αρχές Συντήρησης Τροφίμων. *Εκδόσεις Ε.Μ.Π.* (Αθήνα).

Τζιά, Κ. (2019). Σχεδιασμός Βιομηχανιών Τροφίμων-Διασφάλιση Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων. *Εκδόσεις Ε.Μ.Π.* Αθήνα.

Τσιρώνη Θ..Ν.. 2010, Μελέτη μη θερμικών προκατεργασιών για τη βελτίωση

διατηρησιμότητας ιχθυηρών. Αθήνα.

Χρηστάκης, Γ. (1997). Υδατοκαλλιέργειες και περιβάλλον.