

## Εργαστήριο Ιχθυρών

### Επιστήμη & Τεχνολογία Ιχθυρών και Προϊόντων τους



Αναρτήθηκε στο e-class:  
03 Ιανουαρίου 2021

## Αυτόλυση και Μικροβιακή Αλλοίωση Νωπών Ιχθυρών

Β. Λουγκοβόης, Καθηγητής

Το παρόν εκπαιδευτικό βοήθημα αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του συγγραφέα. Χορηγείται δωρεάν στους φοιτητές του Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων του ΠΑ.Δ.Α., ως συμπληρωματικό υλικό των διαλέξεων θεωρίας του μικτού μαθήματος «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΙΧΘΥΗΡΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥΣ» του οικείου προγράμματος σπουδών.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ιχθυηρά (θαλάσσιοι, λιμναίοι ή ποτάμιοι μη-θερμόαιμοι οργανισμοί) συνιστούν μια εξόχως ανομοιογενή ζωική ομάδα, η οποία περιλαμβάνει εκατοντάδες ετερόκλητα βρώσιμα είδη με ελάχιστες ομοιότητες, πέραν της υδρόβιας προέλευσής τους. Εμφανίζουν πολύπλοκη μικροβιακή οικολογία, δέχονται έντονες περιβαλλοντικές επιδράσεις και είναι εξαιρετικά ευπαθή στις αλλοιώσεις. Ανεπαρκείς πρακτικές στη θάλασσα και τις χερσαίες εγκαταστάσεις προκαλούν ταχεία υποβάθμιση της ποιότητας και μειώνουν δραματικά την εμπορικά ωφέλιμη διάρκεια ζωής. Οι μετασυλλεκτικές απώλειες είναι μεγάλες, με αποτέλεσμα ένα σημαντικό μέρος της παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής ( $\approx 25\%$ ) να μη φτάνει στην κατανάλωση. Η σάρκα των ιχθυηρών αλλοιώνεται πολύ πιο γρήγορα από το κρέας θηλαστικών ζώων και πουλερικών. Οι μεταβολές που οδηγούν στην αλλοίωση οφείλονται σε φυσικές διεργασίες, οι οποίες αρχίζουν ήδη από τη στιγμή της απομάκρυνσης του ιχθυηρού από το φυσικό του περιβάλλον, εξελισσόμενες ταυτόχρονα και ανεξάρτητα από οιαδήποτε σκόπιμη ανθρώπινη παρέμβαση. Η αλλοίωση συνιστά μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, η οποία εκδηλώνεται σταδιακά και αντικατοπτρίζει το σύνθετο αποτέλεσμα *αυτολυτικών διεργασιών* (δράση ενζύμων των ιστών και της πέψης), *βακτηριακής δραστηριότητας* (δράση μικροβιακών ενζύμων), *αυθόρμητων χημικών αντιδράσεων* (οξειδωτικές μεταβολές λιπιδίων-χρωστικών) και *απώλειας συστατικών* της σάρκας, λόγω απόπλυσης του ιχθυηρού από τον τηκόμενο πάγο (Lougonois & Kyraa, 2005). Αναμφίβολα, η μικροβιακή δραστηριότητα αποτελεί μακράν τη συνηθέστερη αιτία αλλοίωσης νωπών αλιευτικών προϊόντων, εκδηλούμενη ως ορατή ανάπτυξη (επιφανειακή βλέννα), μεταβολή της υφής (αποικοδόμηση πρωτεϊνών) και εμφάνιση απω-

θητικής οσμής και δυσάρεστης γεύσης (Gram *et al.*, 2002). Εντούτοις, η σχετική σημασία των διεργασιών (μηχανισμών) που συνδέονται με την εκδήλωση φαινομένων αλλοίωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, σημαντικότεροι εκ των οποίων θεωρούνται το είδος και η σύσταση του ιχθυηρού, το περιβάλλον, η μέθοδος αλιείας, οι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί και οι συνθήκες συντήρησης. Στην παρούσα ενότητα ο όρος “αλλοίωση” χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις μικροβιακές και φυσικοχημικές διεργασίες που μεταβάλλουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ιχθυηρού σε τέτοιο βαθμό, ώστε να το καθιστούν μη-αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση (Gram *et al.*, 2002).

### ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΥΠΑΘΕΙΑΣ ΤΩΝ ΝΩΠΩΝ ΙΧΘΥΗΡΩΝ ΣΤΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ

Η εξαιρετική ευπάθεια των ιχθυηρών στις αλλοιώσεις αποδίδεται σε παράγοντες που συνδέονται με την ποικιλόθερμη φύση των οργανισμών αυτών και τη χημική τους σύσταση. Τα ιχθυηρά είναι ζώα ψυχρόαιμα (ποικιλόθερμα). Ανεξαρτήτως προέλευσης (ψυχρά ή θερμά ύδατα), η φυσική τους μικροχλωρίδα περιλαμβάνει μεγάλη αναλογία ψυχρότροφων Gram-αρνητικών βακτηρίων, η ανάπτυξη των οποίων δεν αναστέλλεται στη θερμοκρασία του τηκόμενου πάγου ( $0^{\circ}\text{C}$ ) (Kraft, 1992). Η σάρκα των ιχθυηρών, ιδίως των καρκινοειδών, περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις υδατοδιαλυτών αζωτούχων ενώσεων, οι οποίες αποτελούν άριστο υπόστρωμα για τα περισσότερα ετερότροφα βακτήρια (ICMSF, 2005). Επιπλέον, οι μύες παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα ύδατος ( $a_w \approx 1$ ) και περιέχουν μικρότερη αναλογία δυσδιάλυτου συνδετικού ιστού, σε σχέση με το κρέας των θηλαστικών (Huss, 1995). Η παρουσία οξειδίου τριμεθυλαμίνης (TMAO) στη σάρκα πολλών ιχθυηρών (Seibel & Walsh, 2002) αυξάνει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του μυός και επιτρέπει σε προ-

## Β. Λουγκοβόης

αιρετικά αναερόβιους οργανισμούς να αναπτύσσονται απουσία οξυγόνου (αναερόβια αναπνοή), χρησιμοποιώντας την ένωση αυτή ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Gram, 2009). Βακτήρια όπως τα *Shewanella* spp., *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., και πολλά μέλη των Enterobacteriaceae, ανάγουν το άοσμο ΤΜΑΟ σε τριμεθυλαμίνη (ΤΜΑ), η οποία ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη δυσάρεστη οσμή αμινών που χαρακτηρίζει τα ιχθυηρά μειωμένης φρεσκότητας. Το ΤΜΑΟ συνδέεται κυρίως με θαλάσσιους οργανισμούς, απαντά όμως και σε ορισμένα ψάρια του γλυκού νερού, όπως η πέρκα του Νείλου (*Lates niloticus*) και η τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) (Anthoni *et al.*, 1990). Στους σελάχους (καρχαριοειδή, βατιδοειδή), απαντούν επιπλέον υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO που μετά το θάνατο μεταβολίζονται σε αμμωνία. Η κατά κανόνα χαμηλή περιεκτικότητα των ιστών σε υδατάνθρακες (< 0,5%), συνδυαζόμενη με την παρατεταμένη προ- και επιθανάτια αγωνία, περιορίζει την έκταση της μεταθανάτιας γλυκόλυσης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το pH των ιστών παραμένει σχετικά υψηλό (συνήθως ≥ 6,2), συγκρινόμενο με εκείνο του ερυθρού κρέατος (≈5,6), επιτρέποντας την ανάπτυξη αλλοιογόνων οργανισμών, όπως τα υδροθειούχα βακτήρια *Shewanella* spp., τα οποία είναι ευαίσθητα σε τιμές pH < 6,0 (Dalgaard, 2003. Gram & Huss, 1996). Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων, το δέρμα δεν απομακρύνεται, αλλά παραμένει προσκολλημένο στη σάρκα, διατηρώντας το κατά κανόνα υψηλό μικροβιακό του φορτίο. Επιπλέον, διατηρείται έφυγρο από το νερό της τήξης του πάγου, συνθήκη που ευνοεί τη βακτηριακή αύξηση. Τα περισσότερα ιχθυηρά δεν εκσπλαχνίζονται, ενώ όταν πραγματοποιείται εκσπλαχνισμός, αυτός είναι συνήθως όψιμος, γεγονός που ευνοεί την είσοδο βακτηρίων από τον πεπτικό σωλήνα στη σάρκα (Ashie *et al.*, 1996). Ακόμη, το λιπιδικό κλάσμα των ιχθυηρών χαρακτηρίζεται, εν γένει, από υψηλή αναλογία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (long chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA), τα οποία είναι ευπαθή σε οξειδωτικές και υδρολυτικές μεταβολές.

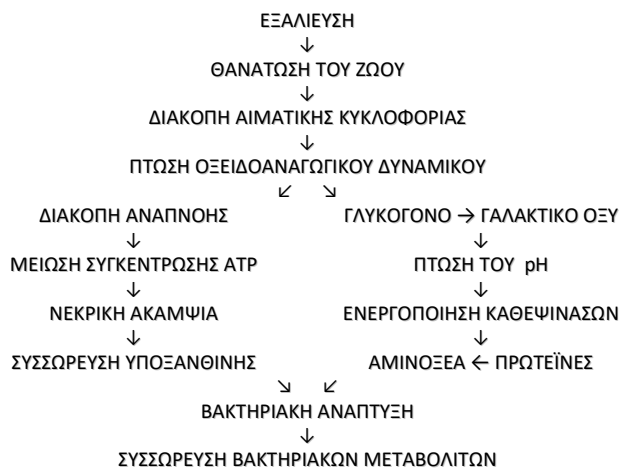
## ΓΕΝΙΚΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΙΚΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ

Κατά τη στιγμή της θανάτωσης του ζώου η καρδιά σταματάει να πάλλεται, η αιματική κυκλοφορία διακόπτεται και ο ανεφοδιασμός των ιστών με οξυγόνο και μεταβολίσιμα υποστρώματα, όπως η γλυκόζη, αναστέλλεται. Η προσαγωγή βιταμινών και αντιοξειδωτικών ουσιών δεν είναι πλέον εφικτή και ο ορμονικός έλεγχος του μεταβολισμού ανατρέ-

## Αυτόλυση και Μικροβιακή Αλλοίωση Νωπών Ιχθυηρών

πεται. Κάτω από τις συνθήκες αυτές, το φυσικό ρυθμιστικό σύστημα του οργανισμού παύει να λειτουργεί και η παραγωγή ενέργειας περιορίζεται δραματικά. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την απαρχή μιας σειράς σημαντικών μεταβολών στο μυϊκό ιστό, οι κυριότερες από τις οποίες συνδέονται με την έλλειψη οξυγόνου (ανοξικές συνθήκες) και τη συσσώρευση απόβλητων προϊόντων του μεταβολισμού, κυρίως γαλακτικού οξέος και H<sup>+</sup>. Η διακοπή της αιματικής κυκλοφορίας επιβάλλει σημαντικούς περιορισμούς. Πολύ γρήγορα, η λειτουργία των μιτοχονδρίων αναστέλλεται σε όλα τα κύτταρα, πλην των επιφανειακών, λόγω εξάντλησης του εσωτερικού οξυγόνου. Στο σημείο αυτό διακόπτεται ο οξειδωτικός μεταβολισμός των λιπιδίων. Η συνεχιζόμενη δράση διαφόρων ATP-ασών, και ειδικότερα της ATP-άσης της μυοσίνης (υπεύθυνης για τη διατήρηση του μυϊκού τόνου) και σε μεγαλύτερο βαθμό της ATP-άσης του συστήματος των κυτταρικών μεμβρανών, προκαλεί βαθμιαία αποικοδόμηση των ενεργειακών αποθεμάτων. Η ATP αναγεννάται προσωρινά από την αντίδραση μεταξύ ADP και φωσφοκρεατίνης (ή φωσφοαργινίνης στα κεφαλόποδα), όπως συμβαίνει *in vivo*. Μετά την εξάντληση των αποθεμάτων CP (ή AP), συνθήκη που εμφανίζεται πολύ σύντομα, η γλυκόλυση αποτελεί τη μοναδική πηγή παραγωγής ενέργειας, αδυνατεί ωστόσο να διατηρήσει τη συγκέντρωση ATP στα φυσιολογικά επίπεδα. Καθώς η γλυκολυτική δραστηριότητα βαίνει επιβραδυνόμενη, τα επίπεδα ATP μειώνονται ταχύτατα, με το μεγαλύτερο μέρος του αδενινο-νουκλεοτιδίου να έχει αποικοδομηθεί εντός 24 ωρών από το θάνατο του ιχθυηρού, ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες (Foegeding *et al.*, 1996). Οι ATP και ADP δρουν ως πλαστικοποιητές (plasticizers) που διατηρούν το μυ σε κατάσταση χαλάρωσης, αποτρέποντας τη σύνεση των συστατικών πρωτεϊνών ακτίνης και μυοσίνης. Όταν η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων αυτών μειωθεί από το αρχικό επίπεδο των 7-10 μmol g<sup>-1</sup> σε <1 μmol g<sup>-1</sup> μυϊκού ιστού, οι μυοϊνδικές πρωτεΐνες συσπώνται μηαντιστρεπτά και οι μύες εισέρχονται στην κατάσταση της νεκρικής ακαμψίας (*rigor mortis*), καθιστάμενοι δύσκαμπτοι, σκληροί και ανελαστικοί (Huss, 1995). Το διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ θανάτωσης του ζώου και έναρξης (*onset*) της νεκρικής ακαμψίας, καθώς και ο απαιτούμενος χρόνος για τη λύση του φαινομένου (*resolution*), εξαρτώνται από παράγοντες όπως το είδος, το μέγεθος και η φυσική κατάσταση του ιχθυηρού, ο τύπος του μυός, η θερμοκρασία συντήρησης, οι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί και η προθανάτια αγωνία (Sigholt *et al.*, 1997. Jerrett *et al.*, 1998). Ταχεία εγκατάσταση της νεκρικής ακαμψίας διαπιστώνεται σε ψάρια που διέρχονται έντονο προθανάτιο *stress* ή στερούνται αποθεμάτων γλυκογόνου, λόγω αστίας ή φυσικής εξάντλησης. Η θανάτωση σε παγωμένο νερό (υποθερμία)

οδηγεί επίσης σε ταχεία εγκατάσταση της νεκρικής ακαμψίας, ενώ το θανατηφόρο χτύπημα της κεφαλής καθυστερεί την εκδήλωση του φαινομένου μέχρι και 18 ώρες (Azam *et al.*, 1990. Proctor *et al.*, 1992). Σημαντική καθυστέρηση στην έναρξη της νεκρικής ακαμψίας προκαλείται με καταστροφή του εγκεφάλου του ψαριού (*iki jime*), εφόσον δεν έχει προηγηθεί έντονο προθανάτιο *stress* (Boyd *et al.*, 1984).



Εικόνα 1. Γενικές συνέπειες διακοπής της αιματικής κυκλοφορίας στο μυϊκό ιστό των ψαριών.

Στα ψάρια των ψυχρών θαλασσών, υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης επιταχύνουν την εμφάνιση και ενισχύουν την ένταση του φαινομένου. Η ταχεία εγκατάσταση της νεκρικής ακαμψίας, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ισχυρών τάσεων εντός του μυός, είναι δυνατό να προκαλέσει ρήξη των μυοκομμάτων και διαχωρισμό των μυοτομίων, κατάσταση που είναι γνωστή ως ρηγμάτωση (*gaping*) (Huss, 1995). Στο μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), η κρίσιμη θερμοκρασία πάνω από την οποία διαπιστώνεται απότομη αύξηση της συχνότητας ρηγμάτωσης των φιλέτων είναι οι 17°C (Huss, 1995). Στα τροπικά ψάρια, η εγκατάσταση της νεκρικής ακαμψίας στους 0°C είναι ταχύτερη απ' ό,τι στους 10°C (Iwamoto *et al.*, 1987. Ushio *et al.*, 1991). Γενικά, σε θερμοκρασίες <10°C, το διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την εκδήλωση μέγιστου βαθμού ακαμψίας των μυών είναι τόσο μεγαλύτερο, όσο μικρότερη είναι η διαφορά μεταξύ θερμοκρασίας εγκλιματισμού και θερμοκρασίας συντήρησης του ψαριού (Abe & Okuma, 1991). Κατά τη διατήρηση σε συνθήκες ψύξης, ο μυς χαλαρώνει βαθμιαία, καθιστάμενος εκ νέου εύκαμπτος, όχι όμως το ίδιο ελαστικός όσο πριν την εκδήλωση του φαινομένου. Η λύση της νεκρικής ακαμψίας, γνωστή και ως διαδικασία "τρυφεροποίησης" (*tenderization process*), παρουσιάζει μεγάλη τεχνολογική σημασία, δεδομένου ότι επηρεάζει άμεσα τη δομαιοθησία της μαγειρεμένης σάρκας (Ashie *et al.*, 1996). Οι μεταβολές υψής που

συνοδεύουν τη λύση της νεκρικής ακαμψίας οφείλονται κυρίως στην αποικοδόμηση των δίσκων Z (*Z disks*) των μυϊκών ινιδίων από μια ουδέτερη πρωτεάση (*μ-καλπαΐνη*) που διεγείρεται παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  και είναι γνωστή ως CAF (*calcium-activated factor*).

## ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ (ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ) ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ

### Αυτόλυση

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, οι πρώτες μεταβολές που διαπιστώνονται μετά το θάνατο οφείλονται σε αυτολυτικές διεργασίες συνδεδεμένες με τη γλυκόλυση και την παραγωγή γαλακτικού οξέος, την προοδευτική αποικοδόμηση νουκλεοτιδίων-νουκλεοζιτών, και τις δομικές αλλαγές των μυοϊνιδίων-πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη νεκρική ακαμψία. Η αυτολυτική διάσπαση σακχάρων και φωσφορυλιωμένων παραγώγων τους, λιπιδίων και ενώσεων που προέρχονται από αυτά, καθώς και ορισμένων 5'-μονονουκλεοτιδίων, όπως η μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) και η μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP), μειώνει τις ευχάριστες, θαλασσινές οσμές-γεύσεις που χαρακτηρίζουν τα ιχθυρά εξαιρετικής φρεσκότητας. Η κύρια οδός για τον καταβολισμό της ATP στους μυς των ψαριών περιλαμβάνει σταδιακή αποφωσφορυλίωση σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), ακολουθούμενη από απαμίνωση της AMP σε μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP), μια ένωση που δρα ως ενισχυτικό γεύσης. Η IMP μετατρέπεται σε ινοσίνη (Ino) και τελικά σε υποξανθίνη (Hx), η οποία εμφανίζει υπόπικρη γεύση και μπορεί να αποικοδομηθεί περαιτέρω σε ξανθίνη και ουρικό οξύ:



Οι αντιδράσεις καταβολισμού της ATP μέχρι το στάδιο της IMP καταλύονται εξ' ολοκλήρου από ενδογενή ένζυμα των ιστών. Στους οστεϊχθύες που συντηρούνται υπό ψύξη, οι αντιδράσεις αυτές εξελίσσονται ταχύτατα και συνήθως έχουν ολοκληρωθεί εντός 24 ωρών από την αλίευση (Botta, 1995). Τα επόμενα στάδια πραγματοποιούνται με σχετικά βραδύ ρυθμό, παρά το γεγονός ότι στην αποικοδόμηση των IMP και Ino, πέραν των ενδογενών ενζύμων, συμμετέχουν και βακτήρια. Αλλοιογόνα στελέχη των *Pseudomonas* και *Shewanella* αποσυνθέτουν τις IMP, Ino και Hx, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταθανάτια αποικοδόμηση των νουκλεοτιδίων δεν συνιστά αμιγώς αυτολυτική διαδικασία (ICMSF, 2005). Τραχείς μετασυσπαστικοί χειρισμοί και φυσικές βλάβες που συνεπάγονται σύνθλιψη ευπαθών ιστών και απελευθέρωση ενζύμων, επιταχύνουν την αποικοδόμηση των μεταβολιτών της ATP. Η χρήση συρόμενων εργαλείων μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των κυτταρικών δομών

## Β. Λουγκοβόης

και ανάμιξη του υποστρώματος με ενδογενή ένζυμα, επηρεάζοντας το ρυθμό των αντιδράσεων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μεταθανάτια πτώση του pH μπορεί να οδηγήσει σε ρηγμάτωση των φιλέτων (μειωμένη μηχανική αντοχή των μυοκομμάτων) και απώλεια οπού (μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού των πρωτεϊνών). Επιπλέον, η μεταφορά περιττωματικών υλών και η διάχυση δραστικών ενζύμων από τον πεπτικό σωλήνα στους παρακείμενους ιστούς, ιδίως κατά την περίοδο έντονης διατροφής των ψαριών, είναι δυνατό να προκαλέσει εκτενή μεταχρωματισμό και μαλθακότητα της σάρκας, ρήξη των κοιλιακών τοιχωμάτων (*belly burst*) και ανάπτυξη δυσάρεστης οσμής (Pigoff & Tucker, 1990).



Εικόνα 2. Τυπική εμφάνιση φιλέτου μπακαλιάρου του Ατλαντικού (άνω) και μεταβολές στην εμφάνιση κατά τη ρηγμάτωση (κάτω).

Μεταχρωματισμός της σάρκας μπορεί επίσης να προκληθεί λόγω διάχυσης αίματος από τους νεφρούς και τη ραχιαία αορτή, ενώ συχνός είναι και ο μεταχρωματισμός του υποδόριου λίπους, λόγω μετανάστευσης καρτενοειδών από το δέρμα (Colby *et al.*, 1993). Συχνά, η μαλθακότητα της σάρκας συνδέεται με τη δράση μυϊκών πρωτεασών, όπως οι καθεψινάσες B, L, D, οι καλπαΐνες ( $Ca^{2+}$  – εξαρτώμενες πρωτεάσες) και οι κολλαγονάσες (Felberg *et al.*, 2010. Shahidi & Janak Kamil, 2001). Οι δομικές μεταβολές που προκαλεί η αυτόλυση των ιστών οδηγούν επίσης σε απώλεια διαφάνειας της σάρκας, λόγω της ανομοιομόρφης σκέδασης του προσπίπτοντος φωτός. Στους τόνους που αλιεύονται με κυκλικά δίχτυα (*purse seining*), η εξαντλητική προσπάθεια των ψαριών να διαφύγουν της αιχμαλωσίας κάτω από συνθήκες έντονου *stress* (μειωμένη παροχή οξυγόνου), λίγο πριν θανατωθούν, αυξάνει δραματικά το ρυθμό και την έκταση της μεταθανάτιας γλυκόλυσης. Η ταχεία πτώση του pH, σε συνδυασμό με την αυξημένη θερμοκρασία σώματος του ψαριού, οδηγεί σε μια κατάσταση που είναι γνωστή ως “*burnt tuna*”: η σάρκα χάνει

## Αυτόλυση και Μικροβιακή Αλλοίωση Νωπών Ιχθυηρών

τη λαμπερή κόκκινη εμφάνισή της, καθιστάμενη ωχρή και θολή, με λασπώδη καφετί χροιά, μαλθακή υφή και υπόξινη γεύση που συνοδεύεται από ιδιάζουσα, μεταλλική υστερόγευση (Lougonois & Kyraa, 2005).



Εικόνα 3. Ερυθρός μεταχρωματισμός φιλέτου πέρκας (*Lates niloticus*), οφειλόμενος σε εκτεταμένη εκχύμωση αίματος.

### Αυθόρμητες χημικές αντιδράσεις

Λιπαρά ψάρια που συντηρούνται στον πάγο μπορεί να εμφανίσουν ταχεία υποβάθμιση ποιότητας, λόγω υδρολυτικών και οξειδωτικών μεταβολών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (Ladikos & Lougonois, 1990). Η οξείδωση  $\omega-3$  LC-PUFA σε αλδεΐδες και κετόνες οδηγεί στην ανάπτυξη ταγκής οσμής-γεύσης, ενώ η συσσώρευση ελεύθερων λιπαρών οξέων ευθύνεται συχνά για την εμφάνιση σαπωνώδους γεύσης. Από την πληθώρα των πτητικών προϊόντων αυτοοξείδωσης που ανιχνεύονται σε ταγκισμένα ψάρια, οι 2,4,7-δεκατριενάλες θεωρούνται κατ'εξοχήν υπεύθυνες για τις χαρακτηριστικές οσμές μουρουνέλαιου, ψαρόλαδου (Lougonois & Kyraa, 2005).

Οι αυθόρμητες χημικές αντιδράσεις που εκδηλώνονται μετά το θάνατο, μπορεί επίσης να προκαλέσουν μεταχρωματισμό της σάρκας του τόνου και άλλων πελαγικών ψαριών που χαρακτηρίζονται από μεγάλη αναλογία ερυθρών μυών, ως αποτέλεσμα οξείδωσης των αιμοπρωτεϊνών (haem-proteins) μυοσφαιρίνης (Mb) και αιμοσφαιρίνης (Hb) στη μετα-( $Fe^{3+}$ )-μορφή (MetMb, MetHb). Στα ψάρια, οι αιμοπρωτεΐνες εντοπίζονται κυρίως στους ερυθρούς μυς και η αιμοσφαιρίνη μπορεί να υπερτερεί της μυοσφαιρίνης από ποσοτική άποψη, λόγω απουσίας αφαιμάξης. Για παράδειγμα, οι συγκεντρώσεις Mb, Hb και κυτοχρώματος c στους ερυθρούς μυς του κολιού (*S. japonicus*) ανέρχονται σε 390, 580 και 13 mg/100 g ιστού, αντίστοιχα, ενώ οι τιμές για τους λευκούς μυς είναι 10 mg/100 g ιστού για το σύνολο της Mb και Hb, και 0,1 mg/100 g για το κυτόχρωμα c. Η μυοσφαιρίνη των ψαριών περιλαμβάνει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης (απουσιάζει από τα θηλαστικά) που έχει την ικανότητα να αντιδρά με σουλφυδρίλια, παρουσία TMAO, προκαλώντας πράσινο μεταχρωματισμό της σάρκας (Chaijan & Panpirat, 2009). Η

κατάσταση αυτή διαπιστώνεται στην παλαμίδα (*Katsuwonus pelamis*) και σε αρκετά είδη τόνου (*Thunnus* spp.) και είναι γνωστή ως “greening tuna”. Στους σολομούς και τις πέστροφες (οικογένεια Salmonidae), η ιδιάζουσα χροιά της σάρκας οφείλεται κυρίως στην ασταξανθίνη, και σε πολύ μικρότερο βαθμό σε άλλα καροτενοειδή, τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν *de novo* από τα ψάρια του γλυκού ή αλμυρού νερού, αλλά προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Η οξειδωτική της ασταξανθίνης σε άχρωμες καρβονυλικές ενώσεις, με την παρέμβαση μιας λιποξειδάσης του δέρματος, οδηγεί σε απώλεια της λαμπερής πορτοκαλί-ρόδινης χροιάς της σάρκας, διεργασία που δεν αναστέλλεται σε συνθήκες ψύξης και σκότους. Ανάλογη επίδραση έχει και ο αποχρωματισμός του β-καροτενίου από μια μυελοϋπεροξειδάση των λευκοκυττάρων του ψαριού, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και ιόντων ιωδίου ή βρωμίου (Colby *et al.*, 1993).

### Μικροβιακή δραστηριότητα

Οι αυτολυτικές μεταβολές που συντελούνται μετά το θάνατο του ιχθυηρού, αν και υποβαθμίζουν την ποιότητα, δεν ευθύνονται για τις έντονα απωθητικές οσμές αμινών, σουλφιδίων και σήψης ή τις ακραίες μεταβολές υφής που οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη των αλλοιωμένων ιχθυηρών και στον χαρακτηρισμό τους ως μη-αποδεκτών για ανθρώπινη κατανάλωση. Τα φαινόμενα αυτά αποδίδονται πρωτίστως στο βακτηριακό μεταβολισμό, ειδικότερα δε στην αναγωγή οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και στην παραγωγή αμμωνίας από ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια (οξειδωτική απαμίνωση), στη συσσώρευση κατώτερων λιπαρών οξέων, στην εκτεταμένη υδρόλυση πρωτεϊνών, και στην αποικοδόμηση θειοαμινοξέων σε θειούχες ενώσεις (Lougonois & Kyrga, 2005). Αρχικά, ο μεταβολισμός της αλλοιογόνου χλωρίδας οδηγεί σε απώλεια των φρέσκων, χαρακτηριστικών οσμών (αποικοδόμηση αλδευδών και κετονών με 6-9 άτομα C, αύξηση του κλάσματος των αλκοολών), και ακολούθως στην ανάπτυξη οσμών αμμωνίας, αμινών, όξινων οσμών και οσμών σήψης. Οι τελευταίες οφείλονται σε ενώσεις, όπως η μεθυλομερκαπτάνη  $\text{CH}_3\text{SH}$ , το διμεθυλοσουλφίδιο  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ , το υδρόθειο  $\text{H}_2\text{S}$ , και αρκετές φαινόλες και διαμίνες. Σε προχωρημένο στάδιο αλλοίωσης (βακτηριακός πληθυσμός  $\geq 10^8 - 10^9$  CFU  $\text{g}^{-1}$ ), η υφή της σάρκας καθίσταται γλωϊώδης, μαλακή και πολτώδης, λόγω εκτεταμένης πρωτεόλυσης.

### Επαφή ιχθυηρού – τηκόμενου πάγου

Οι μεταβολές που προκαλεί η επαφή ιχθυηρού-τηκόμενου πάγου αφορούν κυρίως στην απώλεια διαφάνειας της

σάρκας (απορρόφηση νερού από τις μυϊκές πρωτεΐνες) και στην πιθανή πρόκληση τραυματισμών και λύσεων της συνέχειας του δέρματος που διευκολύνουν τη διείσδυση βακτηρίων στη σάρκα. Παράλληλα, απομακρύνονται υδατοδιαλυτά συστατικά (νουκλεοτίδια, ελεύθερα αμινοξέα) που συμβάλουν στη χαρακτηριστική οσμή και γεύση, λόγω απόπλυσης του ιχθυηρού από το νερό της τήξης του πάγου. Σε ιχθυηρά μειωμένης φρεσκότητας, η απομάκρυνση βακτηριακών μεταβολιτών από τον τηκόμενο πάγο, μπορεί να οδηγήσει σε μικρή βελτίωση της οργανοληπτικής ποιότητας.

## ΑΛΛΟΙΟΓΟΝΟΣ ΧΛΩΡΙΔΑ ΝΩΠΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Ο μυϊκός ιστός υγιών, ζωντανών ή πρόσφατα αλιευμένων ψαριών είναι πρακτικά στείρος. Η φυσική μικροβιακή χλωρίδα εντοπίζεται κυρίως στο δέρμα και στην εξωτερική βλέννα, στα βράγχια και στο γαστρεντερικό σωλήνα, αντικατοπτρίζοντας τη χλωρίδα του υδάτινου περιβάλλοντος και της τροφής που λαμβάνει το ψάρι. Μικροοργανισμοί απαντούν και στα εσωτερικά όργανα (σπλήνας, νεφροί, ήπαρ) (Austin, 2006). Ο μικροβιακός πληθυσμός εμφανίζει εποχιακές διακυμάνσεις και επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και ο βαθμός μόλυνσης των υδάτων, η μέθοδος αλιείας, οι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί και οι συνθήκες υγιεινής στο αλιευτικό σκάφος (Sikorski *et al.*, 1990). Η διάδοση των μικροοργανισμών στις μεγάλες υδάτινες μάζες δεν είναι ομοιόμορφη. Η ανοιχτή θάλασσα παρουσιάζει συνήθως χαμηλό μικροβιακό φορτίο (π.χ. λίγα CFU  $\text{cm}^{-3}$ ), ενώ η παράκτια ζώνη και ο πυθμένας μπορεί να αριθμούν μέχρι και  $10^6$ - $10^7$  CFU  $\text{cm}^{-3}$ .

Η ποικιλόθερμη φύση των ψαριών επιτρέπει την παρουσία βακτηρίων που αναπτύσσονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών. Στα πρόσφατα αλιευμένα ψάρια των εύκρατων υδάτων, η χλωρίδα κυριαρχείται από ψυχρότροφα γένη βακτηρίων που αντικατοπτρίζουν τις σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες ( $< 10^\circ\text{C}$ ) των μεγάλων υδάτινων μαζών στις εύκρατες και ψυχρές περιοχές του πλανήτη. Η εξωτερική χλωρίδα αποτελείται κυρίως από ασπορογόνους, Gram-αρνητικούς βακίλους που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*. Ακόμη, περιλαμβάνει Gram-θετικά γένη βακτηρίων, κυρίως *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* και *Corynebacterium*, σε κυμαινόμενη αναλογία (Broekaert *et al.*, 2011. Svanevik & Lunestad, 2011. Leroi, 2010; Austin, 2006). Η χλωρίδα των ψαριών του γλυκού νερού κυριαρχείται από τα ίδια γένη ψυχρότροφων Gram-αρνητικών βακίλων, συνήθως όμως περιλαμβάνει μεγαλύτερη αναλογία Gram-θετικών βακτη-

## Β. Λουγκοβόης

ρίων (*Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Coryneforms*), καθώς και μέλη των *Aeromonadaceae* (*Aeromonas* spp.) και *Enterobacteriaceae* (Gram & Huss, 1996. Jay *et al.*, 2005). Τα *Aeromonas* spp. θεωρούνται τυπικά της χλωρίδας των ψαριών του γλυκού νερού, ενώ συνήθως απουσιάζουν από τα θαλασσινά ψάρια. Αντίθετα, βακτήρια που απαιτούν νάτριο για την ανάπτυξή τους, π.χ. *Vibrionaceae* (*Vibrio*, *Photobacterium*) και *Shewanella putrefaciens*, θεωρούνται τυπικά της χλωρίδας των θαλασσινών ψαριών. Στα ανάδρομα ψάρια που γεννούν σε γλυκά νερά, αλλά ως ενήλικα άτομα ζουν στην ανοιχτή θάλασσα, τα αλοανεκτικά *Vibrio* spp. εναλλάσσονται με είδη του γένους *Aeromonas*, κατά τη μετάβαση από το ένα περιβάλλον στο άλλο. Η εντερική χλωρίδα ενήλικων θαλασσινών ψαριών περιλαμβάνει συνήθως μεγάλο αριθμό στελεχών του γένους *Vibrio* (μέχρι και  $10^7$  CFU  $g^{-1}$ ), γεγονός που αντικατοπτρίζει τις ανοξικές συνθήκες του εντέρου. Επιπλέον, περιλαμβάνει οργανισμούς που ανήκουν στα γένη *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Photobacterium* και *Pseudomonas*, καθώς και Gram-θετικούς οργανισμούς, κυρίως *Carnobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* και άλλα σπορογόνα βακτήρια (Austin, 2006. Ringø *et al.*, 1995, 2001).

Η ισορροπία που διατηρεί το ιχθυηρό με την εξωτερική και εσωτερική χλωρίδα ανατρέπεται μετά το θάνατο, με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των βακτηρίων και τη διακοπή λειτουργίας των μηχανισμών που εμποδίζουν τη βακτηριακή εισβολή. Στη διάρκεια των μετασυλλεκτικών χειρισμών και της συντήρησης, διαπιστώνεται σταδιακή μεταβολή του πλήθους, της κατανομής και σύνθεσης της μικροβιακής χλωρίδας. Εντούτοις, από την πληθώρα των μικροοργανισμών που συνιστούν την αρχική χλωρίδα, λίγα μόνο βακτηριακά γένη, γνωστά ως "αλλοιογόνος χλωρίδα", καταφέρνουν να αποικίσουν το ιχθυηρό και να πολλαπλασιαστούν σε μεγάλους αριθμούς (Gram, 2009). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μια ομάδα βακτηρίων επικρατεί έναντι άλλων, στενά σχετιζομένων ομάδων, δεν είναι απόλυτα κατανοητός (Gram *et al.*, 2002). Μικρές αλλαγές στον τύπο της συσκευασίας ή τις συνθήκες συντήρησης μπορεί να προκαλέσουν δραματικές μεταβολές στην ανάπτυξη και σύνθεση της χλωρίδας, οδηγώντας σε ένα εντελώς διαφορετικό προφίλ αλλοίωσης (Gram & Huss, 1996). Κατά το αρχικό στάδιο συντήρησης, ο βακτηριακός πληθυσμός εντοπίζεται κυρίως στις εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες του ιχθυηρού. Τα φαινόμενα της αλλοίωσης αρχίζουν από τα βράγχια, το δέρμα και τον εντερικό σωλήνα, ενώ οι μύες προσβάλλονται τελευταίοι. Την περίοδο της έντονης διατροφής, τα πεπτικά ένζυμα

## Αυτόλυση και Μικροβιακή Αλλοίωση Νωπών Ιχθυηρών

μπορεί να προκαλέσουν ρήξη του εντερικού σωλήνα λίγες ώρες μετά το θάνατο του ψαριού, επιταχύνοντας τη βακτηριακή εισβολή. Βραδεία διεσόδυση βακτηρίων στη σάρκα μπορεί να συμβεί και σε σημεία όπου υπάρχουν λύσεις της συνέχειας του δέρματος, τραυματισμοί ή γδαρσίματα οφειλόμενα σε ανεπαρκείς χειρισμούς. Εντούτοις, η κύρια μικροβιακή δραστηριότητα εκδηλώνεται στις επιφάνειες, αντανακλώντας τον οξειδωτικό χαρακτήρα των διεργασιών που οδηγούν στην αλλοίωση (Jay *et al.*, 2005). Πλέον ευάλωτες είναι οι εκτεθειμένες επιφάνειες τεμαχισμένων ψαριών και φιλέτων.

Μετά την αρχική φάση προσαρμογής, η διάρκεια της οποίας εξαρτάται από τη θερμοκρασία συντήρησης και την προέλευση του ψαριού (εύκρατα ή θερμά ύδατα), τα βακτήρια εισέρχονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Σε αερόβιες συνθήκες και θερμοκρασία 0°C, ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνει ταχύτατα (χρόνος γενεάς  $\approx 1$  ημέρα), προσεγγίζοντας τιμές της τάξης των  $10^8$ - $10^9$  CFU  $g^{-1}$  σάρκας ή  $cm^{-2}$  δέρματος σε 2-3 εβδομάδες, όταν η αλλοίωση είναι πλέον εμφανής (Gram, 2009). Η αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού οφείλεται κυρίως στην ταχεία ανάπτυξη ψυχρότροφων, μη-ζυμωτικών Gram-αρνητικών βακίλων που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Shewanella* (Gram & Huss, 2000). Καθώς εξελίσσεται η βακτηριακή ανάπτυξη, οι βάκιοι αυτοί κυριαρχούν της χλωρίδας, χάριν της καλής προσαρμογής τους στις χαμηλές θερμοκρασίες (μικρότερος χρόνος γενεάς) και της αποτελεσματικής χρησιμοποίησης των εκχυλισματικών ενώσεων της σάρκας του ψαριού. Επιπλέον, πολλά στελέχη *Pseudomonas* παράγουν αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ενώσεις, ενώ παράλληλα σχηματίζουν ισχυρά σιδηροφόρα σύμπλοκα που δεσμεύουν το λιγροστό σίδηρο του υποστρώματος (Gram & Melchiorson, 1996. Gram & Dalgaard, 2002). Σε προχωρημένο στάδιο της συντήρησης σε πάγο, και ανεξάρτητα από την προέλευση του ιχθυηρού (θερμοκρασία - αλμυρότητα υδάτων) και την αρχική σύνθεση της μικροχλωρίδας, ποσοστό 80-90% του μικροβιακού πληθυσμού αποτελείται από στελέχη των *Pseudomonas* και *Shewanella* spp. (θαλασσινά ψάρια), ενώ σε μικρότερη αναλογία ανευρίσκονται *Psychrobacter*, *Acinetobacter* και *Flavobacterium* spp. Όταν δεν εξασφαλίζονται συνθήκες αποτελεσματικής ψύξης (θερμοκρασία συντήρησης  $\geq 8^\circ C$ ), τα βακτήρια εισβάλλουν μαζικά στη σάρκα μέσω των πόρων της πλάγιας γραμμής και των ινών κολλαγόνου. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C), ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνει ταχύτατα, προσεγγίζοντας επίπεδα της τάξης των  $10^7$ - $10^8$  CFU  $g^{-1}$ , εντός 24 ωρών. Στις συνθήκες αυτές, η αλλοιογόνος χλωρίδα κυριαρχείται από ζυμωτικά μεσόφιλα *Vibrionaceae*, και όταν τα ψάρια αλιεύονται σε

μολυσμένα νερά, από μεσόφιλα Enterobacteriaceae (Gram & Huss, 2000. Gram, 2009).

### Ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί

Από το σύνολο των βακτηριακών ειδών που απομονώνονται από το αλλοιωμένο ιχθυηρό, και ως εκ τούτου αποτελούν την αλλοιογόνο χλωρίδα, πολύ λίγα συμμετέχουν στην αλλοίωση, παράγοντας ικανές συγκεντρώσεις δύσσομων μεταβολικών προϊόντων. Για το λόγο αυτό, η έκταση της αλλοίωσης (όπως γίνεται αντιληπτή κυρίως με την όσφρηση) δε είναι απαραίτητο να συμβαδίζει με τις μεταβολές του ολικού μικροβιακού φορτίου (Jay *et al.*, 2005). Ορισμένα βακτήρια, αν και είναι σε θέση να παράγουν δύσσομους μεταβολίτες, αδυνατούν να το πράξουν κάτω από τις συνθήκες που επικρατούν στο προϊόν, ενώ κάποια δεν παράγουν οσμές αλλοίωσης σε στειρό μυϊκό ιστό, παρά μόνο όταν δημιουργηθούν ευνοϊκές συνθήκες από άλλα μέλη της χλωρίδας, π.χ. με την αποικοδόμηση του υποστρώματος και την παροχή θρεπτικών συστατικών ή την απομάκρυνση του O<sub>2</sub> (Gram *et al.*, 2002). Για το λόγο αυτό, η ικανότητα ενός στελέχους να παράγει δύσσομα μεταβολικά προϊόντα αξιολογείται σε συνθήκες ανταγωνισμού ή συμβίωσης με την τυπική αλλοιογόνο χλωρίδα, αφού η αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβιακών ομάδων μπορεί να επηρεάσει τη μεταβολική δραστηριότητα και ανάπτυξή τους (Gram & Dalgaard, 2002). Κατ' επέκταση, η αλλοιογόνος χλωρίδα δεν πρέπει να συγχέεται με τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη που παράγουν τις οσμές αλλοίωσης, και τα οποία είναι γνωστά ως "ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί" (specific spoilage organisms, SSOs) (Dalgaard, 2000). Συχνά, οι οργανισμοί αυτοί αποτελούν μικρό μέρος της αρχικής χλωρίδας και σε αρκετές περιπτώσεις αφορούν ένα μοναδικό είδος. Κάτω από δεδομένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας, οι ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί αυξάνουν ταχύτερα από την υπόλοιπη χλωρίδα, προσεγγίζοντας επίπεδα  $\geq 10^7$  CFU g<sup>-1</sup>, όταν η συσσώρευση δύσσομων μεταβολικών προϊόντων καθιστά το ιχθυηρό οργανοληπτικά απορριπτέο (Dalgaard, 2003). Τα βακτηριακά είδη που συνδέονται συχνότερα με την αλλοίωση νωπών ψαριών συντηρουμένων σε πάγο (αερόβιες συνθήκες) ανήκουν στα γένη *Shewanella* και *Pseudomonas*, με τα βακτήρια *Shewanella putrefaciens* και *S. baltica* να κυριαρχούν στα ψάρια των εύκρατων και ψυχρών θαλασσών που διατηρούνται στους 0-2°C (Dalgaard *et al.*, 2006. Satomi *et al.*, 2006. Vogel *et al.*, 2005. Emborg *et al.*, 2005. Ziemke *et al.*, 1998) και είδη του γένους *Pseudomonas*, π.χ. *P. fragi*, να αποτελούν την ειδική αλλοιογόνο χλωρίδα ψαριών των εσωτερικών υδάτων (ICMSF, 2005). Στα ψάρια των θερμότερων

θαλασσών, η αερόβια αλλοίωση οφείλεται σε *Pseudomonas* spp., από κοινού με στελέχη *Shewanella* (Leisner & Gram, 1999). Ορισμένα στελέχη *Pseudomonas* παράγουν οσμές σουλφιδίων και αμμωνίας, άλλα παράγουν οσμές που θυμίζουν σάπια φρούτα-λαχανικά (εστέρες κατώτερων λιπαρών οξέων), ενώ τα *Shewanella* spp. παράγουν ισχυρές αμμωνιακές και υδροθειούχες οσμές (Lougouois & Kyraia, 2005). Αντίθετα, στελέχη των *Psychrobacter* (π.χ. *P. immobilis*) και *Acinetobacter* που απομονώνονται συχνά από την αλλοιογόνο χλωρίδα σε μεγάλους αριθμούς, δεν παράγουν δύσσομα μεταβολικά προϊόντα και η συμμετοχή τους στην αλλοίωση θεωρείται αμελητέα, παρά το γεγονός ότι αναπτύσσονται καλά σε θερμοκρασίες ψύξης (Dalgaard, 2003). Σε περιβάλλον με περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου, ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. μειώνεται. Αντίθετα, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια όπως τα *S. putrefaciens* και *Photobacterium phosphoreum* που είναι ικανά να χρησιμοποιούν το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης TMAO ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στον αναερόβιο μεταβολισμό, αυξάνουν σε επίπεδα της τάξης του 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> (Leisner & Gram, 1999). Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από μεγάλη παραγωγή τριμεθυλαμίνης και έντονες οσμές αμινών, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται σημαντική παράταση της διάρκειας ζωής του ιχθυηρού. Ψάρια των ψυχρών θαλασσών που συσκευάζονται υπό κενό (VP) και συντηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλοιώνονται από τα δυο αυτά βακτηριακά είδη και η διαφορά μεταξύ των αρχικών πληθυσμών είναι πιθανότατα εκείνη που καθορίζει ποιο εκ των δυο θα κυριαρχήσει (Gram & Huss, 1996). Παρουσία υψηλής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub>, η ανάπτυξη αναπνευστικών οργανισμών (*Pseudomonas* spp., *S. putrefaciens*, *S. baltica*) περιορίζεται σημαντικά και ο πληθυσμός τους σπάνια υπερβαίνει το επίπεδο των 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup> (Gram & Huss, 1996. Stamatis & Arkoudelos, 2007. Ravi Sankar *et al.*, 2008). Εντούτοις, ψάρια των ψυχρών θαλασσών που συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) με υψηλή αναλογία CO<sub>2</sub> δεν εμφανίζουν αξιόλογη παράταση της διάρκειας ζωής, συχνά δε χαρακτηρίζονται από μεγάλη παραγωγή TMA, πολύ μεγαλύτερη εκείνης που παράγεται σε αερόβιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην παρουσία του CO<sub>2</sub>-ανθεκτικού *P. phosphoreum*, το οποίο αυξάνει σε επίπεδα της τάξης των 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> (Dalgaard, 2000. Ruiz-Capillas *et al.*, 2003). Στα ψάρια του γλυκού νερού και των θερμών υδάτων, η συσκευασία σε κενό ή CO<sub>2</sub>-τροποποιημένη ατμόσφαιρα οδηγεί στην επιλογή Gram-θετικής χλωρίδας που κυριαρχείται από γαλακτικά βακτήρια (*Carnobacterium maltaromaticum*, *C. divergens*, *Lactococcus piscium*) και *Brochothrix thermosphacta*, ενώ το *P. phosphoreum* δεν θεωρείται σημαντικό (Powell & Tamplin, 2012. Nosedá *et al.*,

## B. Λουγκοβόης

2012). Στις περιπτώσεις αυτές, η διάρκεια ζωής του συσκευασμένου ψαριού επιμηκύνεται σημαντικά. Τα *Carnobacterium* spp., *L. piscium* και *B. thermosphacta* ευθύνονται για την παραγωγή όξινων οσμών ζύμωσης, τυριού, ποδιών, βουτύρου και καραμέλας (Macé *et al.*, 2013), ενώ ορισμένα LAB παράγουν επιπλέον υδρόθειο (Macé *et al.*, 2012). Κατά την αλλοίωση, ο πληθυσμός των οργανισμών αυτών προσεγγίζει επίπεδα της τάξης του  $10^7$ - $10^8$  CFU g<sup>-1</sup>.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Abe, H. & Okuma, E. (1991). Rigor mortis progress of carp acclimated to different water temperatures, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2095-2100.
- Anthoni, U., Borresen, T., Christophersen, C., Gram, L. & Nielsen, P.H. (1990). Is trimethylamine oxide a reliable indicator for the marine origin of fish? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **97**, 569-571.
- Ashie, I.N.A., Smith, J.P. & Simpson, B.K. (1996). Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36**, 87-121.
- Austin, B. (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal*, **6**, 931-945.
- Azam, K., Mackie, I.M. & Smith, J. (1990). Effect of stunning methods on the time of onset, duration and resolution of rigor in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as measured by visual observation and analysis for lactic acid, nucleotide-degradation products and glycogen. In: *Chilling and freezing of new fish products. Sci. Tech. Froid*. 1990-3. Pp. 351-358. Proceedings of the meeting of Commission C2 I.I.F.-I.I.R. Aberdeen, Scotland.
- Botta, J.R. (1995). *Evaluation of Seafood Freshness Quality*. Pp. 16. New York, NY: VCH Publishers, Inc.
- Boyd, N.S. & Wilson, N.D., Jerrett, A.R. & Hall, B.I. (1984). Effects of brain destruction on post-harvest muscle metabolism in the fish Kaihawai (*Arripis trutta*). *Journal of Food Science*, **49**, 177-179.
- Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F. & Vlaemyneck, G. (2011). Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiology*, **28**, 1162-1169.
- Chaijan, M. & Panpipat, W. (2009). Post Harvest Discoloration of Dark-Fleshed Fish Muscle: A Review. *Walailak Journal of Science & Technology*, **6**, 149-166.
- Colby, J.W., Enriquez-Ibarra, L.G. & Flick, G.J. (1993). Shelf life of fish and shellfish. In: *Shelf Life Studies of Foods and Beverages—Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects* (edited by G. Charalambous). Pp. 85-143. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Dalgaard, P. (2000): Fresh and lightly preserved seafood. In: *Shelf-Life Evaluation of Foods* (edited by C.M.D. Man & A.A. Jones). Pp. 110-139. London: Aspen Publishers, Inc.
- Dalgaard, P. (2003). Spoilage of seafood. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd edn (edited by B. Caballero, L. Trugo & P.M. Finglas). Pp. 2462–2471. Oxford: Elsevier Science Ltd.
- Dalgaard, P., Madsen, H.L., Samieian, N. & Emborg, J. (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 80-95.
- Emborg, J., Laursen, B.G. & Dalgaard, P. (2005). Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C – effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **101**, 263-279.
- Felberg, H.S., Hagen, L., Slupphaug, G., Batista, I., Nunes, M.L., Olsen, R.L. & Martinez, I. (2010). Partial characterisation of gelatinolytic activities in herring (*Clupea harengus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) possibly involved in post-mortem autolysis of ventral muscle. *Food Chemistry*, **119**, 675-683.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C. & Hultin, H.O. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. In: *Food Chemistry. Third edition* (edited by O.R. Fennema). Pp. 879-942. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Gram, L. (2009). Microbiological spoilage of fish and seafood products. In: *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Food Microbiology and Food Safety (edited by W.H. Sperber & M.P. Doyle). Pp. 87-119. New York: Springer Science+ Business Media.
- Gram, L. & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – Problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 262-266.
- Gram, L. & Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 121-137.
- Gram, L. & Huss, H.H. (2000). Fresh and processed fish and shellfish. In: *The Microbiological Safety and Quality of Foods* (edited by B.M. Lund, A.C. Baird-Parker & G.W. Gould). Pp. 472-506. London: Chapman & Hall.
- Gram, L. & Melchiorson, J. (1996). Interaction of two fish spoilage bacteria, *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas* sp., in fish model systems. *Journal of Applied Bacteriology*, **80**, 589-595.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B. & Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **78**, 79-97.
- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper 348*. Pp. 11-17, 35-67, 130-153. Rome: FAO.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2005). *Microorganisms in Foods* (vol. 6). *Microbial Ecology of Food Commodities*. 3. Fish and Fish Products. Pp. 174–249. London: Blackie Academic & Professional.
- Iwamoto, M., Yamanka, H., Watabe, S. & Hashimoto, K. (1987). Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. *Journal of Food Science*, **52**, 1514-1517.



- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*, 7<sup>th</sup> edn. Pp. 109-124. New York: Springer Science + Business Media Inc.
- Jerrett, A.R., Holland, A.J. & Cleaver, S.E. (1998). Rigor contractions in "rested" and "partially exercised" chinook salmon white muscle as affected by temperature. *Journal of Food Science*, **63**, 53-56.
- Kraft, A.A. (1992). *Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage*. Pp. 103-107, 121-146. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Ladikos, D. & Lougovois, V. (1990). Lipid Oxidation in Muscle Foods. A Review. *Food Chemistry*, **35**, 295-314.
- Leisner, J.J. & Gram, L. (1999). Spoilage of Fish. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* (edited by C.A. Batt, P.D. Patel & R.K. Robinson). Pp. 813-820. San Diego, CA: Academic Press.
- Leroi, F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products - Review. *Food Microbiology*, **27**, 698-709.
- Lougovois, V.P. & Kyrana, V.R. (2005). Freshness Quality and Spoilage of Chill-Stored Fish. In: *Food Policy, Control and Research* (edited by A.P. Riley). Pp. 35-86. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.F., Dousset, X. & Joffraud, J.J. (2012). Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiology*, **30**, 164-172.
- Macé, S., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Malcheva, M., Cornet, J., Lalanne, V., Chevalier, F., Sérot, T., Pilet, M.F. & Dousset, X. (2013). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, **160**, 227-238.
- Noseda, B., Islam, Md. T., Eriksson, M., Heyndrickx, M., De Reu, K., Van Langenhove, H. & Devlieghere, F. (2012). Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets. *Food Microbiology*, **30**, 408-419.
- Pigoff, G.M. & Tucker, B.W. (1990). Methods that make fish to die while struggling. In: *Seafood: Effects of Technology on Nutrition*. Pp. 26-27. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Powell, S.M. & Tamplin, M.L. (2012). Microbial communities on Australian modified atmosphere packaged Atlantic salmon. *Food Microbiology*, **30**, 226-232.
- Proctor, M.R.M., Ryan, I.A. & McLoughlin, J.V. (1992). The effects of stunning and slaughter methods on changes in skeletal muscle and quality of farmed fish. *Proceedings from TNO, International Conference-Upgrading and Utilization of Fishery Products*, The Netherlands.
- Ravi Sankar, C.N., Lalitha, K.V., Jose, L., Manju, S. & Gopal, T.K.S. (2008). Effect of packaging atmosphere on the microbial attributes of pearlspot (*Etroplus suratensis* Bloch) stored at 0-2°C. *Food Microbiology*, **25**, 518-528.
- Ringø, E., Strom, E. & Tabachek, J.A. (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, **26**, 773-789.
- Ringø, E., Wesmajervi, M.S., Bendiksen, H.R., Berg, A., Olsen, R.E., Johnsen, T., Mikkelsen, H., Seppola, M., Strom, E. & Holzapfel, W. (2001). Identification and characterization of carnobacteria isolated from fish intestine. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**, 183-191.
- Ruiz-Capillas, C., Saavedra, A. & Moral, A. (2003). Hake slices stored in retail packages under modified atmospheres with CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> enriched gas mixes. *European Food Research and Technology*, **218**, 7-12.
- Satomi, M., Vogel, B.F., Gram, L. & Venkataraman, R. (2006). Description of two *Shewanella* species, *Shewanella hafniensis* sp. nov., and *Shewanella morhaue* sp. nov., isolated from the marine fish of the Baltic Sea, Denmark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 243-249.
- Seibel, B.A. & Walsh, P.J. (2002). Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *The Journal of Experimental Biology*, **205**, 297-306.
- Shahidi, F. & Janak Kamil, Y.V.A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates. *Trends in Food Science and Technology*, **12**, 435-464.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T.S. & Seland, A. (1997). Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, **62**, 898-905.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. & Burt, J.R. (1990). Postharvest biochemical and microbial changes. In: *Seafood: Resources, nutritional composition, and preservation* (edited by Z.E. Sikorski). Pp. 55-75. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Stamatis, N. & Arkoudelos, J. (2007). Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food Control*, **18**, 292-300.
- Svanevik, C.S. & Lunestad, B.T. (2011). Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *International Journal of Food Microbiology*, **151**, 164-170.
- Ushio, H., Watabe, S., Iwamoto, M. & Hashimoto, K. (1991). Ultrastructural evidence for temperature-dependent Ca<sup>2+</sup> release from fish sarcoplasmic reticulum during rigor mortis. *Food Structure*, **10**, 267-275.
- Vogel, B.F., Venkateswaran, K., Satomi, M. & Gram, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the most important H<sub>2</sub>S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6689-6697.
- Ziemke, F., Hofle, M.G., Lalucat, J. & Rossello-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 179-186.

B. Λουγκοβόης, Καθηγητής  
Ιανουάριος 2021