



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
(IV) Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Εξυπνη συσκευασία: Έρευνα και επιλογή
συνδυασμού ενζύμου–υποστρώματος για την
ανάπτυξη ΤΤΙ με χρονο-θερμοκρασιακή απόκριση
κατάλληλη για τον έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας
στη ψυκτική αλυσίδα στρειδιών”**



Επιβλέπων καθηγητής : Πέτρος Σ. Ταούκης

Καλιούπη Καλλιόπη
Αθήνα 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας με θέμα “Έξυπνη συσκευασία: Έρευνα και επιλογή συνδυασμού ενζύμου–υποστρώματος για την ανάπτυξη ΤΠΙ με χρονο-θερμοκρασιακή απόκριση κατάλληλη για τον έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας στη ψυκτική αλυσίδα στρειδιών” πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το εαρινό εξάμηνο 2016. Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο Π.Ταούκης, τον οποίο και ευχαριστώ ιδιαίτερα για την πολύτιμη ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ομάδα του και να δουλέψω υπό την καθοδήγησή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Μαριάννα Γιαννόγλου, για τη συνεργασία, την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις χρήσιμες συμβουλές της για την πειραματική εργασία, αλλά και την άμεση υποστήριξή της σε κάθε επίπεδο. Φυσικά δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω πολύ τη διδάκτορα Θεοφάνια Τσιρώνη, η οποία με τις καίριες παρατηρήσεις και επισημάνσεις της με βοήθησε ιδιαιτέρως, συμβάλλοντας στην ομαλή εκπόνηση αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για την άριστη συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν καθ’ όλη τη διάρκεια τη παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για την πίστη τους σε εμένα και την συνεχή στήριξή τους σε κάθε επίπεδο σε όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής και μη πορείας μου και στους φίλους μου που έκαναν όλα τα φοιτητικά μου χρόνια μια μοναδική εμπειρία. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στη συμφοιτήτριά μου Καλλιρρόη Παντελεάκη που μου στάθηκε καθ’ όλη την πορεία εκπόνησης και συγγραφής της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2016
Καλιούπη Καλλιόπη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων χαρακτηρίζεται από μεγάλες απώλειες ποιότητας σε συνδυασμό με πιθανά ζητήματα ασφάλειας που προκύπτουν, λόγω σημαντικών αποκλίσεων από τις προδιαγραφές της επιτρεπόμενης θερμοκρασίας.

Τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας αλλά και ιδιαίτερα ευαλλοιώτα, όπως είναι τα θαλασσινά, μπορεί να υπόκεινται σε ποιοτική υποβάθμιση και μερικές φορές η διάρκεια ζωής τους να διαφέρει από την προβλεπόμενη λόγω έκθεσής τους σε κρίσιμες θερμοκρασίες. Η απόκλιση της θερμοκρασίας από τα επιτρεπτά όρια θα μπορούσε να οδηγήσει σε ορισμένες περιπτώσεις σε ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή.

Ο έλεγχος της χρονο-θερμοκρασιακής έκθεσης των τροφίμων, είναι ένα σημαντικό ζήτημα για τη διατήρησή τους και για το λόγο αυτό υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης και τυποποίησης κατάλληλων δεικτών με ευέλικτο φάσμα τόσο θερμοκρασιακής ευαισθησίας, όσο και χρόνου απόκρισης. Το σκοπό αυτό εξυπηρετούν οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες (Time Temperature Indicators- TTI) που είναι οικονομικές, έξυπνες μικροδιατάξεις οι οποίες δείχνουν, μέσω εύκολα μετρήσιμων αλλαγών, το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένες.

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη της απόκρισης νέων ενζυμικών TTI τύπου LP σε ευρύ θερμοκρασιακό εύρος (0-30°C), η εύρεση του κατάλληλου TTI και η χρήση του για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας στρειδιών κατά τη συντήρηση και διακίνησή τους σε πραγματικές συνθήκες, καθώς και η ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus* που αναπτύσσεται στα στρείδια.

Η αρχή λειτουργίας των μελετηθέντων ενζυμικών δεικτών έχει ως βάση την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος, η οποία εξελίσσεται με σταθερό ρυθμό σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία και η οποία χαρακτηρίζεται από αλλαγή χρώματος (από πράσινο χρώμα κατά την ενεργοποίησή του, σε σταδιακή αλλαγή σε κίτρινο και τελικά κόκκινο χρώμα κατά τη λήξη του TTI). Στους ενζυμικούς δείκτες που μελετήθηκαν το ένζυμο των δεικτών ήταν λιπάση από *Rhizopus oryzae* και το υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης τριπαλμιτίνης (τύπου LP). Οι δείκτες που

μελετήθηκαν είχαν διαφορετική περιεκτικότητα ενζύμου (LP_5U, LP_10U, LP_20U, LP_50U, LP_100U, LP_200U, LP_400U, LP_600U).

Κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της απόκρισης των ενζυμικών δεικτών ΤΤΙ τύπου LP σε θερμοκρασίες ψύξης (0-15°C) αλλά και υψηλότερες (15-30°C), μέσω της οποίας προέκυψαν οι συναρτήσεις απόκρισης, τα κινητικά χαρακτηριστικά και οι χρόνοι λήξης των μελετηθέντων δεικτών.

Για το καθένα από τα δύο μελετηθέντα θερμοκρασιακά εύρη, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη συνολικού μαθηματικού μοντέλου, μέσω του οποίου διατυπώθηκε η εξάρτηση της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP από τη θερμοκρασία, το χρόνο και τη συγκέντρωση περιεχόμενου ενζύμου. Για το εύρος θερμοκρασιών 0-15°C η ενέργεια ενεργοποίησης E_A υπολογίστηκε ίση με 143.4 kJ/mol και για το εύρος 15-30°C ίση με 105.8 kJ/mol. Η αξιοπιστία των δεικτών ελέγχθηκε και κρίθηκε αποδεκτή μέσω πειράματος έκθεσής τους σε εναλλασσόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης σε στρείδια *Crassostrea gigas* με απώτερο σκοπό την επιλογή κατάλληλων δεικτών για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας του συγκεκριμένου τροφίμου κατά τη διακίνησή του στην ψυκτική αλυσίδα. Τα στρείδια είναι ένα τρόφιμο που αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και λόγω της μεγάλης επικινδυνότητάς του και της έκθεσής του σε υψηλές θερμοκρασίες, αποτέλεσε ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης. Μελετήθηκαν η μικροβιακή αλλοίωση, η μεταβολή του pH, ενώ πραγματοποιήθηκε και οργανοληπτική αξιολόγηση. Με επεξεργασία των αποτελεσμάτων αναπτύχθηκε και επαληθεύτηκε μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης της ανάπτυξης των ψευδομονάδων, οι οποίες κρίθηκαν κύριος αλλοιογόνος μικροοργανισμός στα στρείδια για την υποβάθμιση της ποιότητάς τους. Η ενέργεια ενεργοποίησης E_A του ρυθμού ανάπτυξης των ψευδομονάδων υπολογίστηκε 66.8 kJ/mol για θερμοκρασία αναφοράς 4°C. Υπολογίστηκε ότι σε θερμοκρασία 0°C, η διάρκεια ζωής των στρειδιών αντιστοιχεί σε 13 ημέρες, στους 5°C σε 8 ημέρες, στους 10°C σε 5 ημέρες ενώ στους 15°C σε μόλις 3 ημέρες.

Ακολούθησε επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus* σε στρείδια. Παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού είναι δυνατή στο θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό ανάπτυξής του εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης η οποία προσδιορίστηκε ίση με 78.9 kJ/mol.

Στο τελικό στάδιο της διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε μελέτη για την εύρεση του κατάλληλου ΤΠΙ και τη χρήση του για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας των στρειδιών κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω συσχέτισης της ανάπτυξης του κυρίου αλλοιογόνου μικροοργανισμού και του παθογόνου μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus* με την κινητική απόκριση των μελετηθέντων ΤΠΙ.

Με βάση τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα που προέκυψαν για τα ενζυμικά ΤΠΙ τύπου LP και λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο ζωής των στρειδιών βάσει της ανάπτυξης του κυρίου αλλοιογόνου μικροοργανισμού και του παθογόνου *V. parahaemolyticus*, ο δείκτης που κρίθηκε ως ο καταλληλότερος για την παρακολούθηση της χρονοθερμοκρασιακής έκθεσης των στρειδιών κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα και τη διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειάς τους, ήταν ο LP_200U.

ABSTRACT

Smart packaging: Development and application of enzymatic TTI for monitoring quality and safety of oysters in the cold chain

The cold chain is characterized by high quality losses, combined with critical safety issues. These issues arise due to significant deviations from the specifications of the permitted temperature.

Highly nutritious and high risk foods, such as seafood, can be subjected to quality degradation and their shelf life might be different from the predicted due to the exposure to critical temperatures. The temperature deviations from the recommended limits might result the growth of pathogens, threatening consumer's health.

Effective control of the chilled distribution of food products is vital to their commercial viability. A substantial portion of chilled products are exposed, throughout the distribution, to effective temperatures that deviate significantly from the recommended range. Application of an optimized quality and safety assurance system for product distribution requires continuous monitoring of storage conditions, from production to consumption. Smart packaging systems can provide information on the quality of food, which may be either indirect (e.g. time temperature integrators) or direct. Time Temperature Integrators (TTI) can show an easily measurable, time-temperature dependent change that cumulatively reflects the time-temperature history of the food product.

In the present study, new enzymatic TTI with lipase from *Rhizopus oryzae* and substrate mixture of tripalmitin and trilaourin (LP type) were kinetically studied in a wide temperature range (0-30°C). The objective was the development of a TTI based cold chain management system for safety monitoring of oysters at harvesting and the evaluation of its applicability for monitoring *Vibrio parahaemolyticus* risk. Additionally, a mathematical model that predicts *V. parahaemolyticus* growth in oyster meat was validated at isothermal and variable conditions.

The operating principle of an enzymatic indicator is based on the enzyme-substrate reaction, which progresses at a steady rate over a certain temperature and

characterized by a color change (the TTI changes from an initial green color, becomes progressively yellow/orange and reaches a final red color). The tested enzymatic indicators were LP type with various enzyme concentrations (LP_5U, LP_10U, LP_20U, LP_50U, LP_100U, LP_200U, LP_400U, LP_600U).

Firstly, the response of the enzymatic TTI (LP type) was studied at two temperature ranges (0-15°C and 15-30°C). Through this, the response functions, the kinetic characteristics and the response times of the studied TTI were estimated.

For each temperature range, a mathematical model was developed for the correlation of the response of the enzymatic TTI with temperature, time and the enzyme concentration. For the temperature range 0-15°C, the activation energy was calculated equal to 143.4 kJ/mol and for the range 15-30°C equal to 105.8 kJ/mol. The reliability of LP TTI was evaluated by validation experiments at variable conditions.

The overall objective of the study was the selection of appropriate indicators for monitoring the quality and safety risk of oysters in the cold chain. Oysters are extremely perishable food products and their quality deteriorates rapidly at ambient temperatures. For this purpose, microbial spoilage, pH change and sensory scoring were evaluated during isothermal storage at 0-15°C and at variable conditions. Spoilage of oysters was dominated by *Pseudomonas* spp. growth. A mathematical model for *Pseudomonas* spp. growth was developed and validated. The activation energy was calculated equal to 66.8 kJ/mol ($T_{ref}=4^{\circ}C$) and the shelf life of oysters was estimated 13 d at 0°C, 8 d at 5°C, 5 d at 10°C and 3 d at 15°C.

Furthermore, a mathematical model for *V. parahaemolyticus* growth in oysters was validated at 15-30°C and at variable conditions. The temperature effect on the growth rate expressed by the activation energy was calculated 78.9kJ/mol.

At the final stage of this study, appropriate TTI matched with *Pseudomonas* spp. and *V. parahaemolyticus* growth was selected. A TTI-based system lead to a realistic control of the cold chain, optimization of stock rotation, waste reduction and a more efficient management of product shelf-life.

Assuming different scenarios of the actual transportation of oysters and using the developed *V. parahaemolyticus* and *Pseudomonas* spp. growth models, it was concluded that LP_200U enzymatic TTI can be reliably used as monitoring tool in validating improved handling, cooling procedures and recommended temperature during distribution and storage of oysters.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Συντελεστές ποιότητας τροφίμων	1
1.3 Διατηρησιμότητα (διάρκεια ζωής) τροφίμου και καθορισμός της.....	2
1.4 Ασφάλεια των τροφίμων.....	3
1.5 Πρότυπα και προδιαγραφές ποιότητας.....	5
1.6 Αρχές κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων.....	6
1.7 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων.....	11
1.7.1 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	12
1.7.1.1 Μοντέλο Arrhenius.....	12
1.7.1.2 Αποκλίσεις από τη συμπεριφορά Arrhenius.....	13
1.7.1.3 Δραστική θερμοκρασία (T_{eff}).....	15
1.7.1.4 Απλό ή λογαριθμικό μοντέλο διατηρησιμότητας	16
1.7.1.5 Μοντέλο Q10.....	17
1.7.2 Επίδραση της ενεργότητας του νερού	17
1.7.3 Η επίδραση του pH.....	19
1.7.4 Η επίδραση των αερίων	19
1.7.5 Η επίδραση της πίεσης.....	20
1.7.6 Μηχανική καταπόνηση	20
1.7.7 Η επίδραση του φωτός.....	20
1.8 Υποβάθμιση της ποιότητας των ψυγμένων τροφίμων – Διαχείριση και έλεγχος της ψυκτικής αλυσίδας.....	20
1.9 Εφαρμογή TTI για την ασφάλεια των τροφίμων.....	22
2. ΧΡΟΝΟ-ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	25
2.1 Εισαγωγή	25
2.2 Ορισμός, αρχή λειτουργίας, κατηγοριοποίηση των TTI.....	26
2.2.1 Ορισμός TTI	26
2.2.2 Αρχές λειτουργίας των TTI	27
2.2.3 Κατηγοριοποίηση των TTI	27
2.2.3.1 Κατηγοριοποίηση με βάση τη λειτουργικότητα των TTI	28
2.2.3.2 Κατηγοριοποίηση με βάση την αρχή λειτουργίας των TTI	29

2.3 Προδιαγραφές και χαρακτηριστικά ενός ιδανικού ΤΤΙ.....	29
2.4 Διαχρονική εξέλιξη των ΤΤΙ	31
2.5 Σύγχρονα συστήματα ΤΤΙ	33
2.5.1 Ενζυμικοί χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες ΤΤΙ	35
2.6 Κινητική απόκρισης των δεικτών ΤΤΙ	39
2.7 Αντιστοίχιση απόκρισης ΤΤΙ με την ποιότητα των τροφίμων	40
2.8 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστηκής θερμοκρασίας T_{eff}	44
2.9 Εφαρμογή ΤΤΙ σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων.....	45
2.10 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί στη χρήση και εφαρμογή των ΤΤΙ	48
2.10.1 Πλεονεκτήματα των ΤΤΙ.....	48
2.10.1.1 Γενικά Πλεονεκτήματα	48
2.10.1.2 Πλεονεκτήματα σχετικά με τη βελτίωση της διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας.	49
2.10.2 Περιορισμοί στη χρήση και εφαρμογή των ΤΤΙ	50
2.11 Η στάση των καταναλωτών και της βιομηχανίας απέναντι στα ΤΤΙ.....	51
2.12 Εφαρμογές των ΤΤΙ.....	54
2.13 Εφαρμογές των ΤΤΙ σε ευαλλοίωτα προϊόντα	58
2.14 Σύστημα FIFO-LSFO ή SMLS	60
2.15 Ανάπτυξη και εφαρμογή συστήματος SMAS (Safety Monitoring and Assurance System)	61
2.16 Μελλοντικές τάσεις.....	63
3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΡΕΙΔΙΩΝ	65
3.1 Εισαγωγή	65
3.2 Μαλάκια	66
3.2.1 Ομοταξία δίθυρα (<i>Bivalvia</i>).....	66
3.3 Στρείδια	67
3.3.1 Τύποι και μορφές στρειδιών	67
3.3.2 Θρεπτική αξία στρειδιών	68
3.4 Μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης στρειδιών	69
3.5 Παρουσία και ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.....	70
3.5.1 Παθογόνος μικροοργανισμός <i>Vibrio</i> spp.	71
3.5.2 Quantitative microbiological risk assessment - QMRA	73
3.6 Μέθοδοι αδρανοποίησης του παθογόνου <i>Vibrio parahaemolyticus</i> σε στρείδια	74
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	77

4.1 Εισαγωγή - Σκοπός	77
4.2 Μελέτη ενζυμικών χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών τύπου LP	78
4.2.1 Πειραματική διαδικασία	78
4.2.2 Συσκευές πειραματικής διαδικασίας	79
4.3 Εφαρμογή επιλεγμένων ΤΤΙ για την πρόβλεψη της εναπομένουσας διάρκειας ζωής κατά τη συντήρηση στρεπιδιών	80
4.3.1 Πειραματική Διαδικασία	81
4.3.1.1 Μέτρηση της απόκρισης των τοποθετημένων στα δείγματα ΤΤΙ	81
4.3.1.2 Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου	82
4.3.1.3 Μέτρηση pH	86
4.3.1.4 Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων	86
4.3.1.5 Επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Vibrio spp.</i> σε στρείδια	87
5. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΤΙ	91
5.1 Επεξεργασία απόκρισης των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών	91
5.1.1 Καθορισμός της συνάρτησης $F(X_C)$ των ενζυμικών ΤΤΙ	91
5.1.2 Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών k_A και E_A των ενζυμικών ΤΤΙ	91
5.1.3 Έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων	92
5.2 Κινητική Μελέτη της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ	92
5.2.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_5U	93
5.2.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_10U	97
5.2.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_20U	100
5.2.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_50U	104
5.2.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_100U	107
5.2.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_200U	111
5.2.7 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_400U	114
5.2.8 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_600U	118
5.2.9 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονο - θερμοκρασιακού προφίλ για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U	124
5.3 Προσδιορισμός συνολικών μαθηματικών μοντέλων της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ	126
5.4 Μελέτη αξιοπιστίας των μαθηματικών μοντέλων - στατιστική επεξεργασία	129
6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ	133
6.1 Εισαγωγή	133

6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής στρειδιών.....	134
6.2.1 Μέτρηση μικροβιακού φορτίου.....	134
6.2.2 Μέτρηση pH	135
6.2.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση δειγμάτων	136
6.3 Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης της μικροβιολογικής αλλοίωσης σε στρείδια.....	143
6.3.1 Ισοθερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης - Ανάπτυξη κινητικού μοντέλου ..	143
6.3.2 Εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών από τη θερμοκρασία συντήρησης.....	145
6.3.4 Επαλήθευση μαθηματικού μοντέλου σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες	148
6.4 Επαλήθευση μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του <i>V. parahaemolyticus</i> σε στρείδια	150
7. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΡΕΙΔΙΩΝ	155
7.1 Εισαγωγή	155
7.2 Επιλογή κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας στρειδιών.....	155
7.2.1 Συσχέτιση του χρόνου ζωής στρειδιών με την απόκριση των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP	156
8. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	161
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	168
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	171
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	183

1. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

1.1 Εισαγωγή

Το τρόφιμο είναι ένα πολύπλοκο, φυσικοχημικά και βιολογικά ενεργό σύστημα. Τα βασικά συστατικά του, δηλαδή οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λιπαρά συμμετέχουν σε πολλές αντιδράσεις που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, της θρεπτικής αξίας και της ασφάλειας του τροφίμου. Για το λόγο αυτό πρέπει να διαφυλάσσεται η θρεπτικότητα και να επιδιώκεται η βελτίωση της θρεπτικής αξίας αυτών, λαμβάνοντας πρόνοια για τις μικρότερες δυνατές αλλοιώσεις και για τη μείωση στο ελάχιστο των παραγόντων μόλυνσης. Οι επεξεργασίες παραγωγής και συντήρησης των τροφίμων πρέπει να είναι κατάλληλες, ώστε να παρέχουν προϊόντα ασφαλή με υψηλό βαθμό αποδοχής από τον καταναλωτή.

Η ποιότητα τροφίμου ορίζεται ως το σύνολο των χαρακτηριστικών που επιτρέπουν το διαχωρισμό του και καθορίζουν το βαθμό αποδοχής του από τον καταναλωτή ή το χρήστη. Εξαρτάται από την ποιότητα των πρώτων υλών και από την τεχνολογία παραγωγής, εκφράζεται δε με τα χαρακτηριστικά του γνωρίσματα όπως είναι το άρωμα, η γεύση, η σύσταση κ.ά. Πρόκειται για μια δυναμική κατάσταση που κινείται προς φθίνουσα κατεύθυνση (με εξαίρεση ορισμένα τρόφιμα που βελτιώνεται η ποιότητάς τους με την ωρίμανση ή την παλαίωση). Για το λόγο αυτό τα τρόφιμα έχουν πεπερασμένη διατηρησιμότητα ή διάρκεια ζωής (shelf life).

1.2 Συντελεστές ποιότητας τροφίμων

Η ποιότητα ενός τροφίμου μπορεί να αναλυθεί σε επί μέρους συνιστώσες - χαρακτηριστικά ποιότητας- ή μπορεί να αποτελείται από διάφορους "συντελεστές ποιότητας". Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ή συντελεστές ποιότητας ενός τροφίμου διακρίνονται σε "οργανοληπτικά χαρακτηριστικά" ή "εμφανή χαρακτηριστικά", τα οποία μπορούν να εκτιμηθούν εύκολα με τις αισθήσεις, και σε "μη εμφανή χαρακτηριστικά", τα οποία δεν μπορούν να εκτιμηθούν με τις αισθήσεις αλλά παίζουν σπουδαίο ρόλο στη υγεία ή έχουν οικονομική σημασία. Τα ποιοτικά

χαρακτηριστικά ενός τροφίμου μπορούν να μετρηθούν με φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές και μικροβιολογικές ή οργανοληπτικές μεθόδους.

Η ταξινόμηση των κυριότερων συντελεστών ποιότητας των τροφίμων παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 1.1 Ταξινόμηση χαρακτηριστικών ποιότητας τροφίμου (Τζιά, 2007)

Εμφανή/Οργανοληπτικά	Μη εμφανή
<p>Όραση - Εμφάνιση: Χρώμα Ιξώδες Στιλπνότητα Μέγεθος – Σχήμα Ελαττώματα</p>	<p>Αβλαβής νοθεία Θρεπτική αξία Τοξικότητα Διατηρησιμότητα (χρόνος ζωής)</p>
<p>Αφή - Κιναισθητική (υφή): Αίσθηση στο χέρι ή τα δάχτυλα Στοματική αίσθηση</p>	
<p>Όσφρηση και γεύση – Άρωμα: Οσμή Γεύση</p>	
<p>Ακοή: Κοπή Μάσημα</p>	

Χαρακτηριστικά της ποιότητας των τροφίμων αποτελούν επίσης η συμφωνία με τη νομοθεσία, η συσκευασία, η τιμή, η διαθεσιμότητα και προπάντων η ασφάλειά τους (Τζιά, 2009).

1.3 Διατηρησιμότητα (διάρκεια ζωής) τροφίμου και καθορισμός της

Η ποιότητα του τροφίμου είναι μια δυναμική κατάσταση που κινείται προς φθίνουσα κατεύθυνση. Για το λόγο αυτό τα τρόφιμα έχουν πεπερασμένη διατηρησιμότητα ή διάρκεια ζωής (shelf life). Δεν έχει διατυπωθεί κάποιος γενικά εφαρμόσιμος ορισμός της διατηρησιμότητας των τροφίμων. Ο καθορισμός της διάρκειας ζωής και των κριτηρίων που οριοθετούν το τέλος της εξαρτώνται από το προϊόν και από τη χρήση για την οποία προορίζεται. Από το Διεθνές Ινστιτούτο Ψυγμένων Προϊόντων (International Institute of Refrigerator, IIR) υποδεικνύονται δύο διαφορετικοί ορισμοί:

1. Ο **Χρόνος Υψηλής Ποιότητας** (High quality life, HQL): είναι ο χρόνος μετά την επεξεργασία του προϊόντος για την πρώτη αντιληπτή οργανοληπτική διαφορά (70-80% θετική απάντηση σε τριγωνικό τεστ).
2. Ο **Χρόνος Πρακτικής Διατήρησης** (Practical Shelf Life, PSL): είναι ο χρόνος αποθήκευσης, μετά την παραγωγή προϊόντος αρχικής υψηλής ποιότητας, στον οποίο το τρόφιμο είναι οργανοληπτικά αποδεκτό.

Ο χρόνος πρακτικής διατήρησης είναι συνήθως δύο ή τρεις φορές μεγαλύτερος από το χρόνο υψηλής ποιότητας.

Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα για την επισήμανση των προϊόντων εισήγαγε το **Χρόνο Ελάχιστης Διατηρησιμότητας** (Minimum Durability), ο οποίος ορίζεται ως χρόνος που το τρόφιμο διατηρεί τα χαρακτηριστικά του, υπό κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης. Ο τελευταίος ορισμός διαφέρει από τους προαναφερθέντες διότι αναφέρεται στο τρόφιμο και τις ιδιότητές του χωρίς να λαμβάνει καθόλου υπόψη τη χρήση για την οποία προορίζεται. Πολλές φορές επιβεβαιώνεται η βασική παραδοχή ότι το υψηλότερης ποιότητας τρόφιμο είναι εκείνο που έχει παρασκευαστεί ή συλλεχθεί πρόσφατα. Παρ' όλα αυτά, μια και τα διάφορα χαρακτηριστικά των τροφίμων αλληλοεπικαλύπτονται, πρέπει να αποφασιστεί μέχρι ποιο σημείο ένα ορισμένο χαρακτηριστικό ή η εμφάνιση κάποιου ανεπιθύμητου μπορεί να ανιχνευθεί από τον καταναλωτή. Ένας τέτοιος ορισμός πλησιάζει αρκετά εκείνον του χρόνου υψηλής ποιότητας (HQL). Ωστόσο, όποιος ορισμός και αν χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση, είναι απαραίτητο να συνοδεύεται από περαιτέρω διευκρινήσεις και οδηγίες, π.χ. πρέπει να γίνεται σαφές τι σημαίνει οργανοληπτική ποιότητα και ποιες είναι οι εκάστοτε μέθοδοι μέτρησης και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για να οριστούν τα επιτρεπτά όρια αποδοχής (Ταούκης, 2012).

1.4 Ασφάλεια των τροφίμων

Η ασφάλεια των τροφίμων (food safety) ορίζεται ως η κατάσταση των τροφίμων η οποία έχει δυσμενή επίπτωση στην υγεία του καταναλωτή ή η διασφάλιση των τροφίμων έναντι διαφόρων κινδύνων (μικροβιολογικών, φυσικών, χημικών). Ασφάλεια για τα τρόφιμα σημαίνει απουσία μικροβιολογικών (παθογόνα βακτήρια), χημικών (χημικά, φυτοφάρμακα, κ.τ.λ.) και φυσικών (γυαλί, μέταλλο,

κ.ά.) κινδύνων. Αντίστοιχα τα τρόφιμα που δεν περιέχουν κινδύνους (δυσμενείς παράγοντες για την υγεία) καλούνται ασφαλή. Όλα τα τρόφιμα που κινούνται στην αγορά πρέπει από τη νομοθεσία να είναι ασφαλή.

Κίνδυνος (hazard) για τα τρόφιμα ορίζεται μία βιολογική, φυσική, χημική ιδιότητα ή παράγοντας που μπορεί να καταστήσει το τρόφιμο μη ασφαλές για κατανάλωση.

Ως **απόλυτη ασφάλεια** (absolutely safety) ορίζεται η εξασφάλιση της προστασίας του καταναλωτή από τη χρήση ενός συστατικού (κατανάλωση τροφίμου). Παρ' όλα αυτά, ένα ποσοστό επικινδυνότητας εμπεριέχεται σε κάθε τρόφιμο ή χημική ουσία. Επομένως, ο στόχος για την επίτευξη της απόλυτης ασφάλειας δεν είναι εφικτός.

Ως **σχετική ασφάλεια** των τροφίμων (relative food safety) ορίζεται η πρακτική βεβαιότητα, ότι δεν θα προκληθεί ασθένεια στον καταναλωτή από την κατανάλωση ενός τροφίμου ή συστατικού, με την προϋπόθεση ότι αυτό χρησιμοποιείται σωστά και η κατανάλωση του δεν υπερβαίνει κάποια ανώτατα όρια.

Η ασφάλεια των τροφίμων δεν εξαρτάται μόνο από τα ίδια τα τρόφιμα, αλλά και από τα άτομα που τα καταναλώνουν. Έτσι, τρόφιμα, τα οποία κρίνονται ως ασφαλή για τους περισσότερους καταναλωτές, μπορεί να είναι ιδιαίτερα τοξικά ή ακόμα και θανατηφόρα για ευαίσθητα ή αλλεργικά άτομα.

Η ασφάλεια είναι ο σπουδαιότερος συντελεστής ποιότητας των τροφίμων και έχει ειδική σημασία για τα τρόφιμα. Η ασφάλεια αποτελεί προϋπόθεση για το τρόφιμο και θεωρείται αδιαπραγμάτευτη. Η ποιότητα των τροφίμων είναι επιθυμητή και σε κάποιο βαθμό προαιρετική, η ασφάλεια όμως των τροφίμων θεωρείται “δεδομένη” για τον καταναλωτή, είναι υποχρεωτικά απαιτούμενη από τη νομοθεσία και πρέπει να εξασφαλίζεται για όλα τα προϊόντα που παράγονται από τη βιομηχανία τροφίμων και διακινούνται στην αγορά.

Για τους παραπάνω λόγους η ασφάλεια εξετάζεται ιδιαίτερα στα τρόφιμα, και γι' αυτό το λόγο έχει αναπτυχθεί το σύστημα **HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points - Ανάλυση Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου)**, που είναι ένα εξιδεικευμένο σύστημα το οποίο σχετίζεται άμεσα με την ασφάλεια των τροφίμων -σύστημα διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων. Το σύστημα HACCP επικεντρώνεται στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (CCPs: critical control points) που είναι τα πιο σημαντικά στη ροή της παραγωγής του τροφίμου και προσεγγίζει συστηματικά με τον καλύτερο δυνατό τρόπο την ασφάλεια του τροφίμου

ελέγχοντας τα σημεία αυτά. Ως κρίσιμα σημεία ελέγχου αναγνωρίζονται και ορισμένα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας για διάφορα ελάχιστα επεξεργασμένα κατεψυγμένα προϊόντα. Η παρακολούθηση αυτών των σημείων ελέγχου αποδεικνύεται σημαντική για τη διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων (Τζιά, 2010).

1.5 Πρότυπα και προδιαγραφές ποιότητας

Για την επίτευξη της ποιότητας των τροφίμων πρέπει να ικανοποιούνται οι προδιαγραφές που παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 1.2 Προδιαγραφές ποιότητας

Προδιαγραφές ποιότητας	
Νομικές:	Είναι υποχρεωτικές από διεθνής φορείς (π.χ. FDA), από την ευρωπαϊκή ή διεθνή νομοθεσία. Αναφέρονται: <ul style="list-style-type: none"> • σε όρια συγκέντρωσης συστατικών ή σε απουσία νοθείας ή μόλυνσης • σε όρια συνθηκών επεξεργασίας τροφίμων • σε απαγόρευση μόλυνσης των τροφίμων από κάποιο υλικό.
Τροφίμου:	Έχουν σχέση με τον κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων και για την εικόνα που σχηματίζει ο καταναλωτής για το προϊόν. Μπορεί να γίνει σήμα της ποιότητας του προϊόντος και ποικίλλουν ανάλογα με την ετικέτα του.
Βιομηχανίας/εταιρείας:	Εφαρμόζονται λόγω πίεσης από το μάρκετινγκ ή λόγω ομάδας στην οποία ανήκει ένα προϊόν ή όπου δεν εμπλέκονται νομοθετικές προδιαγραφές και στοχεύουν στη βελτίωση ποιότητας των προϊόντων τους.
Καταναλωτή:	Αντιπροσωπεύουν τις απαιτήσεις του καταναλωτή για το προϊόν.

1.6 Αρχές κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων

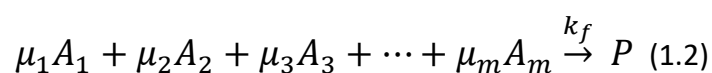
Τα τρόφιμα είναι φθαρτά προϊόντα τα οποία κατά τη διατήρησή τους κάτω από ορισμένες συνθήκες υφίστανται ποιοτική υποβάθμιση και αλλοίωση. Εφαρμόζοντας τις βασικές αρχές της χημικής κινητικής, ο **ρυθμός υποβάθμισης της ποιότητας** ενός τροφίμου μπορεί να εκφραστεί ως μία συνάρτηση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων:

$$\frac{dQ}{dt} = F(C_i, E_j) \quad (1.1)$$

όπου C_i : οι παράμετροι σύστασης (αντιδρώντα συστατικά, ανόργανοι καταλύτες, ένζυμα, παρεμποδιστές, pH, ενεργότητα νερού, μικροβιακή χλωρίδα)
 E_j : οι παράμετροι περιβάλλοντος (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ολική πίεση, μερική πίεση περιβαλλόντων αερίων π.χ. CO₂, N₂, O₂, φως, μηχανικές καταπονήσεις)

Ο ρυθμός μεταβολής της ποιότητας είναι ένα πολύπλοκο φυσικοχημικό σύστημα το οποίο περιλαμβάνει πολυάριθμες φυσικές και χημικές μεταβλητές και σταθερές, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αδύνατον ή μη πρακτικό να καθοριστούν ποσοτικά. Η καθιερωμένη μεθοδολογία αρχικά περιλαμβάνει την αναγνώριση των χημικών και βιολογικών δράσεων που επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου. Στη συνέχεια, μετά από προσεκτική μελέτη των συστατικών του τροφίμου και της χρησιμοποιούμενης διεργασίας, προσδιορίζονται οι αντιδράσεις που έχουν τη σημαντικότερη επίδραση στο ρυθμό της κινητικής αλλοίωσης (Labuza, 1982). Εξαιρώντας την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων E_j , θεωρώντας ότι παραμένουν σταθεροί ή ότι η επίδρασή τους είναι αμελητέα, μπορεί να αναπτυχθεί ένα απλοποιημένο σχεδιάγραμμα αντιδράσεων που να εκφράζει την επίδραση της συγκέντρωσης των αντιδρώντων συστατικών. Ο αντικειμενικός στόχος είναι η διαμόρφωση ενός μοντέλου που θα περιγράψει τη μεταβολή των συγκεντρώσεων των συστατικών εκείνων που σχετίζονται με την ποιότητα του τροφίμου, ως συναρτήσεις του χρόνου.

Για μη αντιστρεπτές αντιδράσεις ισχύει γενικά το ακόλουθο σχήμα:



όπου A_j : τα αντιδρώντα

μ_j : οι αντίστοιχοι στοιχειομετρικοί συντελεστές ($j = 1, 2, \dots, m$)

P: τα προϊόντα και

k_f : η σταθερά του ρυθμού αντίδρασης.

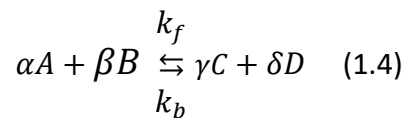
Ο ρυθμός της παραπάνω αντίδρασης δίνεται από την ακόλουθη σχέση (Hills and Grieger-Block, 1980) :

$$r = -\frac{1}{\mu_j} \frac{d[A_j]}{dt} = k_f [A_1]^{n_1} [A_2]^{n_2} \dots [A_m]^{n_m} \quad (1.3)$$

όπου n_j : η τάξη της αντίδρασης ως προς κάθε αντιδρών A_j

(για πραγματικές μοριακές αντιδράσεις $n_j = \mu_j$).

Για ισορροπίες αντίστοιχα ισχύει:



και ο ρυθμός αντίδρασης δίνεται από τη σχέση:

$$r = \frac{-d[A]}{\alpha dt} = \frac{-d[B]}{\beta dt} = \frac{+d[C]}{\gamma dt} = \frac{+d[D]}{\delta dt} = k_f [A]^\alpha [B]^\beta - k_b [C]^\gamma [D]^\delta \quad (1.5)$$

Γενικά αναζητούνται ποσοτικά μετρήσιμοι και αποτελεσματικοί δείκτες, A ή B, οι οποίοι είτε καθορίζουν την ποιότητα του τροφίμου είτε την χαρακτηρίζουν έμμεσα μεταβαλλόμενοι με τον ίδιο ρυθμό. Για τους δείκτες αυτούς θεωρείται ότι ισχύει:

$$r_A = \frac{-d[A]}{dt} = k[A]^m \quad (1.6)$$

$$r_B = \frac{d[B]}{dt} = k'[B]^{m'} \quad (1.7)$$

όπου A: επιθυμητή ποιοτική παράμετρος π.χ. θρεπτικό συστατικό, άρωμα

B: παράμετρος που υποβαθμίζει το τρόφιμο π.χ. ανεπιθύμητο άρωμα, χρώμα, μικροβιακό φορτίο.

Οι σχέσεις αυτές μπορούν να προκύψουν από την (1.3) αν οι συγκεντρώσεις των A_j είναι σε στοιχειομετρική αναλογία και m=Ση_j ή από την (1.5) για k_f>>k_b ή [C] και [D] αμελητέες.

Τα k και k' (φαινόμενες σταθερές ρυθμού αντίδρασης) και τα m και m' (φαινόμενες τάξεις των αντιδράσεων) προσδιορίζονται πειραματικά με δύο τρόπους.

1. Διαφορικές μέθοδοι

Στην κινητική μελέτη των συστημάτων των τροφίμων δεν είναι δυνατόν να υπολογιστεί πειραματικά ο ρυθμός της αντίδρασης γι' αυτό μετρώνται οι συγκεντρώσεις των A, B (άμεσα ή έμμεσα) ως συνάρτηση του χρόνου. Με γραφική ή με κάποια στατιστική μέθοδο προσαρμογής των καμπυλών που προκύπτουν από τα παραπάνω δεδομένα (π.χ. γραμμική ή πολυωνυμική προσαρμογή) είναι δυνατόν να υπολογιστούν γραφικά ή αναλυτικά οι ρυθμοί των αντιδράσεων. Λογαριθμίζοντας τις εξισώσεις (1.6) και (1.7) προκύπτουν οι παρακάτω γραμμικές σχέσεις:

$$\log r_A = \log k + m \log [A] \quad (1.8)$$

$$\log r_B = \log k' + m' \log [B] \quad (1.9)$$

Με γραμμική προσαρμογή των δεδομένων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων για τις παραπάνω εξισώσεις, είναι δυνατόν να υπολογιστούν οι σταθερές k, k', m και m'.

2. Μέθοδοι με ολοκλήρωση (Hills and Grieger-Block, 1980)

Στις μεθόδους ολοκλήρωσης, διαχωρίζονται οι μεταβλητές των εξισώσεων (1.6) και (1.7) και ακολουθεί ολοκλήρωση.

Για παράδειγμα για την εξίσωση (1.6) έχουμε:

$$- \int_{A_0}^A \frac{d[A]}{[A]^m} = kt \quad (1.10)$$

Η παραπάνω σχέση είναι της μορφής:

$$Q(A) = kt \quad (1.11)$$

όπου το Q(A) ορίζεται ως η **συνάρτηση ποιότητας** του τροφίμου.

Ανάλογα με την τάξη της αντίδρασης προκύπτουν διαφορετικές συναρτήσεις ποιότητας για κάθε τρόφιμο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συναρτήσεις ποιότητας και ο χρόνος ημιζωής, δηλαδή ο χρόνος στον οποίο η τιμή της συγκέντρωσης του δείκτη A έχει μειωθεί στο μισό της αρχικής τιμής της, για φαινόμενη τάξη αντίδρασης μηδενική, πρώτη, δεύτερη και m-οστή.

Πίνακας 1.3 Συναρτήσεις ποιότητας και χρόνοι ημιζωής για διαφορετικές φαινόμενες τάξεις αντιδράσεων

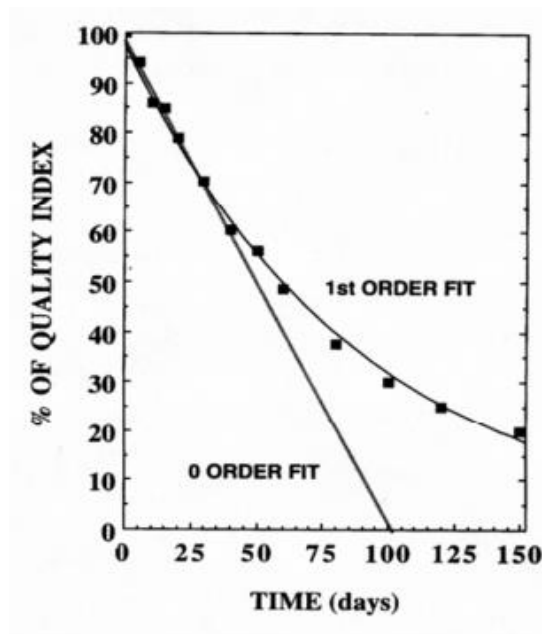
Φαινόμενη τάξη αντίδρασης	Συνάρτηση Ποιότητας $Q(A)_t$	Χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$
0	$A_0 - A_t$	$A_0 / (2k_0)$
1	$\ln(A_0/A_t)$	$\ln 2 / k_1$
2	$1/A_0 - 1/A_t$	$1 / (k_2 A_0)$
M (m≠1)	$\frac{1}{m-1} (A_t^{1-m} - A_0^{1-m})$	$\frac{2^{m-1} - 1}{k_m (m-1)} A_0^{1-m}$

Στη μέθοδο με ολοκλήρωση γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός της τιμής του δείκτη A, την οποία υπολογίζουμε με κατάλληλες φυσικοχημικές μεθόδους, σε τακτά χρονικά σημεία και επιλέγουμε από τον πιο πάνω πίνακα, την εξίσωση που δίνει την καλύτερη στατιστική προσαρμογή στα πειραματικά σημεία (μέθοδοι ελαχίστων τετραγώνων). Ακολουθεί στατιστική ανάλυση του επιλεγμένου μοντέλου, όπου μας ενδιαφέρουν η διασπορά των μετρήσεων, ο συντελεστής συσχέτισης και το διάστημα εμπιστοσύνης της προσδιοριζόμενης παραμέτρου.

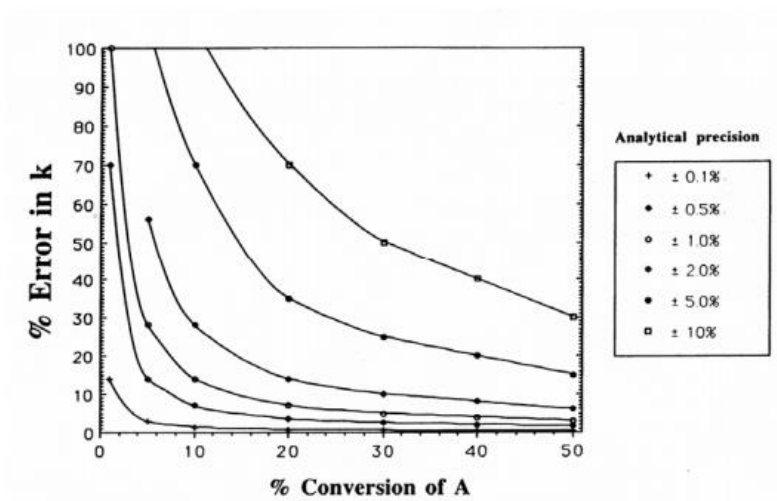
Στα σχήματα (1.1) και (1.2) φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο ο βαθμός μετατροπής της κρίσιμης παραμέτρου και η ακρίβεια ποσοτικού προσδιορισμού της, καθορίζουν την αποτελεσματικότητα του προσδιοριζόμενου μοντέλου.

Αναφερόμενοι στο σχήμα (1.1) πρέπει να επισημανθεί ότι το τέλος της διατηρησιμότητας για πολλά τρόφιμα αντιστοιχεί σε απώλεια του δείκτη ποιότητας A λιγότερο του 30% και ως εκ τούτου μικρή πρακτικά σημασία θα είχε αν το φαινόμενο περιγραφεί με μηδενική ή πρώτη τάξη. Όπως όμως είναι φανερό από το σχήμα (1.2), δεδομένου ότι η ακρίβεια μέτρησης συνήθως κυμαίνεται στο 5%, η

αντίδραση πρέπει να μετρηθεί τουλάχιστον μέχρι μετατροπής 50%, οπότε η διαφορά προσαρμογής των δύο μοντέλων είναι πλέον σημαντική.



Σχήμα 1.1 Απώλεια της ποιότητας του τροφίμου ως συνάρτηση του χρόνου, όπου παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ της αντίδρασης πρώτης και μηδενικής τάξης.



Σχήμα 1.2 Επίδραση του αναλυτικής ακρίβειας στο σφάλμα υπολογισμού της σταθεράς του ρυθμού αντίδρασης.

Οι περισσότερες αντιδράσεις αλλοίωσης που έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική περιγραφή της διατηρησιμότητας των τροφίμων χαρακτηρίζονται ως μηδενικής ή πρώτης τάξης και φαίνονται στον πίνακα (1.4).

Πίνακας 1.4 Σημαντικές αντιδράσεις αλλοίωσης που ακολουθούν κινητική μηδενικής ή πρώτης φαινόμενης τάξης

Κινητική 0 ^{ης} τάξης	Κινητική 1 ^{ης} τάξης
Αλλοίωση κατεψυγμένων	Απώλεια βιταμινών
	Μικροβιακή μείωση/ανάπτυξη
Μη ενζυμικό μαύρισμα	Οξειδωτική απώλεια χρώματος
	Απώλεια υφής κατά τη θερμική κατεργασία

Πρέπει ακόμη να σημειωθεί το γεγονός ότι συνήθως η κινητική μελέτη δεν αναφέρεται στον πολύπλοκο πραγματικό μηχανισμό των αντιδράσεων, οπότε κάποια μεταβολή στη σύσταση του συστήματος μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό αντίδρασης του δείκτη ποιότητας χωρίς αυτό να μπορεί να προβλεφθεί.

Επομένως, η αναγωγή των αποτελεσμάτων σε σύστημα διαφορετικής σύστασης πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή. Είναι σκόπιμο, σε ορισμένα συστήματα τροφίμων να μελετάται σε βάθος ο αληθής μηχανισμός ορισμένων, καθοριστικών για την ποιότητα του τροφίμου, αντιδράσεων ώστε να μπορούν να μελετηθούν αλλαγές στη σύστασή του. Τέτοια διερεύνηση γίνεται συνήθως σε μοντέλα συστημάτων για αντιδράσεις ιδιαίτερης διατροφικής και τοξικολογικής σημασίας παρά σε πραγματικά τρόφιμα.

1.7 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων

Ένα κινητικό μοντέλο που περιγράφει την απώλεια της ποιότητας είναι χαρακτηριστικό για κάθε τρόφιμο, αλλά επηρεάζεται άμεσα και από περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό του.

Σύμφωνα με την προηγούμενη ανάλυση θεωρήθηκε ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες E_j παραμένουν σταθεροί. Στην πραγματικότητα, όμως, μεταβάλλονται συνεχώς και επηρεάζουν τους ρυθμούς των αντιδράσεων που συμβαίνουν μέσα σ' ένα σύστημα.

Οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στην ποιότητα του τροφίμου είναι οι εξής:

- η θερμοκρασία
- η ενεργότητα του νερού
- η ολική και οι μερικές πιέσεις των διαφορετικών αερίων
- το pH
- η σχετική υγρασία
- οι ακτινοβολίες
- οι μηχανικές πιέσεις.

Ο σημαντικότερος περιβαλλοντικός παράγοντας από όλους είναι η θερμοκρασία, η οποία παρουσιάζει και ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παρούσα εργασία.

1.7.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία επηρεάζει ισχυρά τους ρυθμούς των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σ' ένα σύστημα τροφίμου και είναι εκείνη που ελέγχεται λιγότερο από τη συσκευασία και καθορίζεται αποκλειστικά από τις συνθήκες αποθήκευσης. Αρκετά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για την επίδραση της θερμοκρασίας. Τα σημαντικότερα από αυτά παρουσιάζονται παρακάτω.

1.7.1.1 Μοντέλο Arrhenius

Πρόκειται για το πιο διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο, το οποίο περιγράφεται από τη σχέση Arrhenius:

$$k = k_A e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (1.12)$$

όπου k: η σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης,

k_A : ο συντελεστής Arrhenius ή σταθερά Arrhenius,

E_A : η ενέργεια ενεργοποίησης σε cal/mol,

R: η παγκόσμια σταθερά των αερίων (1,9872 cal/mol/K) και

T: η απόλυτη θερμοκρασία σε K

Λογαριθμίζοντας την παραπάνω σχέση προκύπτει η ακόλουθη λογαριθμική σχέση:

$$\ln k = \ln k_A - \frac{E_A}{RT} \quad (1.13)$$

Από την παραπάνω μορφή της εξίσωσης του Arrhenius, γνωρίζοντας τις τιμές των k σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες T , οι παράμετροι E_A και k_A μπορούν να υπολογιστούν από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$E_A = \ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) \frac{RT_1T_2}{T_2-T_1} \quad (1.14)$$

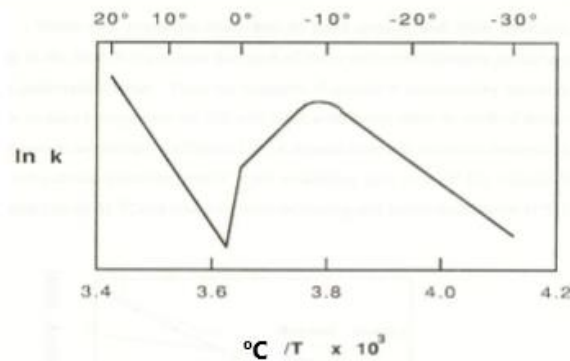
$$k_A = k_1^{\left(\frac{T_1}{T_1-T_2}\right)} k_2^{\left(\frac{T_2}{T_1-T_2}\right)} \quad (1.15)$$

Στην πράξη, από τη στιγμή που υπάρχει πειραματικό σφάλμα στον προσδιορισμό των τιμών του k , ο υπολογισμός του E_A από δύο μόνο σημεία θα είναι σίγουρα εσφαλμένος. Συνήθως, ο ρυθμός της αντίδρασης προσδιορίζεται, όταν είναι γνωστές σε τρεις ή περισσότερες θερμοκρασίες οι τιμές των k , από το ημιλογαριθμικό διάγραμμα των $\ln k$ με το $1/T$ όπου προκύπτει ευθεία με κλίση $-E_A/R$ (Σχήμα 1.3) ή με γραμμική προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση (1.13). Με στατιστική ανάλυση προσδιορίζονται τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% των παραμέτρων της σχέσης Arrhenius. Όταν υπάρχουν μόνο τρεις τιμές του k , το διάστημα εμπιστοσύνης είναι συνήθως πολύ μεγάλο. Προκειμένου να ληφθούν αξιόπιστες εκτιμήσεις των E_A και k_A , απαιτούνται δεδομένα σε περισσότερες θερμοκρασίες. Μία εκτίμηση του βέλτιστου αριθμού πειραμάτων που δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα είναι 5 ή 6 θερμοκρασίες (Lenz & Lund, 1980). Όταν τα πειραματικά σημεία περιορίζονται σε τρεις μόνο θερμοκρασίες, τότε μόνο με γραμμική προσαρμογή ή με τη μέθοδο σημείου προς σημείο (point by point), μπορεί να υπολογιστούν οι παράμετροι της σχέσης του Arrhenius με μικρότερα διαστήματα εμπιστοσύνης (Labuza & Kamman, 1983). Η μέθοδος αυτή υπολογισμού των παραμέτρων της σχέσης Arrhenius, απαιτεί ισόθερμα κινητικά πειράματα σε τρεις τουλάχιστον θερμοκρασίες.

1.7.1.2 Αποκλίσεις από τη συμπεριφορά Arrhenius

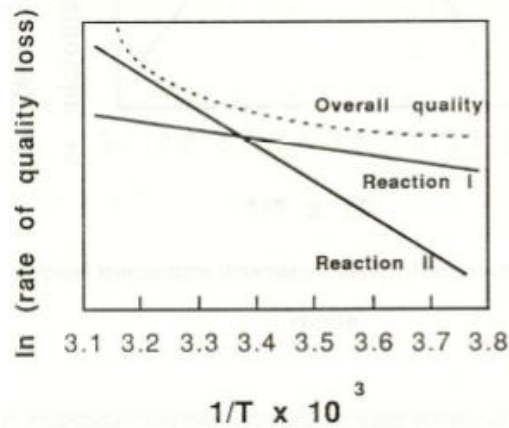
Παρόλο που η σχέση του Arrhenius ισχύει για τις περισσότερες των περιπτώσεων, πολλές φορές υπάρχουν παράγοντες που έχουν σχέση με το τρόφιμο ή με τις αντιδράσεις αλλοίωσής του, οι οποίοι μπορεί να επιφέρουν σημαντικές αποκλίσεις

από τη συμπεριφορά κατά Arrhenius (Labuza & Riboh, 1982). Οι αποκλίσεις προέρχονται από μεταβολές στη φυσική κατάσταση του τροφίμου π.χ. στα κατεψυγμένα τρόφιμα στην περιοχή απόψυξης-κατάψυξης, αλλαγή στην κρυσταλλική δομή των υδατανθρακών, ρευστοποίηση λιπαρών κ.λ.π. Οι αποκλίσεις Arrhenius απεικονίζονται στο σχήμα (1.3).



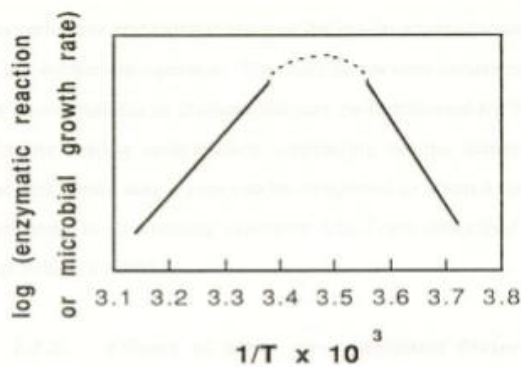
Σχήμα 1.3 Αποκλίσεις από τη συμπεριφορά κατά Arrhenius για κατεψυγμένα τρόφιμα

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ποιότητα του τροφίμου επηρεάζεται από περισσότερες από μία αντιδράσεις. Όταν αυτές οι αντιδράσεις (π.χ. μη ενζυμικό μαύρισμα, αυτοξείδωση λιπαρών) έχουν διαφορετική θερμοκρασιακή συμπεριφορά (διαφορετική E_A), επηρεάζουν την ολική ποιότητα ανάλογα με το θερμοκρασιακό εύρος σε άλλο βαθμό, με αποτέλεσμα η συνάρτηση της τελευταίας με τη θερμοκρασία να αποκλίνει από τη σχέση Arrhenius. Για παράδειγμα, αν η ποιότητα του τροφίμου εξαρτάται από δύο κυρίως αντιδράσεις τότε η γραφική απεικόνιση της μεταβολής της με το $1/T$ θα έχει διαφορετική κλίση σε κάθε μία από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές περιοχές, όπως φαίνεται και στο σχήμα (1.4) (Labuza, 1982).



Σχήμα 1.4 Τυπική θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού απώλειας της ποιότητας τροφίμου όταν αυτή επηρεάζεται από δύο αντιδράσεις με διαφορετική E_A

Τέλος, στις ενζυμικές και μικροβιολογικές αντιδράσεις, ο ρυθμός των αντιδράσεων παρουσιάζει θερμοκρασιακό μέγιστο κάτω και άνω του οποίου ακολουθείται συμπεριφορά Arrhenius (σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5 Τυπική καμπύλη της θερμοκρασιακής εξάρτησης του ρυθμού σε ενζυμικές και μικροβιολογικές αντιδράσεις

1.7.1.3 Δραστική θερμοκρασία (T_{eff})

Η μεταβολή της συνάρτησης ποιότητας κατά τη διάρκεια έκθεσης σε γνωστή μεταβαλλόμενη θερμοκρασία, $T(t)$, μπορεί να υπολογιστεί με αντικατάσταση της σταθεράς ρυθμού από την έκφραση της θερμοκρασιακής της εξάρτησης και ολοκλήρωση της εξίσωσης. Έτσι, σε χρόνο t θα έχουμε:

$$f(A)_t = \int_0^t k dt = k_A \int_0^t e^{-\frac{E_A}{RT(t)}} dt \quad (1.16)$$

Ένας άλλος τρόπος έκφρασης της τιμής του $f(A)_t$ είναι συναρτήσει της δραστικής θερμοκρασίας.

Ορίζεται ως **δραστική θερμοκρασία**, T_{eff} , η σταθερή θερμοκρασία έκθεσης στην οποία, για το ίδιο χρονικό διάστημα, η μεταβολή της ποιότητας είναι η ίδια με τη μεταβολή της ποιότητας στις συνθήκες της μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας $T(t)$. Οπότε η παραπάνω σχέση γίνεται:

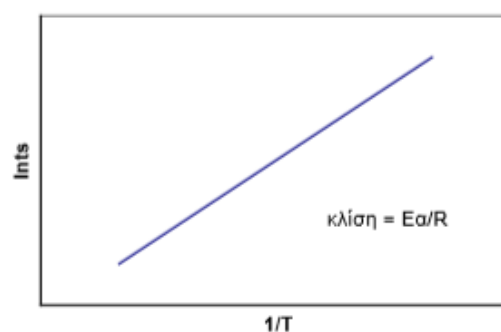
$$f(A)_t = k_A e^{-\frac{E_A}{RT_{eff}} t} \rightarrow T_{eff} = -\frac{E_A}{R \ln\left(\frac{f(A)_t}{k_A t}\right)} \quad (1.17)$$

Η δραστική θερμοκρασία είναι μία πολύ σημαντική έννοια η οποία πρακτικά αντικαθιστά μία κατανομή θερμοκρασίας $T(t)$ με μία μόνο τιμή. Χρειάζεται να τονιστεί ότι η T_{eff} δεν είναι ίση με τη μέση θερμοκρασία T_m , όπου:

$$T_m = \frac{1}{t} \int_0^t T(t) dt \quad (1.18)$$

1.7.1.4 Απλό ή λογαριθμικό μοντέλο διατηρησιμότητας

Για έναν δεδομένο βαθμό αλλοίωσης, ο οποίος μεταφράζεται σε τιμή της συνάρτησης ποιότητας, η σταθερά ρυθμού είναι αντιστρόφως ανάλογη του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη συγκεκριμένου βαθμού ποιοτικής υποβάθμισης. Το ίδιο ισχύει και για το t_s , τον χρόνο στον οποίο η ποιότητα φτάνει σε μη αποδεκτά επίπεδα ή αλλιώς τη διάρκεια ζωής του τροφίμου. Έτσι, η γραφική απεικόνιση του λογάριθμου της διάρκειας ζωής ($\ln t_s$) ως προς $1/T$ θα δώσει μία ευθεία γραμμή με κλίση ίση με E_A/R , όπως φαίνεται στο σχήμα (1.6).



Σχήμα 1.6 Γραφική απεικόνιση του λογαρίθμου της διάρκειας ζωής ως προς το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας

1.7.1.5 Μοντέλο Q₁₀

Ένας άλλος τρόπος έκφρασης της επίδρασης της θερμοκρασίας στη διατηρησιμότητα, πολύ σύνηθες στην παλαιότερη βιβλιογραφία και βιομηχανία τροφίμων, είναι ο όρος Q₁₀. Ο παράγοντας Q₁₀ ορίζεται ως ο λόγος των σταθερών του ρυθμού αντίδρασης σε δύο θερμοκρασίες που διαφέρουν κατά 10 βαθμούς Κ ή °C. Ισοδύναμα, το Q₁₀ έχει οριστεί και ως η μεταβολή στη διάρκεια ζωής θ_s ενός προϊόντος όταν το τρόφιμο αποθηκεύεται σε θερμοκρασία υψηλότερη κατά 10° C. Η εξίσωση είναι:

$$Q_{10} = \frac{k(T+10)}{k(T)} = \frac{\theta_s(T)}{\theta_s(T+10)} \quad (1.19)$$

Το Q₁₀ εισάγει την παρακάτω εξίσωση εξάρτησης της θερμοκρασίας:

$$k(T) = k_0 e^{bT} \quad (1.20 \text{ a})$$

$$\text{ή } \ln k = \ln k_0 + bT \quad (1.20 \text{ b})$$

από την οποία συμπεραίνεται ότι αν απεικονιστεί γραφικά το lnk με τη θερμοκρασία T (σε αντίθεση με το 1/T στην εξίσωση Arrhenius) προκύπτει ευθεία. Το ίδιο ισχύει και για το lnθ_s με τη θερμοκρασία T. Αυτές οι γραφικές παραστάσεις ονομάζονται διαγράμματα διατηρησιμότητας ή διάρκειας ζωής (shel-life plot), όπου το b είναι η κλίση της ευθείας και lnk₀ η αποτέμνουσα.

Οι παραπάνω απεικονίσεις αντιπροσωπεύουν την πραγματικότητα μόνο για στενές θερμοκρασιακές περιοχές 10 έως 20°C (Labuza, 1982). Το Q₁₀ και το b συσχετίζονται με την ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης που καθορίζει την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου από την παρακάτω σχέση:

$$\ln Q_{10} = 10b = \frac{E_A}{R} \frac{10}{T(T+10)} \quad (1.21)$$

Η εξάρτηση του Q₁₀ από τη θερμοκρασία γίνεται πιο έντονη όσο πιο μεγάλη είναι η ευαισθησία της αντίδρασης ως προς τη θερμοκρασία.

1.7.2 Επίδραση της ενεργότητας του νερού

Εκτός από τη θερμοκρασία, η περιεχόμενη υγρασία και η ενεργότητα νερού (α_w) είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό των αντιδράσεων αλλοίωσης των τροφίμων. Η ενεργότητα του νερού περιγράφει το

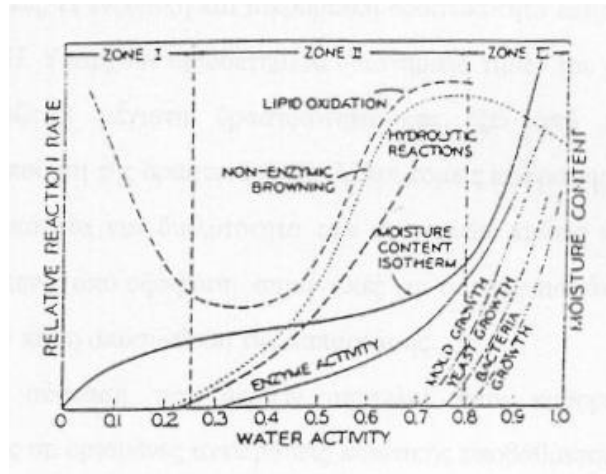
πόσο ισχυρά δεσμευμένο είναι το περιεχόμενο νερό στο τρόφιμο και το βαθμό “διαθεσιμότητας” του νερού να δρα ως διαλύτης και να συμμετέχει σε χημικές αντιδράσεις (Labuza, 1980).

Υπάρχουν ορισμένα κρίσιμα όρια του a_w πάνω από τα οποία παρατηρούνται ανεπιθύμητες μεταβολές στα τρόφιμα. Ο έλεγχος του a_w αποτελεί βασικό παράγοντα για τη διατήρηση των ξηρών και μέσης υγρασίας τροφίμων (IMF). Επίσης, μπορούν να οριστούν ελάχιστες τιμές a_w για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Το κρίσιμο όριο παθογένεσης στα τρόφιμα ορίζεται για ενεργότητα $a_w=0.84-0.85$ (το πιο ανθεκτικό παθογόνο βακτήριο είναι το *Staphylococcus aureus*) (Ταουκίς et al., 1988).

Η υφή του τροφίμου επηρεάζεται επίσης σημαντικά από την περιεχόμενη υγρασία και την ενεργότητα του νερού a_w . Τα ξηρά και τραγανά τρόφιμα χάνουν το κύριο χαρακτηριστικό της υφής τους, την τραγανότητά τους, όταν αυξάνεται η περιεχόμενη υγρασία τους συνήθως σε διάστημα a_w από 0.35 έως 0.5 (Katz & Labuza, 1981). Τρόφιμα μέσης υγρασίας, όπως αποξηραμένα φρούτα και προϊόντα αρτοποιίας και ζαχαροπλαστικής, χάνοντας υγρασία σε διάστημα a_w μεταξύ 0.5 - 0.7, γίνονται πολύ σκληρά.

Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα, σχετικό με την ενεργότητα νερού a_w , είναι το φαινόμενο της ανακρυστάλλωσης. Εμφανίζεται στα τρόφιμα που περιέχουν άμορφα σάκχαρα όταν η a_w αυξάνει πάνω από 0.35 με 0.40, οπότε τα άμορφα σάκχαρα ανακρυσταλλώνονται απελευθερώνοντας νερό με επιπτώσεις στην ποιότητα και την υφή του τροφίμου (Labuza & Contreras-Medellin, 1981).

Εκτός από τα κρίσιμα όρια της a_w , η ενεργότητα του νερού επιδρά και στις χημικές αντιδράσεις. Η επίδραση αυτή παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατηρησιμότητα των ξηρών και μέσης υγρασίας τροφίμων. Γενικά, η ιδιότητα του νερού να συμπεριφέρεται ως διαλύτης, αλλά και αντιδραστήριο, αυξάνεται αυξανόμενης της τιμής της a_w . Σαν αποτέλεσμα, έχουμε την εκθετική αύξηση του ρυθμού πολλών αντιδράσεων αλλοίωσης των τροφίμων όσο αυξάνεται η a_w πάνω από την τιμή που αντιστοιχεί στο μονομοριακό στρώμα νερού. Τα παραπάνω παρουσιάζονται σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα σταθερότητας (1.7).



Σχήμα 1.7 Ολικός χάρτης σταθερότητας των τροφίμων (Labuza et al., 1969)

1.7.3 Η επίδραση του pH

Η επίδραση του pH έχει μελετηθεί για διάφορα συστήματα τροφίμων και αντιδράσεις. Η ενζυμική και μικροβιακή δραστηριότητα επηρεάζεται σημαντικά από το pH. Υπάρχουν οριοθετημένα διαστήματα τιμών του pH μέσα στα οποία παρουσιάζεται μέγιστη δραστηριότητα και έξω από τα οποία έχουμε ελαχιστοποίηση της δραστηριότητας. Άλλοι τομείς επίδρασης του pH είναι στη λειτουργικότητα και διαλυτότητα των πρωτεϊνών καθώς και σε αντιδράσεις καταλυόμενες από οξύ-βάση, σημαντικές για τα τρόφιμα, όπως το μη ενζυμικό μαύρισμα και η αποσύνθεση της ασπαρτάμης.

1.7.4 Η επίδραση των αερίων

Η σύσταση των αερίων αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα επίδρασης σε ορισμένες αντιδράσεις ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων. Η διαθεσιμότητα οξυγόνου είναι πολύ σημαντική για οξειδωτικές αντιδράσεις και μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό και τη φαινόμενη τάξη αντίδρασης. Η συσκευασία κενού βασίζεται στη μείωση της ταχύτητας ανεπιθύμητων αντιδράσεων με περιορισμό του διαθέσιμου O_2 . Επιπλέον, η παρουσία άλλων αερίων, ειδικότερα του CO_2 , επηρεάζει σημαντικά βιολογικές και μικροβιολογικές αντιδράσεις στο φρέσκο κρέας, ψάρια, φρούτα και λαχανικά. Άλλα σημαντικά αέρια είναι το αιθυλένιο και το μονοξείδιο του άνθρακα. Πολλές επιτυχημένες εφαρμογές πάνω στη συσκευασία ελεγχόμενης (CAP) και τροποποιημένης (MAP) ατμόσφαιρας βασίζονται στην παραπάνω γνώση.

Κινητικά μοντέλα συστημάτων CAP/MAP έχουν εξεταστεί από τους Labuza, Fu and Taoukis (1992).

1.7.5 Η επίδραση της πίεσης

Η μεταβολή της πίεσης στα συστήματα τροφίμων επηρεάζει διάφορα συστατικά τους όπως το νερό, τις πρωτεΐνες, τα λίπη, τα ένζυμα καθώς και μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε αυτά. Μία από τις πιο σύγχρονες τεχνολογίες παραγωγής και συντήρησης τροφίμων η οποία στηρίζεται στην άσκηση υδροστατικών πιέσεων στα τρόφιμα είναι η διεργασία της υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (High Hydrostatic Pressure - HPP). Με την υπερυψηλή υδροστατική πίεση επιτυγχάνεται μείωση του μικροβιακού φορτίου και της ενζυμικής δραστηριότητας, καθώς και μείωση της αλλοίωσης των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.

1.7.6 Μηχανική καταπόνηση

Η μηχανική καταπόνηση προκαλεί μηχανικές φθορές στα τρόφιμα, οι οποίες τα καθιστούν πιο ευάλωτα στην προσβολή από μικροοργανισμούς. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η κατάλληλη επιλογή του υλικού συσκευασίας, ώστε να προστατεύεται το τρόφιμο από μηχανικές αντοχές όπως αντοχή σε κρούση, συμπίεση και διάτμηση.

1.7.7 Η επίδραση του φωτός

Το φως καταλύει και επιταχύνει διάφορες ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα. Για παράδειγμα την οξείδωση των λιπαρών που οδηγεί σε οξειδωτικό ταγγισμό, την οξείδωση του γάλακτος προς σχηματισμό δύσοσμων μερκαπτανών, τις αντιδράσεις αλλοίωσης διάφορων χρωστικών ουσιών, τις αντιδράσεις ορισμένων βιταμινών (ριβοφλαβίνη, βιταμίνη C) που οδηγούν σε απώλεια της αξίας τους, κ.τ.λ. Η καταλυτική επίδραση του φωτός είναι γενικά εντονότερη όσο χαμηλότερο το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, δηλαδή στην περιοχή του υπεριώδους και στα χαμηλότερα μήκη κύματος του ορατού φάσματος.

1.8 Υποβάθμιση της ποιότητας των ψυγμένων τροφίμων – Διαχείριση και έλεγχος της ψυκτικής αλυσίδας

Η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων, εξακολουθεί να χαρακτηρίζεται από μεγάλες απώλειες ποιότητας λόγω σημαντικών αποκλίσεων από τις προδιαγραφές

θερμοκρασίας. Για τα προϊόντα που πρέπει να διακινηθούν και να συντηρηθούν σε ψύξη (δηλαδή ιδανικά στους 0 έως 4°C), όπως είναι τα προϊόντα κρέατος, ψαριών, γαλακτοκομικά κ.τ.λ., η θερμοκρασία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό υποβάθμισης και την τελική ποιότητα των προϊόντων και αποτελεί τη σημαντικότερη κρίσιμη παράμετρο.

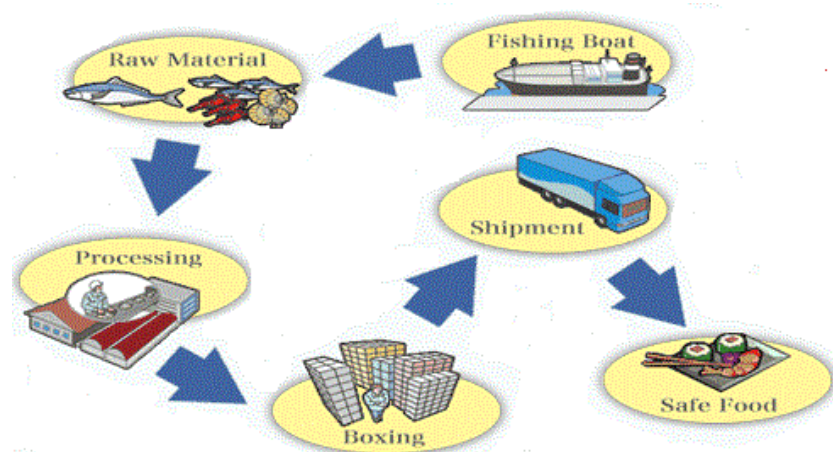
Η ψυκτική αλυσίδα περιλαμβάνει τα διάφορα στάδια μεταφοράς και αποθήκευσης σε ενδιάμεσα σημεία διανομής, στις αποθήκες και τα ψυγεία πώλησης των υπεραγορών και τα ψυγεία των καταναλωτών.

Το πρόβλημα είναι ότι η αλληλουχία των συνθηκών που υφίστανται τα προϊόντα, όταν φύγουν από την άμεση επίβλεψη που είναι εφικτή στη μονάδα παραγωγής, είναι δύσκολο να μετρηθεί. Η ημερομηνία ανάλωσης που αναγράφεται στην ετικέτα των προς κατανάλωση τροφίμων δίνει συνήθως μια ενδιάμεση ένδειξη, με αποτέλεσμα να έχουμε στις περιπτώσεις καλής συντήρησης απόρριψη καλών προϊόντων λόγω “λήξης” τους και σε κάποιες περιπτώσεις κακής συντήρησης, προϊόντα αλλοιωμένα πριν την ημερομηνία ανάλωσης. Για το λόγο αυτό, καθίσταται αναγκαία η παρακολούθηση του χρονο-θερμοκρασιακού ιστορικού τους για τη διασφάλιση της ποιότητάς τους.

Ουσιαστική λύση θα αποτελούσε ένας πρακτικός τρόπος παρακολούθησης του ιστορικού χρόνου-θερμοκρασίας του κάθε προϊόντος και με βάση αυτόν η βελτίωση της διαχείρισης των προϊόντων στην ψυκτική αλυσίδα. Ως ένας ιδιαίτερα υποσχόμενος τέτοιος τρόπος, είναι οι δείκτες ΤΤΙ. Οι **Χρονο-θερμοκρασιακοί Δείκτες ΤΤΙ (TTI=Time Temperature Indicators or Integrators)** είναι ένα πρωτοποριακό σύστημα επισήμανσης των τροφίμων, που μπορεί να λειτουργήσει ταυτόχρονα με την ημερομηνία λήξης. Έχουν τη μορφή μιας “ζωντανής”, χαμηλού κόστους αυτοκόλλητης ετικέτας ή είναι ενσωματωμένοι στην ίδια τη συσκευασία του τροφίμου (Ταούκης, 2010). Οι ΤΤΙ επιτρέπουν τον έλεγχο ενδεχόμενης κακομεταχείρισης του προϊόντος όσον αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης. Είναι “χημικά” ενεργοί και δείχνουν μια εύκολα μετρήσιμη, σωρευτική χρωματική αλλαγή. Η αλλαγή αυτή λ.χ. από πράσινο σε κόκκινο, επιταχύνεται όταν η θερμοκρασία συντήρησης αυξάνει, με τρόπο που να μιμείται τη συμπεριφορά και τη σταδιακή απώλεια ποιότητας του τροφίμου που συνοδεύουν. Έτσι οι δείκτες ΤΤΙ παρακολουθούν το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό των τροφίμων, σε όλη την

πορεία τους από το σημείο παραγωγής, τις ενδιαμέσες φάσεις διανομής μέχρι τον τελικό καταναλωτή. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά της ημερομηνίας ανάλωσης, ως “ζωντανή” ημερομηνία λήξης.

Οι δείκτες ΤΠΙ λαμβάνουν ευρεία εφαρμογή σε ψυγμένα και κατεψυγμένα προϊόντα, παρ’ όλα αυτά πραγματοποιούνται μελέτες και για εφαρμογή τους σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 1.1 Διαδικασία διακίνησης ψαριού μέχρι την κατανάλωσή του

1.9 Εφαρμογή ΤΠΙ για την ασφάλεια των τροφίμων

Πολλά θαλασσινά μέχρι να καταναλωθούν εκτίθενται σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες λόγω μη σωστής διαχείρισής τους. Η αλίευση οστρακοειδών, και στην περίπτωση μας στρειδιών, έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές τα τελευταία χρόνια λόγω μεγάλης επικινδυνότητας. Ο μεγάλος κίνδυνος δεν έγκειται στον τρόπο συντήρησης από τον προμηθευτή και τον καταναλωτή αλλά στο γεγονός ότι πολλά στρείδια καταναλώνονται νωπά πριν το στάδιο της τελικής αποθήκευσης. Μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στα στρείδια σε υψηλές θερμοκρασίες (20–30°C) (Austin et al., 2010; Madigan et al., 2014) και λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα ώστε ν’ αποφευχθεί η έκθεση των οστρακοειδών σε επικίνδυνες συνθήκες και να διατηρηθεί σωστά η ψυκτική αλυσίδα.

Η σημερινή τεχνολογία ΤΠΙ και η επιστημονική προσέγγιση όσον αφορά την ποσοτική μελέτη των κινδύνων ασφάλειας στα τρόφιμα επιτρέπουν το επόμενο σημαντικό βήμα που αφορά τη διαχείριση κινδύνων ασφάλειας των τροφίμων (Koutsoumanis & Gougouli, 2015).

Παρά το γεγονός ότι η δυνατότητα εφαρμογής διαφορετικών συστημάτων για την παρακολούθηση στοχεύει στην ποιότητα τροφίμων και τη διάρκεια ζωής, κυρίως των διατηρημένων με απλή ψύξη προϊόντων, έχει αξιολογηθεί με αρκετές μελέτες (π.χ. Tsironi, Stamatiou, Giannoglou, Velliou, & Taoukis, 2011, 2008; Vaikousi, Biliaderis, & Koutsoumanis, 2009), η διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων βάση των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών. Διατίθενται περιορισμένες πληροφορίες για την ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος, ωστόσο τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται πολλές έρευνες που στοχεύουν στην επέκταση της χρήσης δεικτών ΤΠΙ απ' την ποιότητα των τροφίμων (διατήρηση της ψυκτικής αλυσίδας) στην ασφάλεια (αλλοίωση τροφίμων).

Οι Koutsoumanis, Taoukis & Nychas (2005) εισήγαγαν ένα σύστημα ΤΠΙ βασιζόμενο στην πολιτική διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας και του συστήματος SMAS (Safety Monitoring and Assurance System), για τη βελτιστοποίηση της κατανομής διατηρημένων με απλή ψύξη προϊόντα τροφίμων της ψυκτικής αλυσίδας. Το σύστημα SMAS οδήγησε σε σημαντική μείωση του κινδύνου λιστερίωσης σε σύγκριση με τη συμβατική προσέγγιση First-In-First-Out. Οι Ellouze & Austin (2010) ανέπτυξαν ένα μικροβιακό ΤΠΙ για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* που αναπτύσσονται στο βόειο κρέας και μαγειρεμένο κοτόπουλο. Μία πρόσφατη μελέτη της Tsironi et al. (2016) αξιολόγησε την εφαρμογή ενζυμικών ΤΠΙ για την παρακολούθηση της ανάπτυξης *Vibrio spp* σε στρείδια.

2. ΧΡΟΝΟ-ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Η θερμοκρασία αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων. Η διασφάλιση της ασφάλειας στηρίζεται στην πρόληψη και όχι στη λογική του ελέγχου και αποδοχής του τελικού προϊόντος, με βάση χρονοβόρες και υψηλού κόστους δοκιμές. Παραγωγοί και ελέγχουσες αρχές βασίζονται στην ανάπτυξη και εφαρμογή συστημάτων διαχείρισης με τον καθορισμό, καταγραφή και έλεγχο των κρίσιμων παραμέτρων των τροφίμων σε όλο το κύκλο ζωής τους από την παραγωγή ως τη τελική χρήση τους, όπως αυτό ορίζεται από τις αρχές της Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής (Good Manufacturing Practices) και Ορθής Υγιεινής Πρακτικής (Good Hygiene Practices) (Ταουκίς & Λαβούζα, 2003, Ταουκίς 2001).

Η ορθή εφαρμογή τέτοιων συστημάτων σε συνδυασμό με τη βέλτιστη συσκευασία είναι προϋπόθεση για την επίτευξη μιας αυξημένης διατηρησιμότητας απαραίτητης για την εμπορική βιωσιμότητα των τροφίμων. Νέα υλικά και τεχνικές προσφέρουν νέες δυνατότητες βελτίωσης και επιμήκυνσης της διάρκειας ζωής.

Το θερμοκρασιακό προφίλ στο οποίο εκτίθεται το τρόφιμο επηρεάζει τα θρεπτικά του συστατικά, τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (γεύση, οσμή και υφή) και τη μικροβιολογική του σταθερότητα, η οποία συνδέεται άμεσα με την ασφάλεια του τροφίμου και του καταναλωτή. Επομένως, το προφίλ αυτό δρα θετικά ή αρνητικά πάνω στο τρόφιμο καθιστώντας το είτε ασφαλές και αποδεκτό από τον καταναλωτή, είτε μη αποδεκτό λόγω αλλοιώσεων των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του.

Οι **χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες (Time Temperature Indicators or Integrators-TTI)** αποτελούν μια πρακτική και αποτελεσματική λύση στο παραπάνω πρόβλημα. Αποτελούν ένα έξυπνο σύστημα ελέγχου του τροφίμου με τη μορφή μιας μικρής ευφυούς ετικέτας. Οι TTI υποδεικνύουν τη χρονο-θερμοκρασιακή ιστορία ενός τροφίμου που χρησιμοποιεί μια μη αναστρέψιμη χημική μεταβολή και ανιχνεύεται ως ορατή απόκριση με τη μορφή μηχανικής παραμόρφωσης, αλλαγής ή κίνησης χρώματος. Οι TTI είναι απλοί, οικονομικά αποδοτικοί και φιλικόι προς τους χρήστες

δείκτες για την παρακολούθηση, την καταγραφή και τη μετάφραση των πληροφοριών ποιότητας των τροφίμων (Taoukis & Labuza, 2003; Vaikouisi et al., 2008). Επομένως, το συνολικό αποτέλεσμα της ιστορίας της θερμοκρασίας ενός προϊόντος στην ποιότητα, την ασφάλεια και διάρκεια ζωής των τροφίμων μπορεί να παρατηρηθεί με τη χρήση ενός ΤΤΙ (Ellouze & Austin, 2010). Διαφορετικοί τύποι ΤΤΙ έχουν αναπτυχθεί βασισμένοι σε ενζυμικές, βιολογικές και αντιδράσεις πολυμερισμού.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματική εφαρμογή ενός συστήματος ελέγχου ΤΤΙ είναι η κινητική μελέτη και μαθηματική προτυποποίηση αλλοίωσης των τροφίμων αλλά και της απόκρισης του ΤΤΙ (Tsironi et al., 2011). Η επίδραση της θερμοκρασίας στην οποία βασίζεται η απόδοση ενός τέτοιου συστήματος διερευνάται χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius (Ellouze & Austin, 2010). Επίσης, ο νόμος διάχυσης του Fick μπορεί να εφαρμοστεί για τη δημιουργία ενός κινητικού μοντέλου σε σχέση με το ρυθμό διάχυσης ΤΤΙ (Galagan & Su, 2008).

2.2 Ορισμός, αρχή λειτουργίας, κατηγοριοποίηση των ΤΤΙ

2.2.1 Ορισμός ΤΤΙ

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες (Time Temperature Integrators, ΤΤΙ) είναι απλά, οικονομικά συστήματα, τα οποία με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, δείχνουν το θερμοκρασιακό ιστορικό και την ποιοτική κατάσταση του τροφίμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένα, αντικατροπίζοντας το πλήρες ή μερικό θερμοκρασιακό προφίλ του (Taoukis & Labuza, 1989a).

Οι ΤΤΙ αποτελούν συνιστώσα μιας δρώσας, έξυπνης συσκευασίας, ενσωματωμένοι σε αυτήν ή με τη μορφή μιας πρόσθετης "ζωντανής" ετικέτας. Είναι ένα ιδιαίτερα υποσχόμενο σύστημα επισήμανσης των τροφίμων, που μπορεί να λειτουργήσει ταυτόχρονα με την ημερομηνία λήξης. Επιτρέπουν τον έλεγχο ενδεχόμενης κακομεταχείρισης του προϊόντος όσον αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης. Οι δείκτες ΤΤΙ παρακολουθούν το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό των τροφίμων, σε όλη την πορεία τους από το σημείο παραγωγής, τις ενδιάμεσες φάσεις μέχρι τον καταναλωτή.

2.2.2 Αρχές λειτουργίας των ΤΤΙ

Η **αρχή λειτουργίας** των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών στηρίζεται σε μια μη αντιστρεπτή μεταβολή η οποία εκφράζεται ως ορατή απόκριση αλλαγής χρώματος. Η μεταβολή αυτή μπορεί να έχει τη μορφή μηχανικής, χημικής, φωτοχημικής, ενζυμικής ή μικροβιολογικής μεταβολής ενώ η ορατή απόκριση μπορεί να είναι κάποια παρατηρούμενη μηχανική παραμόρφωση ή αλλαγή χρώματος.

Η θερμοκρασία είναι ο παράγοντας που καθορίζει το ρυθμό της μη αντιστρεπτής μεταβολής και αυξάνεται στις πιο υψηλές θερμοκρασίες με τρόπο ανάλογο των περισσότερων φυσικοχημικών αντιδράσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ορατή απόκριση να δίνει μια αθροιστική ένδειξη των θερμοκρασιακών συνθηκών στις οποίες έχει εκτεθεί το ΤΤΙ.

2.2.3 Κατηγοριοποίηση των ΤΤΙ

Με το πέρασμα των χρόνων και την εξέλιξη των δεικτών, έχουν προταθεί διαφορετικές διαβαθμίσεις και ορολογίες. Σε ένα ΤΤΙ, ο βαθμός στον οποίο η ορατή απόκριση αντικατοπτρίζει το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου εξαρτάται από τον τύπο του δείκτη και τις φυσικοχημικές αρχές λειτουργίας του, σύμφωνα με τα οποία ταξινομούνται οι δείκτες.

Ένα από τα πρώτα συστήματα ταξινόμησης (Schoen & Byrne, 1972) διαχώριζε τους δείκτες σε έξι κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένης της ηλεκτρονικής καταγραφής της θερμοκρασίας. Ο Byrne (1976) αναθεώρησε συνειδητοποιώντας ότι η κύρια ενδιαφέρουσα λειτουργική διαφορά είναι αν η ένδειξη ανταποκρίνεται πάνω από μία προεπιλεγμένη θερμοκρασία ή ανταποκρίνεται συνεχώς, δίνοντας μια αθροιστική ένδειξη των θερμοκρασιακών συνθηκών στις οποίες εκτίθεται. Ο ίδιος πρότεινε τρεις τύπους:

- Δείκτες απόψυξης
- Χρονο-θερμοκρασιακούς ολοκληρωτές
- Χρονο-θερμοκρασιακούς ολοκληρωτές/δείκτες

Στη συνέχεια, ένα παρόμοιο σύστημα ταξινόμησης προτάθηκε από τους Singh & Wells (1985):

- Δείκτες που δηλώνουν κακομεταχείριση

- Δείκτες μερικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ
- Δείκτες συνολικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ

2.2.3.1 Κατηγοριοποίηση με βάση τη λειτουργικότητα των ΤΤΙ

Με βάση την πιο πρόσφατη κατηγοριοποίηση που προτάθηκε από τους Ταουκίς & Labuza (2003), έχουμε τις ακόλουθες τρεις κατηγορίες:

- **Δείκτες Κρίσιμης Θερμοκρασίας (CTI)**

Οι δείκτες κρίσιμης θερμοκρασίας δίνουν απόκριση όταν η θερμοκρασία είναι πάνω ή κάτω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία αναφοράς. Περιλαμβάνουν ένα στοιχείο του χρόνου (της τάξεως των λεπτών ή λίγων ωρών) αλλά δεν δείχνουν το ιστορικό έκθεσης πάνω ή κάτω από τη θερμοκρασία αναφοράς. Ακόμα, μπορούν να προειδοποιήσουν σε περιπτώσεις όπου διάφορες είτε φυσικοχημικές, είτε βιολογικές αντιδράσεις εμφανίζουν κάποια ασυνεχή αλλαγή στο ρυθμό τους.

- **Ολοκληρωτές Κρίσιμης Θερμοκρασίας - Χρόνου (CTTI)**

Η απόκριση των CTTI αντικατοπτρίζει την αθροιστική έκθεση πέρα από τα όρια μίας κρίσιμης θερμοκρασίας αναφοράς. Η απόκριση αυτή μπορεί να μεταφραστεί σε ισοδύναμο χρόνο έκθεσης στην κρίσιμη θερμοκρασία. Είναι χρήσιμοι ως ένδειξη προβλημάτων στην αλυσίδα διακίνησης προϊόντων καθώς και σε περιπτώσεις όπου τίθενται σε εφαρμογή αντιδράσεις επιζήμιες για την ποιότητα ή την ασφάλεια των τροφίμων πέρα από την κρίσιμη θερμοκρασία.

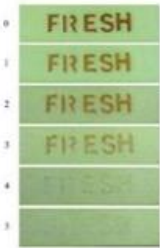





- **Χρονο-θερμοκρασιακοί Ολοκληρωτές ή Δείκτες (TTI)**

Οι δείκτες ΤΤΙ (Time Temperature Integrators) ή ΤΤΜ (Time Temperature Monitors) δίνουν μία συνεχή απόκριση, που εξαρτάται από το θερμοκρασιακό ιστορικό του προϊόντος. Ολοκληρώνουν, σε μία μόνο μέτρηση, το συνολικό χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να δείξουν μία μέση θερμοκρασία διακίνησης του τροφίμου. Οι δείκτες αυτοί μπορούν να συσχετισθούν με συνεχείς εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία αντιδράσεις υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων.

2.2.3.2 Κατηγοριοποίηση με βάση την αρχή λειτουργίας των ΤΤΙ

Η κατηγοριοποίηση των ΤΤΙ σύμφωνα με την αρχή λειτουργία τους φαίνεται στον πίνακα (2.1).

Πίνακας 2.1 Κατηγοριοποίηση των ΤΤΙ με βάση την αρχή λειτουργίας τους

Δείκτες	Παράδειγμα
Μηχανικοί Δείκτες	
Χημικοί Δείκτες	
Φωτοχημικοί Δείκτες	
Ενζυμικοί Δείκτες	
Μικροβιολογικοί Δείκτες	
Πολυμερικοί Δείκτες	
Ηλεκτροχημικοί Δείκτες	
Δείκτες Διάχυσης	

2.3 Προδιαγραφές και χαρακτηριστικά ενός ιδανικού ΤΤΙ

Η αποτελεσματικότητα και η αξιοπιστία ενός ΤΤΙ ως δείκτη ποιότητας του τροφίμου εξαρτάται από τα κινητικά χαρακτηριστικά της απόκρισής του. Σημαντική απαίτηση είναι η εξάρτηση του ρυθμού απόκρισης από τη θερμοκρασία, να προσεγγίζει κατά

το δυνατόν την εξάρτηση από τη θερμοκρασία των δράσεων ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου, όπως μικροβιολογικές αλλοιώσεις. Επομένως προϋπόθεση εφαρμογής ενός συστήματος ελέγχου της ψυκτικής αλυσίδας με βάση τους χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες είναι ο σωστός σχεδιασμός της απόκρισής τους με βάση την ενδεδειγμένη γνώση της κινητικής των δεικτών αλλοίωσης του τροφίμου και της εξάρτησής τους από τη θερμοκρασία.

Οι απαιτήσεις για ένα αποτελεσματικό ΤΤΙ είναι να δείχνει μία συνεχή αλλαγή, ο ρυθμός της οποίας αυξάνει με τη θερμοκρασία και ο οποίος δεν αντιστρέφεται όταν η θερμοκρασία μειώνεται (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς & Labuza, 2003). Ένας ιδανικός ΤΤΙ πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς & Labuza, 2003):

- Παρουσιάζει μία συνεχή, χρονο-θερμοκρασιακά εξαρτώμενη αλλαγή.
- Η αλλαγή εκφράζεται ως μία εύκολα μετρούμενη απόκριση και μη αντιστρεπτή.
- Η αλλαγή αυτή μιμείται ή μπορεί να συσχετιστεί με το βαθμό ποιοτικής αλλοίωσης του τροφίμου και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του.
- Είναι αξιόπιστος και δίνει σταθερές αποκρίσεις όταν εκτίθεται στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες.
- Έχει χαμηλό κόστος.
- Είναι ευέλικτος, έτσι ώστε διαφορετικές μορφές του να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορα θερμοκρασιακά διαστήματα (π.χ. ψύξη, κατάψυξη, θερμοκρασία δωματίου) με χρήσιμες περιόδους απόκρισης από μερικές μέρες μέχρι και περισσότερο από ένα χρόνο.
- Είναι μικρός, εύκολα προσαρμόσιμος σαν τμήμα της συσκευασίας του τροφίμου και συμβατός με μια διεργασία συσκευασίας υψηλής ταχύτητας.
- Είναι σταθερός πριν την ενεργοποίηση του και ενεργοποιείται εύκολα.
- Δεν επηρεάζεται από τις υπόλοιπες περιβαλλοντικές συνθήκες πέραν της θερμοκρασίας, όπως το φως, ρυπαντές του αέρα και σχετική υγρασία (RH).
- Είναι ανθεκτικός σε φυσιολογικές μηχανικές καταπονήσεις χωρίς να επηρεάζεται η απόκρισή του.
- Είναι μη τοξικός και στην απίθανη περίπτωση επαφής του με το τρόφιμο δεν περικλείει κινδύνους.

- Είναι σε θέση να μεταφέρει με απλό και ξεκάθαρο τρόπο το μήνυμα στον καταναλωτή ή σε οποιονδήποτε άλλον ενδιαφερόμενο.
- Η απόκρισή του είναι οπτικά κατανοητή και μπορεί να μετρηθεί εύκολα από ηλεκτρονικές συσκευές έτσι ώστε οι πληροφορίες να λαμβάνονται, να αποθηκεύονται και να μεταδίδονται εύκολα και γρήγορα.

Κανένας ΤΤΙ δεν ικανοποιεί απολύτως όλες τις παραπάνω απαιτήσεις για να χαρακτηριστεί ως ιδανικός. Ωστόσο, η εξέλιξη των δεικτών, έχει οδηγήσει σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο και πλέον το μοντέλο του ιδανικού ΤΤΙ προσεγγίζεται αρκετά ικανοποιητικά από τους διαθέσιμους τύπους.

2.4 Διαχρονική εξέλιξη των ΤΤΙ

Οι προσπάθειες για τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού και χαμηλού κόστους δείκτη σηματοδοτήθηκαν όταν έγινε προφανής η μεγάλη σημασία που έχουν οι θερμοκρασιακές μεταβολές στη τελική ποιότητα των τροφίμων. Αρχικά, το ενδιαφέρον προσέγγισαν τα κατεψυγμένα τρόφιμα.

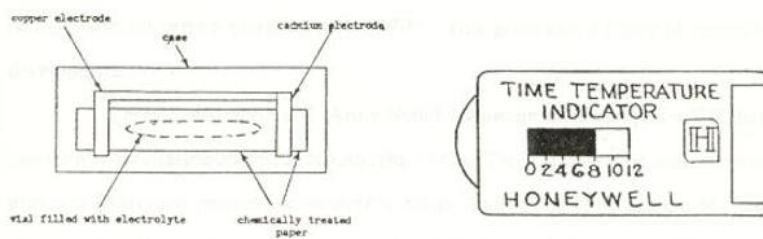
Η πρώτη εφαρμογή “συσκευής” που να δείχνει πιθανή κακομεταχείριση τροφίμου, χρονολογείται ήδη από το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, όταν ομάδες εφοδιαστών του Αμερικανικού στρατού τοποθετούσαν ένα κομμάτι πάγου σε κάθε συσκευασία κατεψυγμένου τροφίμου. Πιθανή εξαφάνιση του πάγου μεταφραζόταν ως κακή μεταχείριση του τροφίμου (Schoen & Byrne, 1972). Ο πρώτος “πατενταρισμένος” δείκτης χρονολογείται το 1993 από τον Midgley. Από τότε έχουν εκδοθεί πάνω από εκατό διαφορετικές πατέντες (αμερικάνικες και διεθνείς) οι οποίες σχετίζονται με τους χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες.

Ο Byrne το 1976 έκανε μια γενική επισκόπηση των αρχικών δεικτών και το 1989 ο Ταουκίς έκανε μια λεπτομερή παρουσίαση των ΤΤΙ. Το 1991 ο Ταουκίς παρέθεσε σε πίνακα πατέντες ΤΤΙ, τα οποία είχαν πρωτοεμφανιστεί από το 1976, εκσυγχρονίζοντας με αυτό τον τρόπο μια ήδη δημοσιευμένη λίστα. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται αξιόλογες πατέντες δεικτών, οι οποίες έχουν ταξινομηθεί χρονολογικά με βάση τον τύπο και την αρχή λειτουργίας του ΤΤΙ.

Πίνακας 2.2 Διάφορα συστήματα TTI με βάση τον τύπο και τον τρόπο απόκρισης.

Χρονολογία	Εφευρέτης	Αρχή λειτουργίας
1991	Jalinski, T.J.	Χημικός (TTI)
1991	Jalinski, T.J.	Χημικός (TTI)
1991	Thierry, A.	Χημικός (CTI)
1991	Swartzel, K.R.	Φυσικοχημικός (TTI)
1992	Jalinski, T.J.	Χημικός (CTI)
1993	Veitch, R.J.	Φυσικοχημικός (TTI)
1993	Loustaunau, A.	Φυσικός (CTI)
1994	Loustaunau, A.	Φυσικός (CTI)
1994	Veitch, R.J.	Φυσικοχημικός (CTI)
1995	Prusik, T.	Φυσικοχημικός (TTI)
1996	Cannelongo, J.F.	Φυσικός (CTI)
1996	Veitch, R.J.	Φυσικός (CTI)
1997	Arens R. et al.	Φυσικοχημικός (TTI)
1997	Schneider, N.	Φυσικός (CTI)
1999	Simons, M.J.	Φυσικοχημικός (CTI)
2000	Schaten, B.B.	Φυσικός (CTI)
2000	Leak & Rönnow	Ενζυμικός (TTI)
2000	Prusik, T.	Φυσικός (CTTI)
2000	Ram, A.T.	Χημικός (TTI)
2000	Bray, A.V.	Φυσικός (TTI)
2001	Simons, M.J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2001	Qiu, J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2002	Qiu, J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2003	Haarer D.	Φυσικοχημικός (TTI)
2005	Bauer & Knorr	Pressure TT (PTTI)
2006	Ciba & Fresh Point Cooperation	Φωτοχημικός (OnVu TTI)
2008	Sun	Amylase type TTI

Η Honeywell Corp. (Minneapolis, MN) δημιούργησε τον πρώτο εμπορικά διαθέσιμο χρονο-θερμοκρασιακό δείκτη TTI (Renier & Morin, 1962) που κρίθηκε αξιόπιστος (Guadagni DG, 1963). Παρ' όλα αυτά δε διατέθηκε ευρέως στην αγορά λόγω του υψηλού κόστους και του μεγάλου όγκου του, ενώ γύρω στο 1970 αποσύρθηκε.



Εικόνα 2.1 Αναλυτική και γενική εικόνα του πρώτου TTI που δημιουργήθηκε, Honeywell TTI

Στις αρχές του 1970, η Αμερικανική κυβέρνηση έκρινε επιτακτική τη χρήση των δεικτών σε συγκεκριμένα προϊόντα, δημιουργώντας αναταραχή στην έρευνα των TTI. Δύο χρόνια μετά η Artech Corp. (Falls Church, VA) δημιούργησε ένα σύστημα TTI για εμπορική ανάπτυξη και έως το 1976, έξι εταιρείες κατασκεύασαν θερμοκρασιακούς δείκτες τουλάχιστον σε στάδιο πρωτοτύπων. Οι δείκτες Artech, Check Spot Co (Vancouver, WA) (US patent 2,971,852) και Tempil (S. Plainfield, NJ) χαρακτηρίστηκαν ως CTI δείκτες ενώ οι δείκτες I-Point (Malmö, Sweden), Bio-Medical Sciences (Fairfield, NJ) (US patents 3,946,611 και 4,042,336) και οι 3M Co. (St. Paul, MN) χαρακτηρίστηκαν ως TTI δείκτες. Ο δείκτης Tempil μπορούσε να λειτουργήσει και ως CTTI δείκτης. Μέχρι τα τέλη του 1970 είχε πραγματοποιηθεί πολύ μικρή εφαρμογή TTI, ενώ η έρευνα για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων των δεικτών συνεχίστηκε, ώσπου στις αρχές του 1980 τέσσερις τύποι δεικτών ήταν εμπορικά διαθέσιμοι συμπεριλαμβανομένων του I-Point και του 3M-TTI. Το 1985 το Andover Labs (Weymouth, MA) εμπορευόταν τους δείκτες Ambitemp και Tempchron. Οι δύο αυτοί δείκτες έβρισκαν εφαρμογή σε κατεψυγμένα τρόφιμα (δείκτες CTTI) και η λειτουργία τους βασιζόταν στη μετακίνηση ενός υγρού κατά μήκος τριχοειδούς σωλήνα.

2.5 Σύγχρονα συστήματα TTI

Τα τελευταία 15 χρόνια, οι ερευνητικές και βιομηχανικές μελέτες έχουν καταλήξει σε τρεις συγκεκριμένους τύπους TTI, οι οποίοι ικανοποιούν τις προδιαγραφές ενός “αποτελεσματικού” TTI και έχουν εξελιχθεί στους κυριότερους εμπορικούς δείκτες

στην αγορά (1. ΤΠΙ που βασίζονται σε αντιδράσεις διάχυσης, 2. ΤΠΙ που βασίζονται σε ενζυμικές αντιδράσεις και 3. ΤΠΙ που βασίζονται σε αντιδράσεις πολυμερισμού στερεάς κατάστασης - Kerry et al., 2008; Ταουκίς & Labuza 2003, Ταουκίς 2001). Ωστόσο η συνήθης λειτουργία αυτών βασίζεται σε αρχές μοριακής διάχυσης, αντιδράσεις πολυμερισμού, αντιδράσεις μεταφοράς ριζών, ενζυμικές μεταβολές και μικροβιακές μεταβολές.

Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ΤΠΙ παρουσιάζονται παρακάτω.

- Δείκτες μοριακής διάχυσης: βασίζονται στη διάχυση ενός ιξωδοελαστικού υλικού σε μια φωτοαντανακλαστική πορώδη μήτρα και η ενεργοποίησή τους πραγματοποιείται με την αφαίρεση ενός φιλμ που είναι τοποθετημένο μεταξύ του πολυμερούς και της μήτρας. Η απόκριση πραγματοποιείται με σταδιακή μεταβολή της διαπερατότητας του φωτός μέσα από την πορώδη μήτρα.
- Χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες πολυμερισμού: χαρακτηρίζονται από μια αντίδραση πολυμερισμού σε στερεή φάση και πραγματοποιείται αποχρωματισμός της εικόνας που μετριέται με τη μείωση της διάθλασης του φωτός.
- Χημικοί και φυσικοί δείκτες: βασίζονται σε κάποια φυσικοχημική αντίδραση που ενεργοποιείται με τοποθέτηση της ταινίας ενεργοποίησης πάνω στο δείκτη, παρατηρώντας σταδιακή μεταβολή χρώματος ή αποχρωματισμό της εικόνας.
- Φωτοχημικοί δείκτες: χαρακτηρίζονται από μία αντίδραση μεταφοράς ριζών και ενεργοποιούνται με έκθεση του δείκτη σε ακτινοβολία UV, μεταβάλλοντας το χρώμα του από σκούρο μπλε σε γκρι.
- Μικροβιολογικοί δείκτες: βασίζονται στην ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων με μείωση του pH, μεταβάλλοντας το χρώμα από πράσινο σε φούξια ή με αποχρωματισμό της εικόνας.
- Ενζυμικοί δείκτες: θα αναλυθούν διεξοδικά παρακάτω, διότι αυτοί απασχόλησαν την παρούσα διπλωματική εργασία.

2.5.1 Ενζυμικοί χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες ΤΤΙ

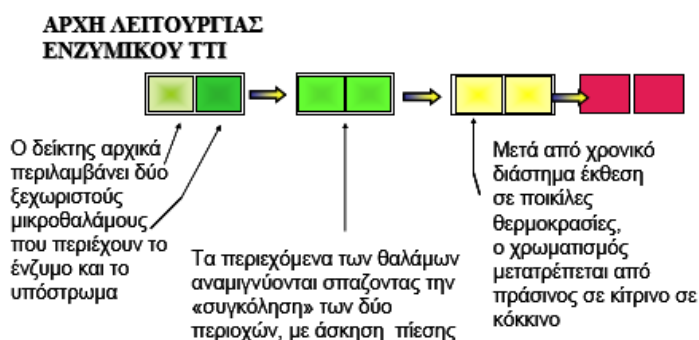
Η αρχή λειτουργίας ενός ενζυμικού δείκτη βασίζεται σε μία χρωματική αλλαγή που προκαλείται από μείωση του pH σαν αποτέλεσμα της ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός λιπαρού υποστρώματος. Πριν την ενεργοποίηση, το ένζυμο και το υπόστρωμα βρίσκονται σε δύο ξεχωριστούς μικροθαλάμους. Κατά την ενεργοποίηση σπάει με επιβολή μηχανικής πίεσης το φράγμα που χωρίζει τους δύο θαλάμους και το ένζυμο αναμειγνύεται με το υπόστρωμα. Η υδρόλυση του υποστρώματος προκαλεί μεταβολή pH, η οποία μεταφράζεται με μια σταδιακή χρωματική αλλαγή. Η χρωματική αυτή αλλαγή είναι ιδιαίτερα ευκρινής και σχετίζεται με την εξέλιξη της χρονο-θερμοκρασιακής επιβάρυνσης του προϊόντος. Διαφορετικά μίγματα ενζύμου-υποστρώματος χρησιμοποιούνται για διαφορετικά θερμοκρασιακά διαστήματα και διάρκειες ζωής. Ανάλογα με την επιδιωκόμενη διάρκεια ζωής του δείκτη και τα θερμοκρασιακά εύρη μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί συνδυασμοί τύπου και συγκέντρωσης ενζύμου-υποστρώματος. Τα αρχικά και τελικά χρώματα αναφοράς εκτυπώνονται γύρω από το παράθυρο της αντίδρασης, έτσι ώστε να είναι πιο εύκολη η οπτική αναγνώριση και εκτίμηση της χρωματικής αλλαγής. Η συνεχής χρωματική αλλαγή μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλα όργανα (Taoukis and Labuza, 1989).

Ακολουθούν δύο παραδείγματα δεικτών ΤΤΙ:

- ΤΤΙ της Avery Denison: Ο δείκτης αυτός βασίζεται στην διάχυση πολικής ενώσεως, μεταξύ δύο στρώσεων πολυμερών, όπου η μεταβολή της συγκέντρωσης προκαλεί τη μεταβολή του δείκτη από κίτρινο σε έντονο κόκκινο χρώμα.
- Δείκτης Fresh-Check® Indicator της Temptime (πρώην Lifelines): Ο δείκτης αυτός βασίζεται στον πολυμερισμό σε στερεή φάση ενός λεπτά επικαλυμένου, άχρωμου, διακετυλενικού μονομερούς το οποίο μετατρέπεται σε ένα πολύ σκούρο πολυμερές.

Άλλο ένα παράδειγμα ενζυμικού δείκτη είναι ο δείκτης Vitsab Time Temperature Indicator, που είναι διάδοχος του I-Point Time Temperature Monitor (Vitsab A.B., Malmö, Sweden). Η εταιρεία Vitsab (Vitsab A.B., Malmö, Sweden) έχει κατασκευάσει

πληθώρα ενζυμικών ΤΠΙ από τη δεκαετία του '80 έως σήμερα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ΤΠΙ της είναι η ευρεία κλίμακα των ενεργειών ενεργοποίησης E_a , η οποία κυμαίνεται από 12-27 kcal/mole. Η μεγάλη αυτή ακτίνα εμβέλειας οφείλεται στο γεγονός ότι σαν υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά και διαφορετικά λιπίδια, καθένα από τα οποία δίνει και μία διαφορετική ενέργεια ενεργοποίησης.



Σχήμα 2.1 Διαμόρφωση και διαδικασία ενεργοποίησης και λειτουργίας του ενζυμικού δείκτη *Check Point* της *Vitsab*



Εικόνα 2.2 Χρωματική απόκριση του ενζυμικού δείκτη *Check Point* της *VITSAB*

Οι δείκτες της *Vitsab* μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το είδος ενζύμου και υποστρώματος, τη συγκέντρωση και αναλογία ενζύμου-υποστρώματος αλλά και τα διακριτικά στάδια χρωματικής αλλαγής. Για καθένα από αυτά τα κριτήρια προκύπτουν διαφορετικοί τύποι και ονομασίες δεικτών.

- **Ταξινόμηση με βάση το είδος του ενζύμου και του υποστρώματος**

Ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος προκύπτουν διαφορετικοί τύποι ΤΠΙ με διαφορετικά χαρακτηριστικά απόκρισης και θερμοκρασιακή ευαισθησία (*Vitsab A.B.*, Malmo, Sweden), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (2.3).

Πίνακας 2.3 Διαφορετικοί τύποι Vitsab TTI ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος.

Τύπος	Ένζυμο	Υπόστρωμα
L	<i>Rhizopus oryzae</i> λιπάση	Τριλαουρίνη
P	<i>Rhizopus oryzae</i> λιπάση	Τριπαλμιτίνη
B	<i>Rhizopus oryzae</i> λιπάση	Τριβουτυρίνη
C	<i>Rhizopus oryzae</i> λιπάση	Τρικαπροΐνη
M	<i>Rhizopus oryzae</i> λιπάση	Μυριστικός μεθυλεστέρας
LP	<i>Rhizopus oryzae</i> λιπάση	Συνδιασμός τριλαουρίνης τριπαλμιτίνης
LM	<i>Rhizopus oryzae</i> λιπάση	Συνδιασμός τριλαουρίνης, μυριστικού μεθυλεστέρα

- Ταξινόμηση με βάση τη συγκέντρωση και την αναλογία ενζύμου-υποστρώματος

Οι αναλογίες ενζύμου-υποστρώματος προσδιορίζουν διαφορετικές διάρκειες ζωής και σε διαφορετικά θερμοκρασιακά φάσματα.

Πίνακας 2.4 Διαφορετικοί τύποι Vitsab TTI με βάση διαφορετικές αναλογίες ενζύμου-υποστρώματος

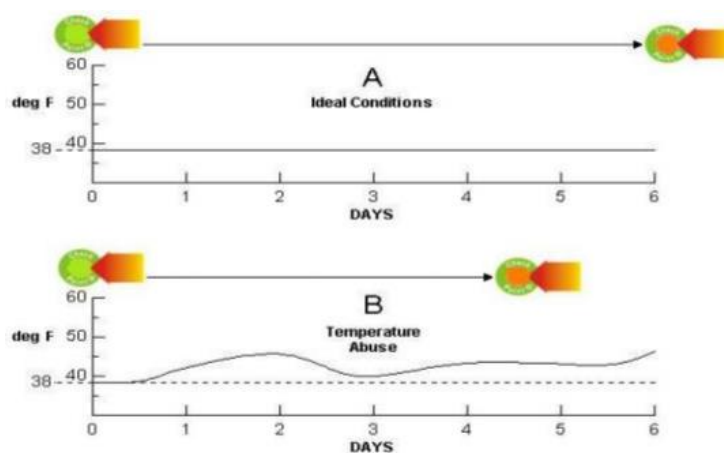
Τύπος	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
M4-30	4°C	30 ημέρες
M4-5	4°C	5 ημέρες
L5-24	5°C	24 ημέρες
L5-8	5°C	8 ημέρες
LM10-2	10°C	2 ημέρες

- Ταξινόμηση με βάση τα στάδια της χρωματικής αλλαγής

Ανάλογα με τα διακριτικά στάδια χρωματικής αλλαγής τα ενζυμικά TTI της Vitsab διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

















- Δίχρωμοι (Bicolor) TTI: Στα TTI αυτά το “παράθυρο ελέγχου” μόλις ενεργοποιείται φέρει βαθύ πράσινο χρωματισμό και στο τέλος της αντίδρασης καταλήγει σε κίτρινο χρώμα. Παρέχουν ενδείξεις για τις ακραίες καταστάσεις του τροφίμου και βρίσκουν εφαρμογή σε περιπτώσεις που είναι αναγκαία μόνο η γνώση του αποδεκτού και του μη αποδεκτού.
- Τρίχρωμοι (Tricolor) TTI: Το “παράθυρο ελέγχου” μόλις ενεργοποιείται φέρει βαθύ πράσινο χρωματισμό, στη μέση της αντίδρασης γίνεται κίτρινο και στο τέλος της αντίδρασης κόκκινο. Οι τρίχρωμοι TTI παρέχουν τη δυνατότητα ένδειξης της ενδιάμεσης κατάστασης του τροφίμου (κίτρινος χρωματισμός του δείκτη) και όχι μόνο των ακραίων καταστάσεων (πράσινος και κόκκινος χρωματισμός), δίνοντας με αυτό τον τρόπο πληροφορίες για το επίπεδο φρεσκότητας.

Οι δίχρωμοι TTI χρησιμοποιούνται ευρέως από τη βιομηχανία και εμπλεκόμενους φορείς στην αλυσίδα τροφίμων, ενώ οι τρίχρωμοι δείκτες απευθύνονται στο καταναλωτικό κοινό εφόσον είναι περισσότερο κατανοητοί και είναι ευκολότερη η παρακολούθηση των σταδίων χρωματικής μεταβολής.



Σχήμα 2.2 Χρόνος λήξης ενός ενζυμικού TTI σε ιδανικές και μη θερμοκρασιακές συνθήκες

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η χρωματική κλίμακα και η αντίστοιχη τιμή pH για τα ενζυμικά TTI της Vitsab.

tricolor TTIs								
bicolor TTIs								
pH	8.9	8.5	8.0	7.5	7.0	6.8	6.5	6.0

Σχήμα 2.3 Χρωματική κλίμακα και τα αντίστοιχα pH για τα TTI της Vitsab

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε ένας καινούργιος ενζυμικός χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης, η αρχή λειτουργίας του οποίου βασίζεται στην ενζυμική υδρόλυση μεταξύ της αμυλάσης και του αμύλου (Yan et al., 2007).



Εικόνα 2.3 Χρωματική κλίμακα του δίχρωμου και τρίχρωμου Vitsab TTI

2.6 Κινητική απόκριση των δεικτών TTI

Η μετρήσιμη απόκριση ενός δείκτη εκδηλώνεται ως αποτέλεσμα ενός βιολογικού, φυσικού, χημικού, φυσικοχημικού ή φωτοχημικού φαινομένου. Η θερμοκρασία και ο χρόνος καθορίζουν το ρυθμό εξέλιξης του φαινομένου αυτού. Για την ορθή κρίση, αξιολόγηση, χρήση και εφαρμογή της απόκρισης των δεικτών είναι απαραίτητο να έχουν προηγηθεί ο ακριβής καθορισμός των χαρακτηριστικών απόκρισης του TTI και η περιγραφή της κινητικής του με μαθηματικό τρόπο.

Επομένως, γίνεται χρήση μιας κινητικής προσέγγισης, με στόχο τη δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου το οποίο θα χαρακτηρίζει τη συμπεριφορά του TTI, παρόμοιας με την κινητική της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων. Εάν τεθεί ως X η μετρήσιμη μεταβολή του δείκτη, τότε είναι απαραίτητο να αναζητηθεί μια συνάρτηση $F(X)$ της μορφής:

$$F(X) = kt \quad (2.1)$$

όπου $F(X)$: η συνάρτηση απόκρισης του TTI και

k : η σταθερά του ρυθμού, εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία

Αφού το φαινόμενο, στο οποίο οφείλεται η απόκριση του ΤΤΙ ακολουθεί μια θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου Arrhenius, τότε και η σταθερά k θα εμφανίζει την ίδια θερμοκρασιακή εξάρτηση και θα ισχύει η παρακάτω σχέση:

$$k = k_I e^{\left(-\frac{E_{AI}}{RT}\right)} \quad (2.2)$$

όπου k_I , E_{AI} : οι κινητικές παράμετροι του συστήματος

Για ένα δείκτη ΤΤΙ, ο οποίος εκτίθεται στην ίδια θερμοκρασιακή κατανομή με το τρόφιμο $T(t)$, η συνάρτηση απόκρισής του σε χρόνο t μπορεί να περιγραφεί από την παρακάτω εξίσωση:

$$F(X)_t = \int_0^t k dt = k_I \int_0^t e^{\left(-\frac{E_{AI}}{RT(t)}\right)} dt \quad (2.3)$$

Η $F(X)_t$ συναρτήσει της δραστικής θερμοκρασίας θα δίνεται από τη σχέση:

$$F(X)_t = k_I e^{\left(-\frac{E_{AI}}{R T_{eff}}\right)} \quad (2.4)$$

2.7 Αντιστοίχιση απόκρισης ΤΤΙ με την ποιότητα των τροφίμων

Έναυσμα για την ανάπτυξη των ΤΤΙ αποτέλεσε η κατανόηση της ισχυρής επίδρασης που έχει η θερμοκρασία διατήρησης στην ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων. Ο συσχετισμός όμως της απόκρισης των δεικτών με μια τιμή που να αποτελεί έκφραση της ποιότητας των τροφίμων δεν είναι άμεσος.

Αρχική προσέγγιση αυτού του συσχετισμού επιτεύχθηκε μέσω της θεώρησης μιας συνολικής καμπύλης θερμοκρασιακής εξάρτησης (ή μιας ζώνης μεταξύ δύο καμπυλών) της διάρκειας ζωής (προσέγγιση σημείου λήξης) μιας γενικής τάξης τροφίμων – π.χ. κατεψυγμένα τρόφιμα – και η κατασκευή ενός δείκτη με όμοια καμπύλη θερμοκρασιακής εξάρτησης, όσον αφορά τον απαιτούμενο χρόνο για κάποιο συγκεκριμένο σημείο της κλίμακας (Renier & Morin, 1962).

Παρ' όλα αυτά γρήγορα διαπιστώθηκε ότι μια γενίκευση σαν αυτή δεν ήταν καθόλου αξιόπιστη, αφού ακόμα και τρόφιμα του ίδιου τύπου παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές στην συμπεριφορά της ποιοτικής υποβάθμισης και τη θερμοκρασιακή εξάρτηση – π.χ. τα κατεψυγμένα τρόφιμα είχαν ένα διάστημα τιμών Q_{10} από 2 μέχρι 17 (Bengtsson et al., 1972).

Συνεπώς, κρίθηκε ότι η θερμοκρασιακή εξάρτηση της συμπεριφοράς των ΤΠΙ πρέπει να ταιριάζει με αυτή του συγκεκριμένου τροφίμου το οποίο εξετάζεται (Hayakawa & Wong, 1974; Krammer & Farquhar, 1976). Η συγκεκριμένη προσέγγιση απαιτούσε την ύπαρξη μεγάλου αριθμού ΤΠΙ και αυτό ήταν πρακτικά αδύνατο. Εξάλλου, μια άλλη σημαντική παράλειψη ήταν το γεγονός ότι οι καμπύλες συσχετισμού της απόκρισης με τη θερμοκρασία για τα ΤΠΙ και της ποιοτικής υποβάθμισης με τη θερμοκρασία για τα τρόφιμα θα έπρεπε να έχουν την ίδια μορφή (π.χ. γραμμική). Η πολυπλοκότητα αντιστοίχισης της απόκρισης των δεικτών με την ποιότητα των προϊόντων, είχε ως αποτέλεσμα την πραγματοποίηση πληθώρας πειραματικών μελετών (Rodriquez & Zaritzki, 1983; Mistry & Kosikowski, 1983; Dolan et al., 1985; Tinker et al., 1985). Στόχος των μελετών αυτών ήταν η συσχέτιση ανάμεσα σε συγκεκριμένα ΤΠΙ και συγκεκριμένα τρόφιμα.

Οι μελέτες αυτές στηρίζονταν στην αποθήκευση των τροφίμων σε διαφορετικές θερμοκρασίες και στη δημιουργία διαγραμμάτων της απόκρισης των ΤΠΙ και των τιμών των επιλεγμένων παραμέτρων ποιότητας των τροφίμων ως προς το χρόνο. Κατόπιν πραγματοποιούνταν στατιστική επεξεργασία του συσχετισμού της απόκρισης των ΤΠΙ με τις ποιοτικές παραμέτρους των τροφίμων. Σημειώνεται, ότι σε όλες τις μελέτες πραγματοποιήθηκαν οργανοληπτικές αναλύσεις των ποιοτικών παραμέτρων των εξεταζόμενων τροφίμων.

Παρά τις χρήσιμες πληροφορίες που πρόσφεραν οι παραπάνω μελέτες, εμφάνισαν μερικά μειονεκτήματα. Κάποιες έρευνες δεν χρησιμοποιούσαν τις κατάλληλες θερμοκρασίες αποθήκευσης ούτε τα κατάλληλα ΤΠΙ για τα συγκεκριμένα θερμοκρασιακά διαστήματα και χρόνους αποθήκευσης. Επίσης, από τη στιγμή που δεν κατασκευάζονταν μοντέλα που να δείχνουν τη χρονοθερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης των ΤΠΙ, η εφαρμογή τους περιοριζόταν στα συγκεκριμένα μόνο τρόφιμα και για τις συγκεκριμένες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το μεγαλύτερο και σημαντικότερο μειονέκτημα ακόμα και των καλύτερων μελετών.

Με βάση τα παραπάνω καθίσταται προφανές ότι για την κατασκευή ενός ικανοποιητικού ΤΠΙ είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μιας προσέγγισης που να επιτρέπει το συσχετισμό της απόκρισης ενός συγκεκριμένου τύπου ΤΠΙ με τη μεταβολή της ποιότητας και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής ενός τροφίμου, το

οποίο έχει υποστεί οποιαδήποτε σταθερή ή μεταβλητή θερμοκρασιακή έκθεση. Επίσης, απαιτείται εμπειριστωμένη μελέτη του ΤΠΙ για την ανάπτυξη κινητικών μοντέλων που να επιτρέπουν την ενσωμάτωση του ΤΠΙ στην προηγούμενη προσέγγιση. Τέλος, σύμφωνα με αυτά τα κινητικά μοντέλα, πρέπει να εξετάζεται η αξιοπιστία των ΤΠΙ για την πρόβλεψη της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων κάτω από μεταβλητές θερμοκρασιακές συνθήκες. Από τις κινητικές εξισώσεις, οι οποίες περιγράφουν την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων και την απόκριση ενός ΤΠΙ εκτεθειμένου στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες, μπορεί να αναπτυχθεί ένα τέτοιο σχεδιάγραμμα που να επιτρέπει την εκτίμηση της τιμής του παράγοντα ποιότητας A , οποιαδήποτε χρονική στιγμή, από τη μετρούμενη αλλαγή X του δείκτη στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Το σχεδιάγραμμα θα βασίζεται στη γνώση των κινητικών χαρακτηριστικών της ποιοτικής υποβάθμισης: $f(A)$, k_A , E_A , του τροφίμου και των κινητικών χαρακτηριστικών απόκρισης του ΤΠΙ: $F(X)$, K_I , E_{AI} . Η εισαγόμενη πληροφορία θα είναι η μετρούμενη απόκριση X του ΤΠΙ στο χρόνο t .

Ο υπολογισμός της τιμής του παράγοντα ποιότητας A_t από το X_t επιτυγχάνεται μέσα από τα ακόλουθα βήματα:

- 1) Υπολογισμός της τιμής της συνάρτησης απόκρισης $F(X)t$ του ΤΠΙ από τη μετρούμενη τιμή X_t .

$$F(X)_t = F(X_t) \quad (2.5)$$

- 2) Εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας, η οποία περιγράφει την κατανομή της θερμοκρασίας. Η εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας επιτυγχάνεται με την παρακάτω σχέση που προκύπτει από την σχέση του Arrhenius.

$$T_{eff} = \frac{-E_{AI}}{R \ln\left(\frac{F(X)_t}{K_I t}\right)} \quad (2.6)$$

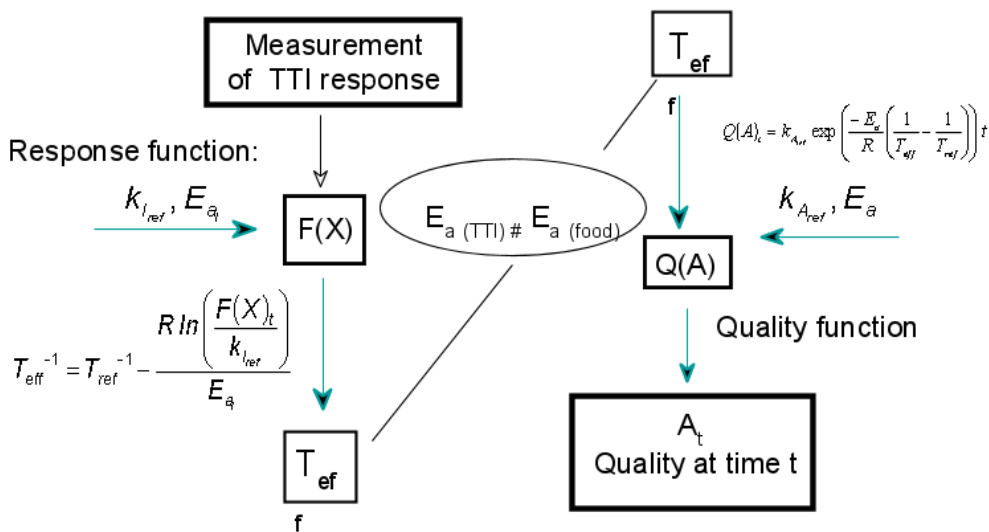
- 3) Από την T_{eff} , που αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασιακή έκθεση του τροφίμου έχοντας ταυτόχρονα και τη γνώση των παραμέτρων της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου, υπολογίζεται η συνάρτηση ποιότητάς του, $f(A)_t$, χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση.

$$f(A)_t = K_A e^{\left(\frac{-E_A}{R T_{eff}}\right) t} \quad (2.7)$$

- 4) Με βάση την τιμή της συνάρτησης ποιότητας $f(A)_t$ υπολογίζεται η τιμή του δείκτη ποιότητας A_t ο οποίος δείχνει το βαθμό της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου. Ο δείκτης ποιότητας επιτρέπει ακόμα την εκτίμηση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής σε οποιαδήποτε μέση θερμοκρασία.

$$A_t = f^{-1}(f(A)t) \quad (2.8)$$

Το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφηκε παραπάνω παρουσιάζεται στο σχήμα 2.4 με τη μορφή λογικού διαγράμματος (Ταουκίς & Labuza, 1989).



Σχήμα 2.4 Απεικόνιση της συστηματικής προσέγγισης για την εφαρμογή των TTI στον έλεγχο ποιότητας των τροφίμων

Εάν είναι γνωστή η συνάρτηση ποιότητας A_t , είναι δυνατό να υπολογιστεί η εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου. Στο μοντέλο που περιγράφηκε, έχει γίνει η υπόθεση ότι $T_{eff}(\text{τροφίμου}) = T_{eff}(\text{TTI})$, για δεδομένη κατανομή της θερμοκρασίας. Αυτή η παραδοχή ισχύει όταν $E_a(\text{τροφίμου}) = E_a(\text{TTI})$. Δηλαδή, οι δραστικές θερμοκρασίες του τροφίμου και του TTI είναι ίσες όταν και οι ενέργειες ενεργοποίησης είναι ίσες. Φυσικά, όταν η θερμοκρασία είναι σταθερή προφανώς θα ισχύει ότι $T_{eff}(\text{τροφίμου}) = T_{eff}(\text{TTI})$. Έχει διαπιστωθεί ότι σε περίπτωση που η διαφορά των $E_a(\text{τροφίμου})$ και $E_a(\text{TTI})$ είναι μικρότερη από 40 kJ/mol, τότε τα δύο T_{eff} θα διαφέρουν κατά 0,4-1,8°C, και το σφάλμα στην εκτίμηση της ποιότητας θα είναι λιγότερο από 15%, το οποίο σε αρκετές περιπτώσεις είναι αποδεκτό (Ταουκίς & Labuza, 1989a).

Συνήθως, είναι δύσκολο να βρεθεί ένα ΤΤΙ που να έχει ακριβώς ίδια ενέργεια ενεργοποίησης με αυτή του τροφίμου. Γενικά, όσο μικρότερη είναι η διαφορά των E_A τόσο μεγαλύτερη είναι η ακρίβεια ένδειξης του ΤΤΙ για την πραγματική διάρκεια ζωής. Η προηγούμενη κινητική προσέγγιση συσχετισμού της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιότητα των εξεταζόμενων τροφίμων, έχει εφαρμογή κατά κύριο λόγο στα ευαλλοιώτα ψυγμένα τρόφιμα (Taoukis et al., 1998; Taoukis & Labuza, 1999; Taoukis et al., 1999a; Taoukis et al., 1999b). Η ίδια προσέγγιση είναι δυνατό να εφαρμοστεί και στα κατεψυγμένα τρόφιμα υπό ορισμένες προϋποθέσεις που αφορούν την καταλληλότητα της εξίσωσης Arrhenius σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών και την παραδοχή ότι τα τρόφιμα δεν υπόκεινται σε απόψυξη κατά την αποθήκευσή τους (Giannakourou & Taoukis, 2003a, 2003b).

2.8 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας T_{eff}

Η πραγματική T_{eff} (τροφίμου) και η εκτιμώμενη T_{eff} (ΤΤΙ) είναι δυνατόν να διαφέρουν για διαφορετικές θερμοκρασιακές κατανομές. Υπάρχουν τρεις βασικοί λόγοι σφάλματος για την εκτιμώμενη T_{eff} (ΤΤΙ) :

- **Η διαφορά των τιμών E_A μεταξύ του τροφίμου και του ΤΤΙ**

Πρόκειται για συστηματικό και όχι στατιστικό σφάλμα. Το σφάλμα στον υπολογισμό της T_{eff} είναι μικρότερο, όσο η E_A του ΤΤΙ προσεγγίζει αυτή του τροφίμου.

- **Η μεταβλητότητα των μετρήσεων της απόκρισης μεταξύ ίδιων δεικτών στις ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας**

Για την αντιμετώπιση αυτής της πηγής σφάλματος είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της κατασκευής των ΤΤΙ έτσι ώστε η απόκριση κάθε ΤΤΙ να μπορεί να είναι αναπαραγωγίσιμη. Σε κινητικές μελέτες των ΤΤΙ για να ελαχιστοποιηθεί το σφάλμα πρέπει να χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων, του ίδιου ΤΤΙ, σε κάθε πειραματική διαδικασία.

- **Η στατιστική αβεβαιότητα για τις παραμέτρους της εξίσωσης Arrhenius**

Στην κινητική μελέτη των ΤΤΙ χρησιμοποιείται η σχέση Arrhenius έχοντας κάνει την παραδοχή ότι η ενζυμική αντίδραση περιγράφεται από αυτήν. Με γραμμική προσαρμογή υπολογίζονται οι παράμετροι E_a και k_0 ,

συνοδευόμενοι με κάποιο σφάλμα. Η πιθανότητα σφάλματος μειώνεται με τη χρήση τουλάχιστον 5 θερμοκρασιών.

2.9 Εφαρμογή ΤΤΙ σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων

Η συσχέτιση της ποιότητας των τροφίμων με την απόκριση των ΤΤΙ οδήγησε σ' ένα μεγάλο αριθμό πειραματικών μελετών έχοντας ως στόχο τη δημιουργία συσχετισμών συγκεκριμένων προϊόντων με συγκεκριμένα ΤΤΙ. Τέτοιες μελέτες συσχετισμού παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (2.5).

Πίνακας 2.5 Μελέτες συσχετισμού τροφίμων ΤΤΙ

Μελέτες	Τρόφιμο
Rodriquez and Zaritzki, 1983	Κατεψυγμένο βοδινό κρέας
Mistry and Kosikowski, 1983; Grisius et al., 1987; Chen and Zall, 1987a	Παστεριωμένο πλήρες γάλα
Dolan et al., 1985	Παγωτό
Singh and Wells, 1985	Κατεψυγμένο χάμπουργκερ
Tinker et al., 1985	Κατεψυγμένα φιλέτα βακαλάου
Cambell, 1986	Ψυγμένες σαλάτες
Zall et al., 1986	Γάλα UHT
Chen and Zall, 1987b	Κατεψυγμένος χυμός από πορτοκάλι
Chen and Zall, 1987a	Παστεριωμένη κρέμα
Chen and Zall, 1987a; Shellhammer and Singh, 1991	Cottage cheese
Wells and Singh, 1988	Κατεψυγμένες φράουλες
Wells and Singh, 1988	Κατεψυγμένο μαρούλι και ντομάτες
Yoon et al., 1994	Κατεψυγμένο χοιρινό κρέας
Ronnow et al., 1998 (FDA)	Παστό / καπνιστό ψάρι (τοξίνη clostridium botulinum)
Ronnow et al., 1999	Κατεψυγμένος φρέσκος σολομός
Taoukis et al., 1999a, 1999b	Ψυγμένα ψάρια
Wendle et al., 2003	Θερμικά επεξεργασμένο γάλα

Giannakourou and Taoukis, 2003	Ρώσικη σαλάτα και μελιτζανοσαλάτα
Giannakourou and Taoukis, 2003	Κατεψυγμένα λαχανικά
M. Smolander et al., 2003	Συσκευασμένο κοτόπουλο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Giannakourou et al., 2004	Ψυγμένα ψάρια
Alfaro et al., 2005	Φρέσκα ψάρια (καλκάνι, psetta maxima)
Els Bobelyn et al., 2006	Μανιτάρια
Tsironi et al., 2008	Κατεψυγμένος τόνος συσκευασμένος υπό κενό
Vaikousi et al., 2009	Κιμάς συσκευασμένος σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Ellouze et al., 2010	Συσκευασμένος βόειος κιμάς σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συσκευασμένο ψημένο φιλέτο κοτόπουλο
Tsironi et al., 2011	Φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Jin Young Han et al., 2012	Φιλέτο μοσχαριού
Kim et al., 2013	Χοιρινός κιμάς Κορέας
Brizio et al., 2014	Ψυγμένα φιλέτα κοτόπουλου
Giannoglou et al., 2014	Κατεψυγμένα θαλασσινά (Γλάυκοκαρχαρίας και Θράψαλο Ν.Ζηλανδίας)

Το εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π. έχει πραγματοποιήσει στο παρελθόν διπλωματικές εργασίες με αντικείμενο την εφαρμογή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών στην διαχείριση της αλυσίδας ψυγμένων και κατεψυγμένων προϊόντων, εμβαθύνοντας κάθε φορά και σε μια διαφορετική πτυχή αυτού του πεδίου. Ασχολείται με την συστηματική μελέτη νέων ολοκληρωτών και την κινητική απόκρισης τους, σε συσχέτιση με συγκεκριμένα προς

μελέτη τρόφιμα. Στον πίνακα (2.6) παρουσιάζονται διπλωματικές εργασίες με τον παραπάνω σκοπό.

Πίνακας 2.6 Διπλωματικές εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο του Ε.Μ.Π.

Διπλωματική Εργασία	Συγγραφέας
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας φιλέτων ψαριού συσκευασμένων σε MAP (Αθήνα 2008)	Αναστάσιος Σταματίου
Μελέτη νέων χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας: Εφαρμογή σε προϊόντα κρέατος (Αθήνα 2009)	Ηλιάννα Μεταξά
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας φιλέτων τιλάπιας (Αθήνα 2010)	Ελένη Πλατάκου
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της αλυσίδας κατεψυγμένων θαλασσινών (Αθήνα 2010)	Κλεοπάτρα Τσατσαράγκου
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της αλυσίδας ψυγμένων χελιών και κατεψυγμένου γλαυκοκαρχαρία (Αθήνα 2011)	Μαργαρίτα Λουκιανού
Έξυπνη συσκευασία: Μελέτη και εφαρμογή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) στη ψυκτική αλυσίδα κατεψυγμένων θαλασσινών (Αθήνα 2013)	Αφροδίτη Τούλη
Κινητική μελέτη έξυπνης συσκευασίας με εφαρμογή ενζυμικών και φωτοχημικών χρονο-θερμοκρασιακών ολοκληρωτών ΤΤΙ για τον έλεγχο της	Μαρία Πολεμαρχάκη

**ψυκτικής αλυσίδας βόειου κιμά (Αθήνα
2015)**

2.10 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί στη χρήση και εφαρμογή των ΤΤΙ

2.10.1 Πλεονεκτήματα των ΤΤΙ

Οι ΤΤΙ είναι μικροί, φθηνοί (εκτίμηση κόστους: 0.02-0.20\$/δείκτη (Taoukis & Labuza, 2003)), ανθεκτικοί στους κραδασμούς και υψηλής ακρίβειας δείκτες. Η απόκρισή τους είναι συνεχής, μη αναστρέψιμη και οπτικά εύκολα κατανοητή.

2.10.1.1 Γενικά Πλεονεκτήματα

- Συμμόρφωση με τα πρότυπα και τους κανονισμούς

Τα καινούρια πρότυπα στη βιομηχανία τροφίμων, όπως τα ευρωπαϊκά πρότυπα (European Standards) 852/2002, 853/2004 και 172/2002, τα οποία απαρτίζουν την υγιεινή συσκευασία (Package Hygiene) (Maier, 2005), αλλά και τα πρότυπα για την ενεργή και έξυπνη συσκευασία αποτελούν ένα σημαντικό μέλημα των εταιρειών. Η συμφωνία των εταιρειών με τα πρότυπα εξασφαλίζει τόσο την ασφάλεια των καταναλωτών όσο και τη συμμόρφωσή τους με τις αρχές. Το 1999 προτάθηκε από τους Labuza & Szybist μια λεπτομερής μελέτη πάνω σε πρακτικές και ρυθμίσεις, που αφορούσαν τον έλεγχο της “φρεσκότητας” των τροφίμων.

Οι καινούριες ρυθμίσεις αυξάνουν όλο και περισσότερο την ευθύνη των εταιρειών απέναντι στον έλεγχο της ψυκτικής αλυσίδας, ενώ παράλληλα τους ενθαρρύνουν να αναπτύσσουν μέτρα, τα οποία μειώνουν πιθανούς κινδύνους. Η χρήση των ΤΤΙ στις εταιρείες τροφίμων καθίσταται απαραίτητη διότι οι δείκτες αποτελούν απόδειξη της διαφύλαξης της φρεσκότητας του τροφίμου κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της ψυκτικής αλυσίδας.

- Βελτίωση της φήμης και της ανταγωνιστικότητας των εταιρειών (brand value)

Η έλλειψη του ελέγχου της διακύμανσης της θερμοκρασίας των τροφίμων, τα οποία πωλούνται στους καταναλωτές, μπορεί να οδηγήσει σε μη ασφαλή προϊόντα και κατ' επέκταση να αποτελέσει δυσφήμιση για την εταιρεία. Αντίθετα, η καταγραφή του χρόνου και της θερμοκρασίας σε κάθε στάδιο της ψυκτικής αλυσίδας μπορεί να συνεισφέρει τόσο στην δημόσια εικόνα της εταιρείας όσο και να αυξήσει τις πωλήσεις της. Ο έλεγχος της φρεσκότητας δίνει στους υπεύθυνους

παραγωγής τη δυνατότητα να βεβαιώσουν τους καταναλωτές ότι έχουν διατηρηθεί όλα τα χαρακτηριστικά του προϊόντος, όπως η ποιότητα, η γεύση, το χρώμα, το άρωμα κ.α.

Πολλές εταιρείες επιβεβαιώνουν ότι η χρήση των ΤΠΙ αύξησε τόσο την εικόνα της ποιότητας των προϊόντων τους όσο και τις πωλήσεις τους (Labuza, 1998).

2.10.1.2 Πλεονεκτήματα σχετικά με τη βελτίωση της διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας.

Τα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τη βελτίωση της διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας διακρίνονται στις ακόλουθες δύο κατηγορίες:

1. Πλεονεκτήματα που σχετίζονται με την ένδειξη φρεσκότητας του προϊόντος

Τα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τη δυνατότητα ένας χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης να παρέχει μία απλή και ακριβή πληροφορία για τη φρεσκότητα του προϊόντος είναι τα εξής:

- Απλοποίηση των διαδικασιών ελέγχου φρεσκότητας του προϊόντος.
- Μείωση των δαπανών που προκύπτουν κατά τις διαδικασίες επιθεώρησης της ποιότητας των προϊόντων.
- Μείωση των δαπανών που σχετίζονται με διαδικασίες επιστροφής των εμπορευμάτων.
- Αύξηση της ευσυνειδησίας των χειριστών.
- Λιγότερες αντιδικίες μεταξύ των υπευθύνων της ψυκτικής αλυσίδας.
- Πρόληψη της απάτης που σχετίζεται με χρήση ψεύτικων ετικετών ημερομηνιών λήξης.
- Λήψης της σωστής απόφασης σε περίπτωση βλάβης στη λειτουργία του εξοπλισμού.
- Μείωση του κόστους που σχετίζεται με προϊόντα τα οποία πρέπει να απορριφθούν.
- Μείωση των απωλειών που οφείλονται σε φθορά, καταστροφή, αλλοίωση, κλοπή (shrinkage).

2. Πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τον εναπομείναντα χρόνο ζωής του προϊόντος

- Σωστή εκτίμηση του εναπομείναντα χρόνου ζωής των τροφίμων.

- Καλύτερη διαχείριση των αποθεμάτων.
- Μεγαλύτερη ευελιξία στην τιμή των προϊόντων.
- Βελτίωση της εξυπηρέτησης των τελικών καταναλωτών.

2.10.2 Περιορισμοί στη χρήση και εφαρμογή των ΤΤΙ

Οι δείκτες ΤΤΙ χρησιμοποιούνται ακόμη σε πολύ περιορισμένη κλίμακα, παρά τη δυνατότητά τους να διασφαλίζουν την ποιότητα των τροφίμων από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση, προστατεύοντας τόσο τον καταναλωτή όσο και τους παραγωγούς και μειώνοντας τις απώλειες τροφίμων. Οι κυριότερες αιτίες που οδηγούν σε αυτή την επιφυλακτικότητα απέναντι στη χρήση των δεικτών είναι οι εξής:

Αξιοπιστία: Στηρίζεται στους υπερβολικούς ισχυρισμούς των κατασκευαστών κάποιων πρώτων μοντέλων και στην έλλειψη επαρκών δεδομένων από τις μελέτες απώλειας ποιότητας των τροφίμων. Αρκετές προσπάθειες χρήσης των δεικτών για τον έλεγχο της ποιότητας δεν ήταν ορθά σχεδιασμένες, ως αποτέλεσμα της μη καλής κατανομής των εννοιών, στη διαφοροποίηση των αξιόπιστων και μη συστημάτων ΤΤΙ. Συζητήσεις για να γίνει η χρήση των ΤΤΙ υποχρεωτική, πριν κατανοηθούν οι βασικές έννοιες και γίνει αποδεκτή η αξιοπιστία τους, οδήγησε σε αντίσταση την βιομηχανία και ίσως έχει βλάψει τη χρήση των ΤΤΙ μέχρι σήμερα.

Κόστος: Το κόστος των περισσότερων δεικτών παραμένει αρκετά υψηλό παρ' όλο που αρκετοί δείκτες έχουν εισέλθει στη μαζική παραγωγή. Το υψηλό κόστος αποδίδεται κυρίως στις χαμηλές απαιτήσεις. Ένας καλός και προφανής τρόπος για να παραμείνουν τα κόστη ελέγχου σε αποδεκτά επίπεδα είναι να τυποποιηθεί η μονάδα που ελέγχεται σε ένα κατάλληλο μέγεθος. Ωστόσο, αν όλα τα άλλα ερωτηματικά είναι απαντημένα η ανάλυση του οικονομικού οφέλους, παρά τις υψηλές τιμές των ΤΤΙ, θα ήταν υπέρ των δεικτών.

Εφαρμοσιμότητα: Μέχρι πρότινος, η χρησιμότητα της απόκρισης των ΤΤΙ ως μέτρο για την ποιότητα του τροφίμου δεν ήταν αρκετά αποτελεσματική. Παρ' όλα αυτά, μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν πως τα μαθηματικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν την απόκριση μια ετικέτας (Wells, 1987; Taoukis & Labuza, 1989; Taoukis, 1989; Wells & Singh, 1988).

Άγνοια των καταναλωτών: Η άγνοια των καταναλωτών σε σχέση με την πραγματική αξία της επισήμανσης σχετικά με την ημερομηνία λήξης και τη βελτίωση της παρεχόμενης πληροφόρησης με την εφαρμογή των δεικτών, αποτελεί ένα πρόσθετο πρόβλημα στη χρήση των ΤΤΙ (Cook, 1990; Sherlock & Labuza, 1991). Σύμφωνα με έρευνα (Anonymous, 1989), η παρουσία δείκτη μπορεί να επηρεάσει θετικά τον καταναλωτή: περίπου 44% των καταναλωτών όταν ενημερώθηκαν σχετικά δήλωσαν ότι θα ήταν πρόθυμοι να αγοράσουν ένα περισσότερο ακριβό προϊόν με ετικέτα φρεσκάδας (ΤΤΙ) (Taoukis & Labuza, 2003).

Οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες παρουσιάζουν τους εξής περιορισμούς:

- ΤΤΙ, που λειτουργούν με χημική ή ενζυμική αντίδραση αποδείχθηκε ότι εμφανίζουν πολλές φορές ευαισθησία στη διάχυση αερίου διαμέσου πολυμερούς φιλμ. Το φιλμ χρησιμοποιείται για να περιλάβει τα αντιδραστήρια.
- Το ΤΤΙ Lifelines έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζεται από το φως αποθήκευσης. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ειδικό φίλτρο, που θα λειτουργούσε ως παρεμποδιστής φωτός.
- Επειδή τα ΤΤΙ συχνά τοποθετούνται στο εξωτερικό τμήμα συσκευασιών, είναι εύλογο να προκύψει το ερώτημα αν η ετικέτα ελέγχει τη θερμοκρασία του αέρα γύρω από τη συσκευασία και όχι τη θερμοκρασία του προϊόντος. Εναλλακτικά, ο δείκτης θα μπορούσε να τοποθετηθεί στο εσωτερικό της συσκευασίας με ένα παράθυρο μέσα από το οποίο θα φαίνεται η κλίμακα. Κάτι τέτοιο θα παρέχει ακριβέστερες θερμοκρασιακές τιμές καθώς θα επέτρεπε στον αισθητήρα να αποκριθεί καλύτερα στο ίδιο θερμικό περιεχόμενο με αυτό του τροφίμου και ν' αναγνωστεί με εύκολο τρόπο.

2.11 Η στάση των καταναλωτών και της βιομηχανίας απέναντι στα ΤΤΙ

Διάφορες μελέτες που έχουν γίνει κατά καιρούς (Anonymous, 1991; Sherlock & Labuza, 1992) δείχνουν ότι οι καταναλωτές είναι σύμφωνοι με την χρήση των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών. Ειδικότερα, σύμφωνα με μια μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο (Anonymous, 1991) το 95% των ερωτηθέντων θεώρησε τη χρήση των ΤΤΙ ως μια καλή ιδέα διότι τα ΤΤΙ δείχνουν εάν το τρόφιμο είναι ασφαλές (28%), εάν έχει διατηρηθεί στη σωστή θερμοκρασία (21%) και εάν το τρόφιμο είναι φρέσκο

(16%). Το 88% των ερωτηθέντων υποστήριξε πως πάνω στη συσκευασία των τροφίμων είναι απαραίτητο να αναγράφεται η ημερομηνία λήξης αλλά και να υπάρχει ΤΠΙ, ενώ το 11% θεώρησε ότι θα ήταν αρκετό το ένα από τα δύο μέτρα. Εκτός αυτού στην ίδια έρευνα η χρήση των ΤΠΙ θεωρήθηκε ως εργαλείο έτσι ώστε να μάθουν οι καταναλωτές ποιος είναι ο σωστός τρόπος μεταχείρισης των τροφίμων στο σπίτι.

Σε μια άλλη μελέτη στην Αμερική για κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, το 90% των ερωτηθέντων θεώρησε επιθυμητή την προσθήκη των ΤΠΙ στις συσκευασίες των τροφίμων και το 97% πίστευε πως με αυτό το μέτρο, αυξάνεται η εμπιστοσύνη για τη φρεσκότητα των προϊόντων. Μάλιστα η ύπαρξη ΤΠΙ πάνω στη συσκευασία αύξησε την επιθυμία των καταναλωτών να αγοράσουν το συγκεκριμένο προϊόν (Sherlock & Labuza, 1992).

Σε μια μικρή έρευνα που διεξήχθη στη Φινλανδία διαπιστώθηκε ότι οι καταναλωτές ήταν σύμφωνοι με τη χρήση των ΤΠΙ διότι δεν χρειαζόταν να στηρίζονται μόνο στις δικές τους αισθήσεις για τη διαπίστωση της φρεσκότητας των προϊόντων. Ωστόσο, κάποιιοι ήταν επιφυλακτικοί γιατί δεν ήταν σίγουροι για την ακρίβεια της πληροφορίας που παρέχει ο χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης.

Στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Προγράμματος QLK12002-02545 (2003-2006) με τίτλο “Development and Application of a Safety Monitoring and Assurance System for Chilled Meat Products” (Ταούκης, 2005; Wendin et al., 2005), πρόσφατες έρευνες (2004 και 2005) πραγματοποιήθηκαν στην Ελλάδα, την Ιρλανδία, την Ολλανδία και τη Σουηδία με σκοπό να διερευνηθεί η στάση των καταναλωτών απέναντι στην επισήμανση των τροφίμων με χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες (ΤΠΙ) και την ερμηνεία του σήματός τους. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στις δύο έρευνες ήταν ενζυμικοί, με τη μόνη διαφορά ότι το 2004 οι δείκτες ήταν δίχρωμοι, ενώ το 2005 τρίχρωμοι. Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από τις δύο μελέτες, ήταν τα εξής:

- Η παρουσία των ΤΠΙ έδωσε μεγαλύτερη σιγουριά στους περισσότερους καταναλωτές (80% των ερωτηθέντων) όσον αφορά την ασφάλεια του τροφίμου.
- Η χρήση των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών δεν ιδιαίτερα γνωστή στην Ελλάδα.

- Οι καταναλωτές δεν αντιμετώπισαν καμία δυσκολία στην κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των ΤΠΙ.
- Σύμφωνα με τους καταναλωτές, η χρήση των ΤΠΙ προσφέρει μια επιπλέον ένδειξη της φρεσκότητας του τροφίμου και λειτουργούσε ενισχυτικά με την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.
- Οι καταναλωτές προτιμούν να αγοράζουν ένα προϊόν, το οποίο γνωρίζουν πόσο φρέσκο είναι.
- Λίγοι καταναλωτές (15%) θεώρησαν ότι η πληροφορία του ΤΠΙ τους μπερδεύει όταν χρησιμοποιείται παράλληλα με την ετικέτα της ημερομηνίας λήξεως του προϊόντος (περισσότεροι στην Ελλάδα, λιγότεροι στη Σουηδία).
- Η προθυμία να πληρώσουν οι καταναλωτές ένα επιπλέον ποσό για τη χρήση του ΤΠΙ, διέφερε από χώρα σε χώρα. Στην Ελλάδα η προθυμία ήταν μεγάλη, ενώ στις άλλες χώρες όχι. Ειδικά στην Ολλανδία η προθυμία ήταν ελάχιστη.
- Η πλειοψηφία των καταναλωτών δεν προτιμά την αγορά προϊόντων στα οποία επισυνάπτεται μόνο η ετικέτα της ημερομηνίας λήξης.

Επίσης, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος IQ-Freshlabel πραγματοποιήθηκε έρευνα με θεματική ενότητα την άποψη των καταναλωτών, αλλά και του χώρου της ελληνικής βιομηχανίας όσον αφορά τους χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες.

- Για τη βιομηχανία, τα ΤΠΙ θεωρήθηκαν χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της ψυκτικής αλυσίδας, αλλά και ένα μέσο διαφήμισης (marketing). Ωστόσο σημειώθηκαν και ορισμένοι προβληματισμοί. Ανησυχία της βιομηχανίας αποτέλεσε η πιθανότητα οι δείκτες ΤΠΙ να προκαλέσουν σύγχυση στους καταναλωτές. Επίσης, διατηρήθηκαν επιφυλάξεις για την ορθότητα της λειτουργίας τους και για το ρόλο τους σε σχέση με την ημερομηνία λήξης, αλλά και για το πρόσθετο κόστος που θα επιφέρουν στο προϊόν και αν ο καταναλωτής θα είναι διατεθειμένος να το επωμιστεί.
- Όσον αφορά την άποψη των καταναλωτών, αντιμετώπισαν τα ΤΠΙ θετικά, λόγω κυρίως της δυσπιστίας με την οποία ένα μέρος του πληθυσμού

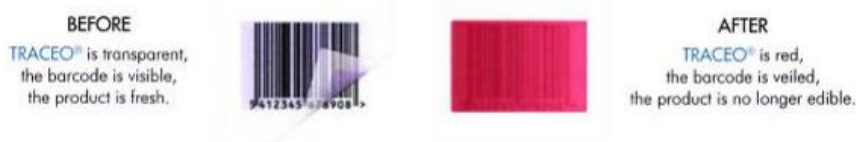
αντιμετωπίζει την βιομηχανία. Τα ΤΤΙ προσφέρουν στους καταναλωτές έναν έμμεσο έλεγχο των συνθηκών μεταφοράς και έκθεσης των προϊόντων ή όπως εύστοχα διατυπώθηκε δίνουν την αίσθηση του “ταξιδιού” του τροφίμου και κατά συνέπεια θεωρούνται χρήσιμα. Ιδιαίτερα για τα ευπαθή προϊόντα, οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες θεωρήθηκαν απαραίτητοι. Επίσης, οι καταναλωτές θεώρησαν ότι τα ΤΤΙ θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμα και για τον έλεγχο της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων μετά την προμηθευσή τους, δηλαδή κατά τη συντήρηση στα οικιακά ψυγεία.

- Όσον αναφορά τους τεχνικούς στόχους, η έρευνα του προγράμματος IQ-Freshlabel στόχευε στην αύξηση της εμπιστοσύνης των καταναλωτών στην προμήθεια τροφίμων με βελτίωση της ευαισθητοποίησης σε επιστημονική και τεχνολογική βάση για τη ψυκτική αλυσίδα. Πραγματοποιήθηκαν εκπαιδευτικές δραστηριότητες που προορίζονταν για την εκπαίδευση των ενδιαφερομένων σχετικά με τις ιδιότητες των νέων ΤΤΙ και την αξιοποίησή τους κατά τη διάρκεια μεταφοράς, αποθήκευσης και πώλησης των προϊόντων. Οι δραστηριότητες κατάρτισης προς τις ενώσεις καταναλωτών επικεντρώθηκαν σε πληροφορίες σχετικά με τη χρήση και τα οφέλη της εφαρμογής ΤΤΙ.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών και ερευνών αποτέλεσαν άξονα για το σχεδιασμό καινοτόμων ευφυών ετικετών (Pennamen et al., 2014).

2.12 Εφαρμογές των ΤΤΙ

Η θερμοκρασία θεωρείται κύριος παράγοντας υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων, επομένως είναι σαφές ότι πρέπει όχι μόνο να ελέγχεται, αλλά και να παρακολουθείται συστηματικά το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό των τροφίμων. Η έξυπνη συσκευασία είναι μια τεχνολογία εύκολης χρήσης που εκμεταλλεύεται τη λειτουργία επικοινωνίας πακέτου-προϊόντος. Διευκολύνεται η λήψη αποφάσεων για την επίτευξη των οφελών της αυξημένης ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων. Τελευταία, οι έξυπνες συσκευές συμπεριλαμβάνουν ετικέτες barcode, ετικέτες αναγνώρισης ραδιοσυχνότητας, δείκτες χρόνο-θερμοκρασίας, δείκτες φυσικού αερίου, καθώς και βιοαισθητήρες.



Εικόνα 2.4 Το TRACEO είναι ένα άχρωμο ΤΤΙ, που τοποθετείται πάνω στο barcode και αλλάζει σε κόκκινο χρώμα μόλις το προϊόν τεθεί ακατάλληλο προς κατανάλωση.

Καθίσταται αναγκαία, λοιπόν, η χρήση οικονομικών και εύκολων δεικτών, όπως χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών ΤΤΙ. Μερικά από τα προϊόντα στα οποία μπορούν να εραφμοστούν είναι φρέσκο κρέας, φρέσκα φρούτα και λαχανικά, κατεψυγμένα τρόφιμα (κρέας, λαχανικά κ.ά.), γαλακτοκομικά προϊόντα, γλυκά (σοκολάτες, καραμέλες), μπίρα και άλλα οινόπνευματώδη καθώς και σε καλλυντικά, φάρμακα, προϊόντα φυτοκομίας και άλλα.



Εικόνα 2.5 Εφαρμογή ΤΤΙ σε φρέσκα προϊόντα

Οι αξιολογήσεις των ΤΤΙ για εφαρμογή σε μία ποικιλία προϊόντων έχουν γίνει από διάφορους ερευνητές (Fields & Prusik, 1986, Wells & Singh, 1988). Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δεν χρησιμοποιούν την κινητική ανάλυση αλλά στηρίχθηκαν περισσότερο σε συσχέτιση. Μια τέτοια μη-κινητική προσέγγιση είναι πολύ περιορισμένη στην εφαρμογή της, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα δεν μπορούν να επεκταθούν και σε άλλες συνθήκες θερμοκρασίας. Παραδείγματα όπου ΤΤΙ έχουν εφαρμοστεί σε τρόφιμα στο παρελθόν παρουσιάζονται παρακάτω:

- Εταιρεία επεξεργασίας κατεψυγμένων προϊόντων έκανε χρήση συνεχούς απόκρισης ΤΤΙ για τον έλεγχο της διανομής προϊόντων στην Καλιφόρνια.

- Μεγάλη αλυσίδα υπεραγορών χρησιμοποίησε ΤΤΙ για την παρακολούθηση ευαλλοίωτων προϊόντων και για τη διαχείριση των αποθεμάτων της (Mohei, 1988).
- Εταιρεία θαλασσινών της Μασαχουσέτης χρησιμοποίησε ενζυμικά ΤΤΙ σε χαρτοκιβώτια (Densford, 1983).
- Μεγάλη εταιρεία τροφίμων δοκίμασε διεξοδικά τη χρήση των ΤΤΙ σε φρεσκοκομμένες σαλάτες αλλά και σάλτσες.
- Μεγάλη εταιρία αναψυκτικών χρησιμοποίησε δοκιμαστικά ΤΤΙ σε προϊόντα διαίτης.
- Άλλες εταιρείες (Tyson Foods, Yorlait ΗΠΑ) έχουν χρησιμοποιήσει ΤΤΙ κυρίως για έλεγχο θερμοκρασιακού προφίλ κατά τη διάρκεια της διανομής ή για προβλήματα ελέγχου θερμοκρασιακών μεταβολών (Fields, 1991).
- Η FreshCheck εφάρμοσε ΤΤΙ σε φρέσκα παρασκευασμένα γεύματα, με βάση το κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα, σαλάτες, κρέμες αλλά και φρέσκα τρόφιμα από πολλές διαφορετικές εταιρείες (Fields, 1991).
- Η μονάδα διανομής φαγητού της εταιρείας Carrefour χρησιμοποιεί χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες για να αποδείξει στους καταναλωτές της την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων που διανέμει (Εικόνα 2.6)
- Η μεγαλύτερη γερμανική αλυσίδα λιανικής πώλησης, EDEKA, πειραματίζεται στη χρήση των OnVu ΤΤΙ στα προϊόντα κρέατος που διαθέτει.



Εικόνα 2.6 Δείκτης Fresh-Check σε συσκευασία φρούτων και λαχανικών της αλυσίδας καταστημάτων Carrefour και σε συσκευασία σαλαμιού.

- Αλυσίδα υπεραγορών στην Ισπανία χρησιμοποιεί ΤΤΙ (Continent).

- Η αλυσίδα υπεραγορών Monoprix στη Γαλλία χρησιμοποιεί ΤΠΙ από το 1988 για την παρακολούθηση της ποιότητας γαλακτοκομικών προϊόντων και συσκευασμένου κρέατος.
- Η αεροπορική εταιρεία British Airways έχει δημιουργήσει ένα Smart Label σύστημα ελέγχου για τις κατεψυγμένες έτοιμες τροφές που καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της πτήσης. Χρησιμοποιούνται από την εταιρεία ενζυμικού τύπου bicolor ΤΠΙ της εταιρείας Vitsab. Τα ΤΠΙ επισυνάπτονται στα ειδικά έντυπα, που τοποθετούνται στο θάλαμο γευμάτων, προκειμένου να παρακολουθείται με ακρίβεια το χρονοθερμοκρασιακό προφίλ, στο οποίο εκτίθενται τα γεύματα. Τα εμπορικά οφέλη των ετικετών ΤΠΙ σε προϊόντα κατανάλωσης κατά τη διάρκεια της πτήσης είναι κυρίως η προστασία των επιβατών και του πληρώματος αλλά και η προστασία της εταιρείας (BA) από αστικές και ποινικές ενέργειες σε περίπτωση μιας υπόθεσης τροφικής δηλητηρίασης ενάντιάς της.

Η συνεργασία της British Airways με τη Vitsab βραβεύτηκε στο Συμβούλιο της IFSA (International Inflight Food Service Association) στις 11 Μαρτίου 2005 στην Κοπεγχάγη. Στην Εικόνα 2.7 φαίνεται το Smart Label της British Airways και η εφαρμογή του κατά τη διάρκεια των πτήσεων.



Εικόνα 2.7 Το σύστημα ελέγχου Smart Label της British Airways

- Το 2008 η ελβετική εταιρεία Ernst Kneuss Geflügel A.G., η οποία δραστηριοποιείται στην παραγωγή κοτόπουλων, άρχισε να κάνει χρήση των φωτοχημικών δεικτών OnVu των εταιρειών Ciba και Freshpoint.
- Η εταιρεία Temptime ασχολείται τα τελευταία 15 χρόνια με την παραγωγή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών που βρίσκουν εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος προϊόντων, από τρόφιμα έως εμβόλια, σύριγγες και άλλα ευαίσθητα

ιατρικά είδη. Προϊόντα της είναι οι δείκτες: Heatmarker®, TH-F®, DEGmarker™, FREEZEmarker®, Transtracker®, Fresh-Check®.

2.13 Εφαρμογές των ΤΠΙ σε ευαλλοίωτα προϊόντα

Η United States Food and Drug Administration (USFDA) υποστηρίζει πως ο σχηματισμός τοξινών είναι πολύ ευνοϊκός στο κανάλι διανομής των προϊόντων, επομένως απαιτείται παρακολούθηση για την εξασφάλιση της ποιότητας των προς κατανάλωση προϊόντων. Η USFDA υποδηλώνει πως οι χρόνο-θερμοκρασιακοί δείκτες είναι χρήσιμοι για τον έλεγχο της ασφάλειας (2002).

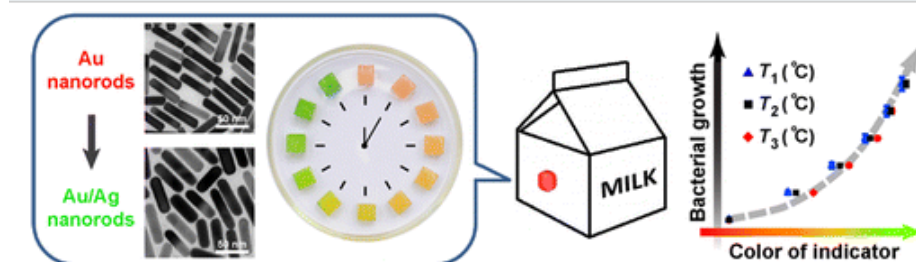
Η διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας των θαλασσινών παρουσιάζει σημαντικές απώλειες λόγω ποιοτικής αλλοίωσης των διακινούμενων τροφίμων. Στα πλαίσια αυτού έγινε προσπάθεια συστηματικής μελέτης και μοντελοποίησης της διάρκειας ζωής ή διατηρησιμότητας (shelf life) διαφόρων ειδών φρέσκων και ελάχιστα επεξεργασμένων θαλασσινών. Η ανάλυση της διατηρησιμότητας απαιτεί τη χρονική συσχέτιση μεταξύ των μετρούμενων χημικών/βιοχημικών μεταβολών, της μικροβιακής δραστηριότητας και της οργανοληπτικής ποιότητας των δειγμάτων. Αν και κάθε είδος προϊόντος παρουσιάζει διαφορετική κινητική ποιοτικής αλλοίωσης, μελέτη της επίδρασης των παραπάνω παραγόντων έδωσε τις βάσεις για τη βαθύτερη κατανόηση των φαινομένων αλλοίωσης και το σχεδιασμό πιο αξιόπιστου μοντέλου πρόρρησης της διάρκειας ζωής των θαλασσινών (Dalgaard & Huss, 1997). Μοντέλα για την οργανοληπτική ποιότητα και την αύξηση της μικροβιακής αλλοίωσης αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες.

Οι ετικέτες ΤΠΙ αποτελούν μια απλή και δυνητικά οικονομικά αποδοτική μέθοδο για την παρακολούθηση της θερμικής πορείας των ευπαθών προϊόντων. Έχουν αξιολογηθεί με έναν αριθμό ευαλλοίωτων τρόφιμων, όπως:

- κατεψυγμένα ψάρια (Taoukis et al., 1999a),
- γαλακτοκομικά προϊόντα (Chen & Zall, 1987; Grisius et al., 1987; Fu et al., 1992; Shellhammer & Singh, 1991)
- κατεψυγμένο βόειο κρέας (Rodriguez & Zarizky, 1983; Wells & Singh, 1985)
- κατεψυγμένα λαχανικά (Giannakourou & Taoukis, 2003a),

- αναλώσιμα και ημι-ευπαθή τρόφιμα, όπως τομάτες, συσκευασμένο μαρούλι, κονσερβοποιημένα κέικ φρούτων (Wells & Singh, 1988).
- φρέσκα θαλασσινά (Welt et al., 2003).

Επίσης έχουν γίνει εκτιμήσεις για τη χρήση των TTI για συσκευασίες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (CAP)/MAP διατηρημένα με απλή ψύξη τρόφιμα (Labuza et al., 1992).



Εικόνα 2.8 Εφαρμογή TTI σε φρέσκο γάλα.



Εικόνα 2.9 Εφαρμογή TTI σε αεροστεγή συσκευασία θαλασσινού

Η εταιρεία Vitsab σε συνεργασία με την USDA καθώς και άλλων ομοσπονδιακών και κρατικών οργανισμών έχει αναπτύξει νέες Smart Shellstock TTI-ετικέτες, οι οποίες συμβαδίζουν με μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης του *Vibrio parahaemolyticus* και του *Vibrio vulnificus* που παρέχονται απ' την FDA.

Η ανάπτυξη του παθογόνου *Vibrio spp.* σε οστρακοειδή μετά τη συγκομιδή αποτελεί μία τυπική σχέση χρονο-θερμοκρασίας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα μοντέλο πρόβλεψης της ανάπτυξης. Η εταιρεία Vitsab έχει ξεκινήσει ένα πρόγραμμα ανάπτυξης για τους κατάλληλους δείκτες TTI και έχει τέσσερα σκεύασμα δοκιμής για την παρακολούθηση ανάπτυξης των παραπάνω παθογόνων μικροοργανισμών. Το μικρό μέγεθος της ετικέτας TTI, της επιτρέπει να κολληθεί σε δοχείο συγκομιδής ιχθύων, σε συσκευασία οστρακοειδών καθώς και οποιαδήποτε άλλη συσκευασία.

Η Vitsab προσεγγίστηκε από τον Dr. Steve Otwell (U of Florida, Gainesville, FL, USA) σχετικά με μία νέα ετικέτα που θα μπορούσε να παρακολουθήσει τη χρονο-θερμοκρασιακή σχέση για την τοξίνη από το *Clostridium botulinum*. Η αίτηση αναφέρεται σ' ένα επιστημονικό άρθρο των Skinner & Larkin (1998) όπου προτάθηκε η χρήση χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών για ν' αποτραπεί πιθανός

κίνδυνος αλαντίασης λόγω έκθεσης των προϊόντων σε αυξημένες θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια διακίνησης και συντήρησης. Η Vitsab ανέπτυξε μία έξυπνη ετικέτα καλά προσαρμοσμένη στο *C. bot.* και τοξινών του σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 1-25°C σύμφωνα με τις απαιτήσεις του FDA των συσκευασμένων προϊόντων θαλασσινών που εισάγονται στις ΗΠΑ. Η ετικέτα «Vitsab's L5-8 TTI Seafood Label» ξεκίνησε το 2001 και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από τους αλιείς θαλασσινών που εξάγουν τα προϊόντα τους από τις ΗΠΑ από όλα τα μέρη του κόσμου (www.vitsab.com).

2.14 Σύστημα FIFO-LSFO ή SRLS

Είναι κατανοητό ότι τα TTI μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της θερμοκρασίας έκθεσης ενός τροφίμου από τη στιγμή παραγωγής του, κατά τη διακίνησή του και μέχρι να φτάσει στον καταναλωτή. Επίσης, με εφαρμογή των δεικτών σε ξεχωριστές παλέτες μπορεί να εξαχθεί ένα μέτρο των προηγούμενων θερμοκρασιακών συνθηκών σε κάθε σημείο παραλαβής. Αυτά τα σημεία θα μπορούν να λειτουργήσουν ως κέντρα συγκέντρωσης πληροφοριών και λήψης αποφάσεων. Το τμήμα της απόφασης θα περιλαμβάνει ενέργειες όπως πιο προϊόν πρέπει να παρθεί πρώτο και πιο ν' απορριφθεί καθώς και άμεση έρευνα και αναφορά σε περίπτωση που σημαντική βλάβη της αλυσίδας διανομής λάβει χώρα. Οι πληροφορίες που θα συγκεντρωθούν, θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το συνολικό έλεγχο του συστήματος διανομής, επιτρέποντας έτσι αναγνώριση και πιθανή διόρθωση των περισσότερων προβληματικών τμημάτων. Ακόμα, θα επιτρέπει στον παραγωγό και διανομέα ότι το προϊόν διακινείται σωστά. Η παρουσία και μόνο του TTI θα βελτιώνει το χειρισμό, λειτουργώντας ως κίνητρο και υπενθυμίζοντας τη σημασία σωστής διακίνησης.

Μεγάλη σημασία έχει η εφαρμογή των TTI στη διαχείριση αποθεμάτων. Η πολιτική του πρωτο-εισερχόμενου/πρωτο-εξερχόμενου → **first-in/first-out (FIFO)**, χρησιμοποιείται σήμερα για να καθορίσει τη σειρά με την οποία τα ψυγμένα και κατεψυγμένα τρόφιμα διανέμονται. Τα προϊόντα που λαμβάνονται πρώτα και/ή έχουν τη συντομότερη ημερομηνία λήξης αποστέλλονται και εκτίθενται στους καταναλωτές πρώτα. Όταν όμως οι θερμοκρασιακές συνθήκες κατά τη μεταφορά και τη διαχείριση δεν είναι οι πλέον κατάλληλες, η FIFO πολιτική αδυνατεί να

αποζημιώσει για την αυξημένη αλλοίωση και την ανομοιομορφία στην ποιότητα του προϊόντος που θα διανεμηθεί.

Ένας εναλλακτικός τρόπος διαχείρισης των αποθεμάτων θα ήθελε να εξέρχεται πρώτο το προϊόν με τη μικρότερη διάρκεια ζωής→ **least-shelf-life/first out (LSFO)** ή το προϊόν με τη συντομότερη εναπομένουσα διάρκεια ζωής **shortest-remaining-shelf-life (SRSL)**. Το πλεονέκτημα αυτής της πολιτικής είναι η μείωση της σπατάλης των τροφίμων και η παροχή ποιότητας με περισσότερη συνέπεια, παρά την έκθεσή τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Ταουκίς et al., 1998; Giannakourou and Ταουκίς, 2002). Εφαρμογή αυτής της πολιτικής έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την ποιότητα των ευαλλοίωτων τροφίμων καθώς η σειρά διανομής στην αγορά θα βασίζεται στην εκτίμηση της αλλαγής στην ποιότητα και όχι στον παρερχόμενο χρόνο αποθήκευσης.

2.15 Ανάπτυξη και εφαρμογή συστήματος SMAS (Safety Monitoring and Assurance System)

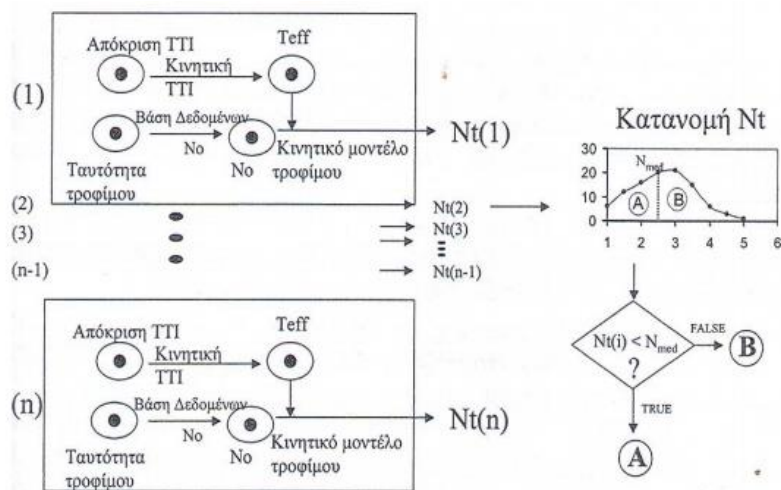
Το SMAS είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας και στοχεύει στη βελτιστοποίηση της διακίνησης των προϊόντων. Βασίζεται στη δυνατότητα της συνεχούς καταγραφής των θερμοκρασιακών συνθηκών με τη χρήση ολοκληρωτών ΤΤΙ για την ασφάλεια και ποιότητα των προϊόντων.

Σε αυτό το σύστημα επιχειρείται να αντικατασταθεί το FIFO και να δοθεί μια νέα προσέγγιση για τη διαχείριση των αποθεμάτων. Αξιολογούνται τα προϊόντα και δίνεται προτεραιότητα σε αυτά με το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο, το οποίο βέβαια εξακολουθεί να βρίσκεται στα αποδεκτά πλαίσια. Αυτή η ιεράρχηση των τροφίμων χρησιμοποιεί ως κριτήριο την απόκριση των συνημμένων ΤΤΙ, που απεικονίζει το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό των προϊόντων.

Το SMAS χρησιμοποιεί επαληθευμένα μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης παθογόνων και ειδικών μικροοργανισμών αλλοίωσης (Specific spoilage organisms SSO) για τη συνεχή θερμοκρασιακή καταγραφή της ψυκτικής αλυσίδας με τη βοήθεια των ΤΤΙ και για τη συσχέτιση της οργανοληπτικής αποδοχής με ένα τελικό επίπεδο μικροοργανισμών, που σηματοδοτεί τη λήξη της ζωής του προϊόντος. Το SMAS αφορά κάθε είδος προϊόντος κρέατος. Όλα τα στοιχεία εισάγονται στο σύστημα και ολοκληρώνονται με τη βοήθεια ενός λογισμικού, που επιτρέπει τον υπολογισμό της

εναπομένουσας διάρκειας ζωής και της επικινδυνότητας (risk assessment) των μεμονωμένων μονάδων προϊόντων σε κρίσιμα σημεία της ψυκτικής αλυσίδας.

Με βάση την κατανομή της εναπομένουσας διατηρησιμότητας που υπολογίζεται σε οποιοδήποτε στάδιο διακίνησης, είναι δυνατό να ληφθούν αποφάσεις για βέλτιστες συνθήκες μεταχείρισης, μεταφοράς και αποθήκευσης. Ο απώτερος στόχος είναι να επιτευχθεί μια στενότερη κατανομή ποιότητας στο τελικό στάδιο της κατανάλωσης και μείωση του ρίσκου ασθένειας του καταναλωτή.



Σχήμα 2.5 Λογικό διάγραμμα του αλγόριθμου λήψης απόφασης σε κρίσιμα σημεία ελέγχου της αλυσίδας διακίνησης (Koutsoumanis et al., 2005)

Το παραπάνω λογικό διάγραμμα του αλγόριθμου αποτελεί τη βάση σχεδιασμού του SMAS και απεικονίζει τον μηχανισμό λήψης αποφάσεων σε ένα υποθετικό σημείο ελέγχου της ψυκτικής αλυσίδας. Με βάση την εναλλακτική τεχνική του SMAS, τα προϊόντα με το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο N_t , που βρίσκεται στα αποδεκτά πλαίσια, θα μεταφερθούν στον πλησιέστερο προορισμό (B), προκειμένου να καταναλωθούν σε συντομότερο χρονικό διάστημα, ενώ τα λιγότερο προσβεβλημένα, από μικροβιολογική άποψη, τεμάχια θα κατευθυνθούν στην πιο μακρινή αγορά (A).

Στα σημαντικά σημεία απόφασης της ψυκτικής αλυσίδας, η εφαρμογή του SMAS προϋποθέτει την εισαγωγή της απόκρισης του συνημμένου στο τρόφιμο ΤΠΙ και των χαρακτηριστικών του προϊόντος. Αυτές οι πληροφορίες καταχωρούνται απευθείας σε μια φορητή, εξοπλισμένη με το κατάλληλο λογισμικό εργαλείο του SMAS, μονάδα, έτσι ώστε να γίνει δυνατή η αυτόματη “μετάφραση” αυτών των δεδομένων

σε ποιότητα Nt και επικινδυνότητα. Στο λογισμικό του SMAS, χρησιμοποιούνται κινητικές εξισώσεις για την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης, όπως το λογισμικό μοντέλο 4 παραμέτρων, λαμβάνοντας υπόψη και την εκθετική φάση ανάπτυξης μ_{max} (h^{-1}) και τη λανθάνουσα φάση (h). Η θερμοκρασιακή εξάρτηση εκφράζεται μαθηματικά με την εξίσωση Arrhenius ή Belehradek (Ταουκίς, 2005).

Η συμβολή του SMAS στην διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας, σε σύγκριση με το σύστημα FIFO, μπορεί να απεικονιστεί ως ελαχιστοποίηση του κινδύνου παθογένεσης από την κατανάλωση αλλοιωμένου κρέατος και βελτιστοποίηση της ποιότητας των προϊόντων κρέατος κατά την διάρκεια της κατανάλωσης (Ταουκίς, 2005).

2.16 Μελλοντικές τάσεις

Η εξέλιξη της τεχνολογίας των ΤΠΙ και της επιστημονικής προσέγγισης όσον αφορά την αξιολόγηση του κινδύνου της ασφάλειας των τροφίμων επέτρεψε την ανάληψη ενός επόμενου σημαντικού βήματος: τη μελέτη και την ανάπτυξη ενός συστήματος διαχείρισης ΤΠΙ που θα μπορούσε να εξασφαλίσει τόσο την ασφάλεια όσο και την ποιότητα στην ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων (Koutsoumanis et al., 2005). Η ανάπτυξη και η εφαρμογή ενός τέτοιου συστήματος διπλής χρήσης, γνωστό ως SMAS ήταν ο στόχος ενός ανωτέρου ευρωπαϊκού έργου. Αν και το σύστημα αυτό αναπτύχθηκε για τα προϊόντα που βασίζονται στο κρέας, οι ίδιες αρχές μπορούν να εφαρμοστούν αποτελεσματικά και στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας όλων των διατηρημένων με απλή ψύξη ευαλλοίωτων προϊόντων (Tsironi et al., 2008). Το SMAS θα μπορούσε να αντικαταστήσει το σημερινό “FIFO - First In First Out” και να οδηγήσει σε ελαχιστοποίηση του κινδύνου και βελτιστοποίηση της ποιότητας, αριστοποιώντας τον εφοδιασμό και τη διανομή των τροφίμων. Διασφαλίζει ότι τα ευαλλοίωτα προϊόντα καταναλώνονται πριν φτάσουν στα μη επιτρεπτά όρια. Όταν διατηρούνται οι συνθήκες της ψυκτικής αλυσίδας, η εφαρμογή του συστήματος SMAS δεν διαφέρει από το σύστημα FIFO. Ωστόσο, σε περίπτωση ακραίας θερμοκρασίας, το SMAS διαχειρίζεται την αλυσίδα, έτσι ώστε η τελική απόρριψη προϊόντων και ο κίνδυνος να ελαχιστοποιείται. Η βελτιστοποίηση της ψυκτικής αλυσίδας και η αποτελεσματική της διαχείριση θα είναι ένα κεντρικό ζήτημα σε έρευνες, σε βιομηχανικές πρακτικές και ρυθμιστικές προσπάθειες, καθώς η

βιομηχανία προσπαθεί συνεχώς για την παροχή υψηλής ποιότητας τροφίμων και άλλων αναλώσιμων ειδών προς τους καταναλωτές.

Επίσης, η πρόοδος σε ότι αφορά την ποικιλία, την αξιοπιστία και την ευελιξία των ΤΠ, αλλά και τον καλύτερο προσδιορισμό της διάρκειας ζωής των προϊόντων τροφίμων, θα επιτρέψει την επιτυχή εφαρμογή των εργαλείων αριστοποίησης της ψυκτικής αλυσίδας όπως το LSFO και το σύστημα λήψης αποφάσεων SLDS (Shelf Life Decision System). Η έρευνα στον τομέα της κινητικής μοντελοποίησης και της πρόβλεψης της μικροβιολογίας, θα δείξει πώς οι δείκτες μπορούν με μεγάλη ασφάλεια να επεκταθούν στη συμβολή της διασφάλισης της ποιότητας των περισσότερων τροφίμων. Φιλικό προς το χρήστη λογισμικό θα ενσωματώσει τα συστήματα υποστήριξης που αποσκοπούν στην πρόβλεψη αποτελεσμάτων των παραμέτρων επεξεργασίας και το σχεδιασμό του προϊόντος με την ποιότητα των προϊόντων.

3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΡΕΙΔΙΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Τα θαλασσινά είναι ζωικοί οργανισμοί που ζουν σε θάλασσες, ποταμούς και λίμνες και χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα οστρακοειδή και τα κεφαλόποδα. Τα οστρακοειδή αποτελούνται από δύο υποκατηγορίες, τα οστρακόδερμα και τα μαλάκια. Από εξελικτικής άποψης τα μαλάκια θεωρούνται τα πιο προηγμένα ανάμεσα στα ασπόνδυλα.

Ο ρόλος των θαλασσινών και των προϊόντων τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την ανθρώπινη διατροφή, καθώς αποτελούν πηγή βιολογικά πολύτιμων πρωτεϊνών, λιπών και λιποδιαλυτών βιταμινών. Η συχνή κατανάλωση θαλασσινών μπορεί να οδηγήσει στη μείωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων και σε πρόληψη της στεφανιαίας καρδιακής νόσου και των φλεγμονώδων νοσημάτων. Επίσης, η κατανάλωσή τους έχει συσχετιστεί με τον περιορισμό της παχυσαρκίας (Thorsdottir et al., 2008). Η μέση ετήσια κατά κεφαλή κατανάλωση παρουσίασε αύξηση από 9 kg το 1961, σε 16.5 kg το 2003. Σύμφωνα με τις προβλέψεις του FAO, έως το 2030 αναμένεται αύξηση της μέσης ετήσιας κατα κεφαλή κατανάλωσης στην Ευρώπη από 19.9 kg σε 24 kg. Στην ελληνική αγορά προβλέπεται αύξηση της μέσης ετήσιας κατα κεφαλή κατανάλωσης ιχθύων από 26 σε 27 kg (FAO, 2007b).

Τα θαλασσινά λόγω της διατροφικής τους αξίας έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών καταναλωτών (NOAA 2004; FAO 2006) και τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει δημοφιλής η κατανάλωση νωπών στρειδιών (DePaola et al. 1983; Gelli et al. 2001). Παρ' όλα αυτά, τα νωπά στρείδια μπορούν να θεωρηθούν πηγή τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών (Wright et al. 1986; Kaysner et al. 1987; National Academy of Sciences 1991; Hoi et al. 1998; Oliver 2005), όπως είναι *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* και *Aeromonas hydrophila*.

Η αλίευση και η καταναλωσή τους έχει αυξηθεί ραγδαία στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Αυστραλία, την Ασία, τη Νότια Αμερική αλλά και την Ευρώπη. Κρίνεται αναγκαία η μελέτη ενός τέτοιου προϊόντος αν λάβουμε υπόψη μας τις

θερμοκρασίες που εκτίθεται το τρόφιμο σε συνδιασμό με τον κίνδυνο ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και τα θρεπτικά στοιχεία και οφέλη που μπορεί να προσφέρει. Ειδικά για τα στρείδια, η συνήθης πρακτική κατά την αλίευση και μεταφορά δεν περιλαμβάνει την ψύξη τους μέχρι το στάδιο της αποθήκευσης, επιτρέποντας στο προϊόν να εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες, ακόμα και 25-30°C για μικρά ωστόσο χρονικά διαστήματα.

3.2 Μαλάκια

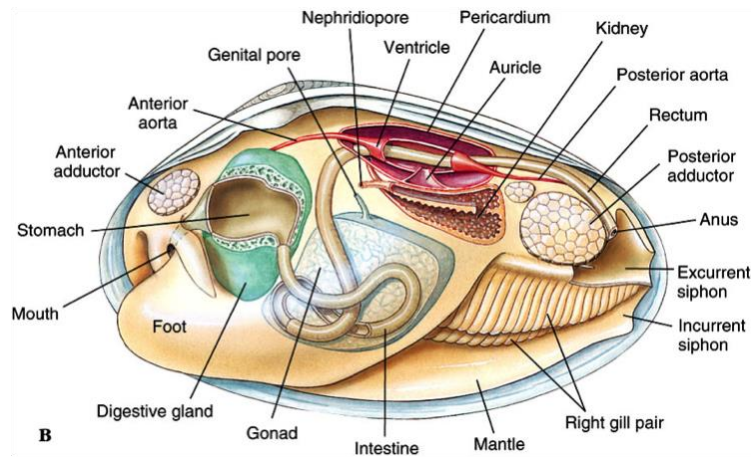
Τα μαλάκια (*Mollusca*) αποτελούν μια τεράστια συνομοταξία ζώων, την πολυπληθέστερη μετά τα αρθρόποδα, με πάνω από 100.000 είδη. Στη συνομοταξία αυτή ανήκουν οι επιμέρους πέντε ομοταξίες:

1. τα αμφίνευρα
 - Απλακοφόρα (*solenogasters*, σκωληκοειδής)
 - Πολυπλακοφόρα (χιτώνες)
2. τα δίθυρα, γνωστά και ως ελασματοβράγχια (π.χ. μύδια, στρείδια, χτένια)
3. τα κεφαλόποδα (π.χ. καλαμάρια, χταπόδια, ναυτίλοι, σουπιές)
4. τα γαστερόποδα (π.χ. γυμνοβράγχια, σαλιγκάρια, γυμνοσάλιαγκες, πεταλίδες) και
5. τα σκαφόποδα, τα οποία περιλαμβάνουν λίγα θαλάσσια μαλάκια και είναι γνωστά και ως χαυλιόδοντες εξαιτίας του σχήματός τους.

Επίσης υπάρχει και η ομοταξία των μονοπλακοφόρων, τα οποία θεωρούνταν εξαφανισμένα, ενώ τα τελευταία χρόνια βρέθηκαν σε μεγάλα βάθη τα γένη *Neopilina* και *Vena* (Runnegar & Projeta, 1985).

3.2.1 Ομοταξία δίθυρα (*Bivalvia*)

Την ομοταξία δίθυρα αποτελούν μαλάκια που δεν έχουν κεφαλή. Φέρουν όστρακο, αποτελούμενο από δύο ασβεστιτικής σύστασης θυρίδες, στο οποίο περικλείονται όλα τα μαλακά μέρη και έχουν αμφίπλευρη συμμετρία. Είναι θαλάσσια βενθονικά (επι- και ενδο-βενθονικά) ζώα ενώ μερικά έχουν προσαρμοστεί στα γλυκά νερά (*Unio*, *Anodonta*). Τα δίθυρα τρέφονται φιλτράροντας σωματίδια από το θαλασσινό νερό (μικροφάγα ζώα) (Waller, 1998).



Εικόνα 3.1 Ανατομία του είδους *Bivalvia*

3.3 Στρείδια

Τα στρείδια είναι μαλάκια του είδους *Bivalvia*, τα οποία αποτελούνται από δύο κελύφη, λαμβάνουν την τροφή τους από την άντληση νερού και φιλτράρουν μικροοργανισμούς από τα περιβάλλοντα ύδατα. Μπορούν να ζήσουν μέχρι και 20 χρόνια. Η ηλικία της ακμαιοτήτάς τους κυμαίνεται από τον 4^ο μέχρι τον 8^ο χρόνο.

Υπάρχουν πάνω από 200 είδη στρειδιών στον κόσμο, αλλά μόνο λίγα χρησιμοποιούνται προς κατανάλωση. Πολλά είδη είναι πολύ μικρά για να καταναλωθούν, ενώ άλλα συλλέγονται ως διακοσμητικά κοχύλια. Αναπτύσσονται στο βυθό της θάλασσης και προσκολλούνται σε συστάδες σε σκληρές επιφάνειες ή όστρακα. Οι βρώσιμες ποικιλίες συνήθως καλλιεργούνται σε συγκεκριμένα παράκτια ύδατα που παρακολουθούνται στενά για να εξασφαλίσουν την ασφάλεια των προϊόντων. Λόγω της κατανάλωσής τους ως νωπό τρόφιμο, αυστηρά μέτρα είναι αναγκαία για την ασφάλεια των καταναλωτών.

3.3.1 Τύποι και μορφές στρειδιών

Δύο είδη στρειδιών είναι ευρέως γνωστά στην Αμερική (Parkhaen, 1998):

- Ανατολικό στρείδι (*Crassotera virginica*) και
- Στρείδι του Ειρηνικού (*Crassotera gigas*).

Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ κάθε είδους από μία περιοχή συγκομιδής σε μία άλλη. Εφόσον τα στρείδια τρέφονται φιλτράροντας τα περιβάλλοντα ύδατα, η γεύση τους, το σχήμα, το χρώμα και η σάρκα τους ποικίλλει αντικατοπτρίζοντας τις μοναδικές συνθήκες των υδάτων στις οποίες αναπτύσσονται και την περίοδο

συγκομιδής τους. Για τους λόγους αυτούς, τα στρείδια βρίσκονται συνήθως στο εμπόριο με τα ονόματα που σχετίζονται με τη θέση της συγκομιδής τους ή την περιοχή καλλιέργειάς τους.

Η φυσική καλλιέργεια βασίζεται στη διατήρηση στρειδιών που πραγματοποιούν τον πλήρη κύκλο ζωής τους. Αντίθετα, υδατοκαλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιήσουν εξωτερικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των επιλεγμένων στρειδιών, ιδίως σε παράκτιες περιοχές. Και οι δύο προσεγγίσεις εξαρτώνται από την φυσική ανάπτυξη των θαλάσσιων υδάτων.



Εικόνα 3.2 Στρείδι με μισό κέλυφος.

3.3.2 Θρεπτική αξία στρειδιών

Τα στρείδια είναι χαμηλού ενεργειακού περιεχομένου και αποτελούν τροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και υψηλής πρωτεϊνικής αξίας. Η πρωτεΐνη που περιέχεται στα στρείδια είναι συνήθως πιο εύπεπτη, σε σχέση με άλλες μορφές πρωτεΐνης που συναντάμε στο κοτόπουλο ή στο βοδινό.

Τα στρείδια είναι πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα, κάλιο, μαγνήσιο και βιταμίνη E. Τα ω-3, το κάλιο και το μαγνήσιο μπορούν να βοηθήσουν στη βελτίωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα και να μειώσουν την αρτηριακή πίεση και τη φλεγμονή, βοηθώντας στην ελάττωση του κινδύνου καρδιακών παθήσεων.

Επίσης, αποτελούν την πλουσιότερη πηγή ψευδαργύρου. Ο ψευδάργυρος κατέχει σημαντικό ρόλο στην επούλωση πληγών και στη διατήρηση ενός υγιούς ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπροσθέτως, τα στρείδια είναι πλούσια πηγή και άλλων μετάλλων όπως είναι το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο σίδηρος.

Τέλος, αποτελούν μια καλή πηγή βιταμινών, συμπεριλαμβανομένων των Α, Β και C, βιταμίνες κατάλληλες για την πρόληψη των ασθενειών (USDA Nutrient Database, 2016).

Πίνακας 3.1 Διατροφικά στοιχεία στρειδιού (USDA Nutrient Database, 2016)

Διατροφικά Στοιχεία (ποσότητα /100g)	
Νερό	82.06 g
Ενέργεια	81kcal
Πρωτεΐνη	9.45g
Συνολικά λιπαρά	2.3g
Υδατάνθρακες	4.95
Μεταλλικά Στοιχεία	
Ασβέστιο (Ca)	8 mg
Σίδηρος (Fe)	5.11 mg
Μαγνήσιο (Mg)	22 mg
Φώσφορος (P)	162 mg
Κάλιο (K)	168 mg
Νάτριο (Na)	106 mg
Ψευδάργυρος (Zn)	16.62 mg
Βιταμίνες	
Βιταμίνη C	8 mg
Βιταμίνη B-6	0.05 mg
Βιταμίνη A	81 µg
Βιταμίνη B-12	16 µg
Λιπαρά	
Κορεσμένα λιπαρά	0.51 g
Μονοακόρεστα λιπαρά	0.358 g
Πολυακόρεστα λιπαρά	0.894 g
Χοληστερίνη	50 mg

3.4 Μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης στρειδιών

Τα στρεΐδια έχουν μεγάλη εμπορική αξία αλλά λόγω της μικρής διάρκειας ζωής τους, συνήθως προωθούνται νωπά σε περιορισμένα εμπορικά σύνορα.

Διατίθενται στην αγορά χωρίς κέλυφος, σε φρέσκια μορφή, συσκευασμένα σε σακούλα πολυαιθυλενίου μ' ένα συντηρητικό διάλυμα ή κατεψυγμένα. Ωστόσο, η μικροβιακή ανάπτυξη των στρειδιών εμφανίζεται μετά το άνοιγμά τους, αφού οι νεκροί ή τραυματισμένοι ιστοί παρέχουν θρεπτικά συστατικά (Hubin et al., 2008;

Cao et al., 2010). Η διατήρηση στρειδιών σε πάγο ή στην κατάψυξη είναι ένας απλός τρόπος για την αποθήκευσή τους (Buzin et al., 2011; Cao et al., 2009), ενώ μικροβιολογικές και χημικές αξιολογήσεις διεξάγονται για τα όρια αποδοχής στρειδιών και την καταλληλότητα κατανάλωσής τους (Cao et al., 2009). Άλλες μέθοδοι, όπως η επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση (Prapaiwong et al., 2009), η επικάλυψη χιτοζάνης και η επεξεργασία με όζον (Cao et al., 2009), έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές για την επιβράδυνση της μικροβιακής ανάπτυξης σε συνθήκες ψυξης (Chen et al., 2013).

Ωστόσο, οι περισσότερες από τις μεθόδους επεξεργασίας που έχουν μελετηθεί, ελαττώνουν το μικροβιακό φορτίο αμέσως μετά την επεξεργασία, ενώ πολύ λίγες μελέτες έχουν τεκμηριώσει την επέκταση διατηρησιμότητας που επιτυγχάνεται (Chen et al., 2013; Costa et al., 2014).

3.5 Παρουσία και ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών

Τα στρείδια είναι ένα απ' τα σημαντικότερα είδη θαλασσινών σε όλο τον κόσμο και τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει δημοφιλής η κατανάλωση νωπών στρειδιών (DePaola et al. 1983; Gelli et al. 2001). Ωστόσο, τα νωπά στρείδια αποτελούν πηγή διαφόρων τροφιογενών παθογόνων μικροοργανισμών (Wright et al. 1986; Kaysner et al. 1987; National Academy of Sciences 1991; Hoi et al. 1998; Oliver 2005).

Η μικροβιακή ανάπτυξη στα στρείδια εμφανίζεται μετά το άνοιγμά τους, αφού οι νεκροί ή τραυματισμένοι ιστοί παρέχουν θρεπτικά συστατικά για τους μικροοργανισμούς (Chen et al., 2013).

Τα παθογόνα βακτήρια που σχετίζονται με τη δημόσια υγεία και αναπτύσσονται στα νωπά στρείδια είναι *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* και *Aeromonas hydrophila*.

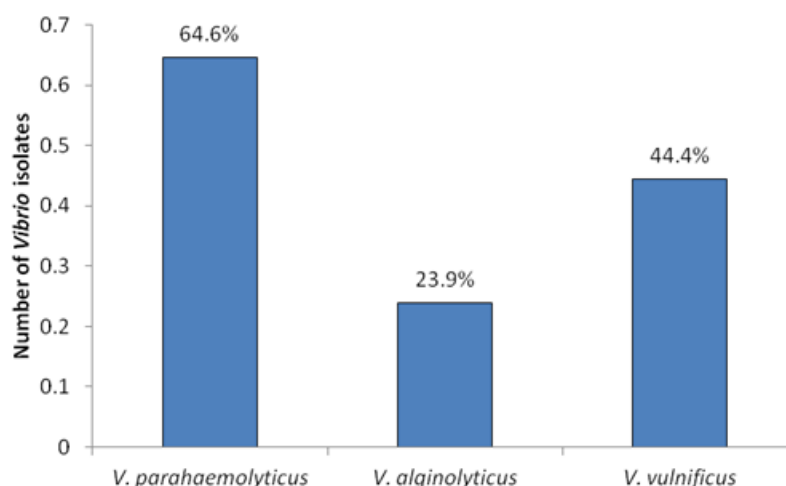
Αναφορικά με τις θερμοκρασίες που εκτίθενται τα στρείδια και την ανάπτυξη παθογόνων, σε θερμοκρασία 20°C αναπτύσσονται τα βακτήρια *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Cytophaga fermentans*, *Lactococcus lactis*, *Pseudoalteromonas spp.*, *Enterococcus mundtii*, *Clostridium difficile* και *Fusobacteria*. Σε θερμοκρασία 10°C αναπτύσσονται τα *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus curvatus*, *Weissella confusa* και *C. difficile*, και στους 4°C τα *Lactococcus*, *Weissella*,

Enterobacter και *Aeromonas*. Τα βακτήρια που εντοπίζονται σε πλειονότητα είναι τα *L.curvatus*, *Pseudomonassp.* και *E.mundtii* (Chen et al., 2013).

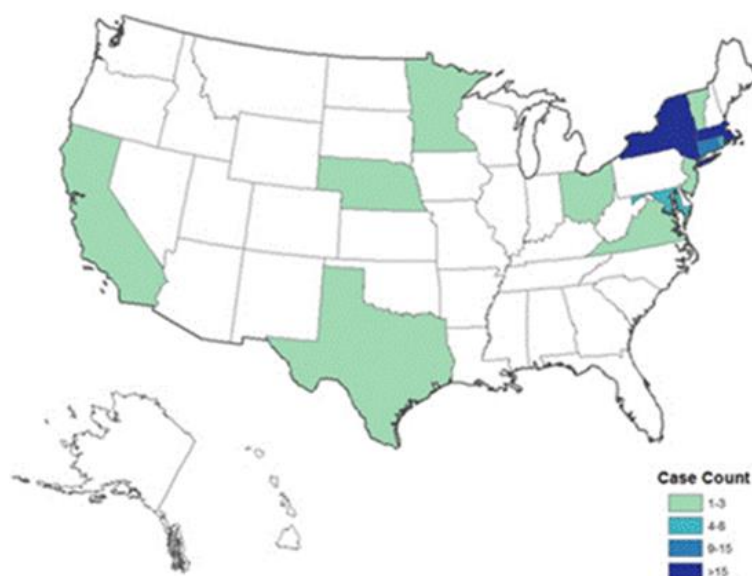
3.5.1 Παθογόνος μικροοργανισμός *Vibrio spp.*

Τα *Vibrio spp.* είναι gram-αρνητικά, ραβδόμορφα βακτήρια που εμφανίζονται στις εκβολές ποταμών ή σε θαλάσσιο περιβάλλον. Το *Vibrio vulnificus* και το *Vibrio parahaemolyticus* είναι τα πιο κοινά είδη *Vibrio* που σχετίζονται με ασθένειες που προκύπτουν από την κατανάλωση νωπών ή μερικώς μαγειρεμένων θαλασσινών σε όλο τον κόσμο. Μετά τη συγκομιδή των οστρακοειδών, αυτά τα βακτήρια αναπτύσσονται γρήγορα όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, ιδίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Τα *Vibrio spp.* μπορεί να προκαλέσουν γαστρεντερίτιδα, εμετούς, διάρροια, κεφαλαλγία, ναυτία, πρωτογενή σηψαιμία, λοιμώξεις τραύματος, ή άλλες εξωεντερικές λοιμώξεις και είναι η κύρια αιτία τροφιογενών λοιμώξεων (Baker-Austin et al., 2010).

Κρούσματα τροφιογενών λοιμώξεων από την κατανάλωση στρειδιών έχουν αναφερθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Αυστραλία, την Ασία, τη Νότια Αμερική και την Ευρώπη. Από το 1989 έως το 2002, ο FDA καταγραφεί 341 σοβαρές ασθένειες που συνδέονται με την κατανάλωση νωπών οστρακοειδών που περιέχουν *V. vulnificus*. 98% αυτών των περιπτώσεων ήταν από την κατανάλωση νωπών στρειδιών, ενώ 179 άτομα (πάνω από 52%) πέθαναν από την ασθένεια αυτή (UC Food safety bulletin). Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) ξεκίνησε την παρακολούθηση του *V. parahaemolyticus* στα παράκτια ύδατα της ΗΠΑ το Μάιο του 2013 σε 13 κράτη με ομοσπονδιακούς και πολιτειακούς εταίρους. Μέχρι το τέλος του Σεπτεμβρίου 2013 είχαν αναφερθεί 104 κρούσματα από την κατανάλωση νωπών ή μαγειρεμένων οστρακοειδών, κυρίως στρειδιών (CDC, 2013). Για την περίοδο 2006-2014, από τα 208 (96%) βακτήρια *Vibrio* στις ΗΠΑ, τα 131 (63%) ήταν *V. parahaemolyticus*, τα 27 (13%) ήταν *V. alginolyticus*, και τα 19 (9%) ήταν *V. vulnificus* (CDC, 2015). Σε απάντηση προς την αξιολόγηση κινδύνου *Vibrio*, η αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) πραγματοποιεί ελέγχους μετά την αλίευση στρειδιών στην ακτή του Κόλπου κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών (FDA, 2009).



Σχήμα 3.1 Είδη *Vibrio* spp. που αναφέρθηκαν στις ΗΠΑ την περίοδο 2006-2014 (CDC, 2015)



Εικόνα 3.2 Κρούσματα *V. parahaemolyticus* στις ΗΠΑ για το 2013 (CDC, 2013)

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν ληφθεί μέτρα ελέγχου για την πρόληψη των λοιμώξεων από το *V. parahaemolyticus* στα στρείδια. Έχει τεθεί σε εφαρμογή ένα σχέδιο διαχείρισης κινδύνου από το “National Shellfish Sanitation Program” που ορίζει το μέγιστο χρονικό διάστημα μεταξύ της αλίευσης και της ψύξης του στρειδιού ανάλογα με τις θερμοκρασίες που εκτίθεται. Ωστόσο, το σχέδιο αυτό αναπτύχθηκε για τα στρείδια *Crassostrea virginica* και μπορεί να χρειαστεί να προσαρμοστεί και για άλλα είδη στρειδιών, στα οποία όμως διαφέρουν οι ρυθμοί ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus*. Η αυστραλιανή βιομηχανία στρειδιών κάνει χρήση εργαλείων διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας που περιλαμβάνει μοντέλα

ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus*. Τα μοντέλα αυτά έχουν σχεδιαστεί για στρείδια του Ειρηνικού με σκοπό την αποτελεσματικότητα και την καλύτερη απόδοση των αλυσίδων εφοδιασμού (Fernandez-Piquer et al., 2013).

3.5.2 Quantitative microbiological risk assessment - QMRA

Η ποσοτική μικροβιολογική αξιολόγηση κινδύνου (Quantitative microbiological risk assessment - QMRA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους διαχειριστές κινδύνου για την προστασία της δημόσιας υγείας (Baert et al., 2009; Ross, 2008). Η αξιολόγηση της έκθεσης είναι ένα σημαντικό μέρος της QMRA και παρέχει μία εκτίμηση της πιθανότητας για ένα άτομο ή πληθυσμό να εκτεθεί σ' ένα μικροβιακό κίνδυνο και τον αριθμό των οργανισμών που μπορεί να προσβληθούν (McMeekin, 2007; Zwietering, 2007).

Αξιολόγηση κινδύνου QMRA αναπτύχθηκε για το *V. parahaemolyticus* σε νωπά στρείδια (FDA, 2005) και περιλαμβάνει ένα μοντέλο ανάπτυξης λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας μετά την αλίευση μέχρι τη ψύξη. Ωστόσο, δεν συμπεριλήφθησαν άλλες σχετικές ενέργειες της αλυσίδας εφοδιασμού (π.χ. μεταφορά, λιανικό εμπόριο, αποθήκευση στο σπίτι) που επηρεάζουν την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* και έχουν άμεση σχέση με την έκθεση της υγείας του καταναλωτή. Ο ρόλος των παραπάνω ενεργειών είναι πολύ σημαντικός, δεδομένου ότι τα στρείδια μπορεί να κετεθούν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των ενδεδειγμένων κατά τη διάρκεια διανομής (DePaola et al., 2010; Madigan, 2008) και αποθήκευσης από τον καταναλωτή (Kennedy et al., 2005; Rouillot et al., 2010).

Η εκτίμηση του φορτίου ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC) χρησιμοποιείται ως δείκτης στις προδιαγραφές πολλών θαλασσινών (Huss, 1994). Ικανοποιητικό μικροβιακό επίπεδο για τα στρείδια ορίστηκε η τιμή 5.7-6.2 logcfu/g από την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία και του FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2007). Ωστόσο, ορίστηκε μια υψηλότερη τιμή TVC ίση με 10^7 logcfu/g, η οποία ορίζει τη μέγιστη διάρκεια ζωής για τα στρείδια του Ειρηνικού που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασία (από 0°C έως 10°C) (Cao et al., 2009). Αυτή η τιμή χρησιμοποιήθηκε και ως κριτήριο αποδοχής ποιότητας σε μελέτες διάρκειας ζωής (Cao et al., 2009; Kim et al., 2002). Παρ' όλ' αυτά, υψηλότερες τιμές TVC μπορούν να χαρακτηρίσουν μη αποκελυφωμένα στρείδια (Fernandez-Piquer et al., 2013).

3.6 Μέθοδοι αδρανοποίησης του παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus* σε στρείδια

Πολλές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του αριθμού των παθογόνων βακτηρίων στα θαλασσινά, όπως νερό με ηλεκτρολύτες, κατάψυξη, παστερίωση, χρήση πρόσθετων, υπεριώδη ακτινοβολία (UV), επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση. Ως εκ τούτου, για τη βελτίωση της ασφάλειας και της ποιότητας των στρειδιών, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές νέες τεχνολογίες που απαιτούνται για την κάλυψη της ζήτησης στην αγορά και είναι κατάλληλες για εφαρμογή σε θαλασσινά. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration) έχει εγκρίνει εφαρμογή ιονίζουσας ακτινοβολίας σε πολλά τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων και των θαλασσινών (Henkel 1998).

Παρακάτω ακολουθούν κάποια παραδείγματα από πρόσφατες μελέτες και έρευνες που έγιναν για την αδρανοποίηση του παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus* σε στρείδια.

- Οι Ma & Su (2010) ανέφεραν ότι η υπερυψηλή πίεση (HP) οδηγεί σε μείωση του φορτίου *Vibrio parahaemolyticus* στα στρείδια του είδους *Crassostrea gigas* και προσδιόρισαν τη διάρκεια ζωής τους αποθηκευμένα στους 5°C και σε πάγο. Ο χρόνος ζωής των στρειδιών στους 5°C ήταν 6-8 ημέρες, ενώ 16-18 ημέρες για αποθήκευση σε πάγο (0°C).
- Οι Mahmoud et al. (2008), μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών ακτινών X στην αδρανοποίηση του *Vibrio parahaemolyticus*, εμβολιάζοντας ολόκληρα ζωντανά στρείδια και στρείδια με μισό κέλυφος. Παρατηρήθηκε ότι οι ακτίνες X μπορούν να μειώσουν τον παθογόνο *V. parahaemolyticus* και την εγγενή μικροχλωρίδα των στρειδιών κάτω από το ανιχνεύσιμο όριο, δηλαδή η μέθοδος αυτή μπορεί να ελέγξει τα παθογόνα βακτήρια και να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής των στρειδιών.
- Οι Xi et al. (2012), πραγματοποίησαν μελέτη για την επίδραση του εκχυλίσματος τσαγιού στην ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *V. parahemolyticus* και στις δυνατότητες αξιοποίησης στην επέκταση της διάρκειας ζωής των στρειδιών του είδους *Crassostrea gigas*. Το τσάι Longjing παρουσιάζει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση έναντι του προς μελέτη

παθογόνου και γι' αυτό επιλέχθηκε απ' τους ερευνητές. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το πράσινο τσάι σε αναλογία στρειδιών/εκχύλισμα τσαγιού κατά προσέγγιση 0.7 g/mL μπορεί να ενισχύσει τη μείωση *V. parahaemolyticus* ενώ επιβραδύνει την αύξηση των αλλοιογόνων βακτηρίων στα στρείδια κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας για την αδρανοποίηση του παθογόνου παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής κατά την ψύξη των στρειδιών.

Από όσα προαναφέρθηκαν στα παραπάνω κεφάλαια έχει γίνει αντιληπτό ότι η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων χαρακτηρίζεται από μεγάλες απώλειες ποιότητας λόγω σημαντικών αποκλίσεων από τις προδιαγραφές της θερμοκρασίας. Κατά συνέπεια τα τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας μπορεί να υπόκεινται σε ποιοτική αλλοίωση και μερικές φορές η διάρκεια ζωής τους να διαφέρει από την προβλεπόμενη. Επιπρόσθετα, η απόκλιση της θερμοκρασίας από τα επιτρεπτά όρια θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή.

Για την καλύτερη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας και για την ασφάλεια και ποιότητα ευαλλοίωτων τροφίμων, καθίσταται απαραίτητη η παρακολούθηση του χρονο-θερμοκρασιακού ιστορικού τους μέσω καταγραφής της θερμοκρασίας σε όλα τα στάδια διακίνησης. Σε αυτό το σημείο κρίνεται απαραίτητη η χρήση **χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ)** ώστε να διαπιστωθεί η **ασφάλεια** και η **ποιότητα** των τροφίμων. Τα στρείδια, που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης, είναι ένα τρόφιμο που αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και η μελέτη τους κρίθηκε απαραίτητη λόγω της μεγάλης επικινδυνότητάς τους μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η κινητική μελέτη της απόκρισης νέων ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος ($0-30^{\circ}\text{C}$) και η εύρεση του κατάλληλου ΤΤΙ για τον έλεγχο της ποιότητας στρειδιών κατά τη συντήρηση και διακίνησή τους σε πραγματικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, η μελέτη ανάπτυξης μοντέλων πρόβλεψης για τον παθογόνο μικροοργανισμό *V. parahaemolyticus* που

συναντάται στα στρείδια και η αντιστοίχιση κατάλληλου ΤΠΙ για την ασφάλεια του τροφίμου και των καταναλωτών.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Εισαγωγή - Σκοπός

Για την καλύτερη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας και για την ασφάλεια και ποιότητα ευαλλοιώτων τροφίμων καθίσταται απαραίτητη η παρακολούθηση του χρονο-θερμοκρασιακού ιστορικού τους. Ένα τέτοιο σύστημα είναι οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες, οι οποίοι σε μία μόνο μέτρηση ολοκληρώνουν όλο το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου. Προϋπόθεση για την εύρεση του κατάλληλου ΤΠΙ είναι η συσχέτιση της συνάρτησης απόκρισης διαφόρων ΤΠΙ με παραμέτρους αλλοίωσης και ασφάλειας του προς μελέτη τροφίμου.

Τα στρείδια, που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, είναι ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η μελέτη και συσχέτιση χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών ΤΠΙ σ' ένα προϊόν, όπως το στρείδι, που εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η επίτευξη των ακόλουθων στόχων:

- Η μελέτη της κινητικής απόκρισης νέων ενζυμικών δεικτών ΤΠΙ που έχουν ως ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης και τριπαλμιτίνης (τύπου LP), σε θερμοκρασίες ψύξης αλλά και υψηλότερες στοχεύοντας στη διατήρηση ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων.
- Η κινητική μελέτη της αλλοίωσης στρειδιών, όχι μόνο σε θερμοκρασίες ψύξης αλλά και σε πιθανές θερμοκρασίες διακίνησής τους.
- Η επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Vibrio* spp. σε στρείδια, σε τέσσερις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (15, 20, 23 και 30°C) και σε δυναμική συνθήκη (var).
- Η εύρεση του κατάλληλου ΤΠΙ και η χρήση του για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας των στρειδιών κατά τη συντήρηση και διακίνησή τους σε πραγματικές συνθήκες. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της συσχέτισης ανάπτυξης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και της κινητικής απόκρισης επιλεγμένων ΤΠΙ.

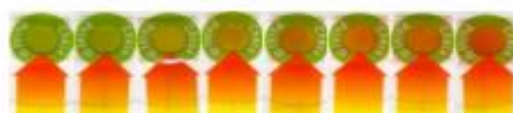
4.2 Μελέτη ενζυμικών χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών τύπου LP

Μελετήθηκε η κινητική απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΤΙ της εταιρείας Vitsab, που έχουν ως ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης και τριπαλμιτίνης (τύπου LP), με διαφορετική συγκέντρωση ενζύμου το καθένα. Οι ενζυμικοί χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: LP-5U, LP-10U, LP-20U, LP-50U, LP-100U, LP-200U, LP-400U, LP-600U. Πραγματοποιήθηκαν ισοθερμοκρασιακά πειράματα σε 7 διαφορετικές θερμοκρασίες: 0, 5, 10, 15, 20, 25 και 30°C και σε κάθε δείκτη διαφορετικής περιεκτικότητας ενζύμου (Units) εφαρμόστηκαν 5 επαναλήψεις.

Η μονάδα ενεργότητας (Unit) ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει τριγλυκερίδια για την παραγωγή 1 μmol λιπαρών οξέων ανά min σε pH=7.2 και θερμοκρασία 37°C (υπόστρωμα ελαιόλαδο).

4.2.1 Πειραματική διαδικασία

- Στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των παραπάνω ενζυμικών χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών.
- Στη συνέχεια εκτελέστηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες. Συγκεκριμένα, ένας ορισμένος αριθμός δειγμάτων από κάθε ΤΤΙ τοποθετήθηκε σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας. Στον πίνακα (4.1) φαίνονται οι θερμοκρασίες μελέτης για κάθε τύπο ΤΤΙ.
- Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε κάθε θερμοκρασία και για κάθε ΤΤΙ γινόταν μέτρηση της μεταβολής του χρώματος με τη χρήση χρωματόμετρου X-rite Eye1pro Colorimeter Illumination D50 (Michigan, USA) καθώς και σύγκρισή τους με δεδομένη χρωματική κλίμακα, όπως φαίνεται στην εικόνα (4.1). Ύστερα από επεξεργασία των παραμέτρων του χρώματος εξήχθησαν οι συναρτήσεις απόκρισης των ΤΤΙ.



Εικόνα 4.1 Μη ενεργοποιημένοι ενζυμικοί δείκτες LP και εργαστηριακή χρωματική κλίμακα ενζυμικών ΤΤΙ

Πίνακας 4.1 Θερμοκρασίες μελέτης για κάθε τύπο ΤΤΙ

Τύπος ενζυμικού ΤΤΙ	Θερμοκρασίες (°C)
LP-5U, LP-10U, LP-20U, LP-50U, LP-100U, LP-200U, LP-400U, LP-600U	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30

4.2.2 Συσκευές πειραματικής διαδικασίας

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συσκευές:

- **Θάλαμοι αποθήκευσης των ΤΤΙ (Μοντέλο: Sanyo MIR 253)**

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, τα ΤΤΙ τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ελεγχόμενου θερμοκρασιακού περιβάλλοντος. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το SANYO MIR 253. Πρέπει να σημειωθεί ότι για τον έλεγχο της θερμοκρασίας των θαλάμων ήταν τοποθετημένα μέσα σε αυτούς ηλεκτρονικά καταγραφικά θερμοκρασίας (data loggers), τα οποία καταγράφουν πληροφορίες χρόνου-θερμοκρασίας, οι οποίες μπορούν να μεταφερθούν μέσω μίας σύνδεσης σε έναν μικροϋπολογιστή.

- **Χρωματόμετρο X-rite Eye1pro Colorimeter Illumination D50 (Michigan, USA) για τη μέτρηση του χρώματος των ΤΤΙ**

Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων χρώματος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή X-rite Eye1pro Colorimeter Illumination D50 η οποία φαίνεται στις παρακάτω εικόνες.

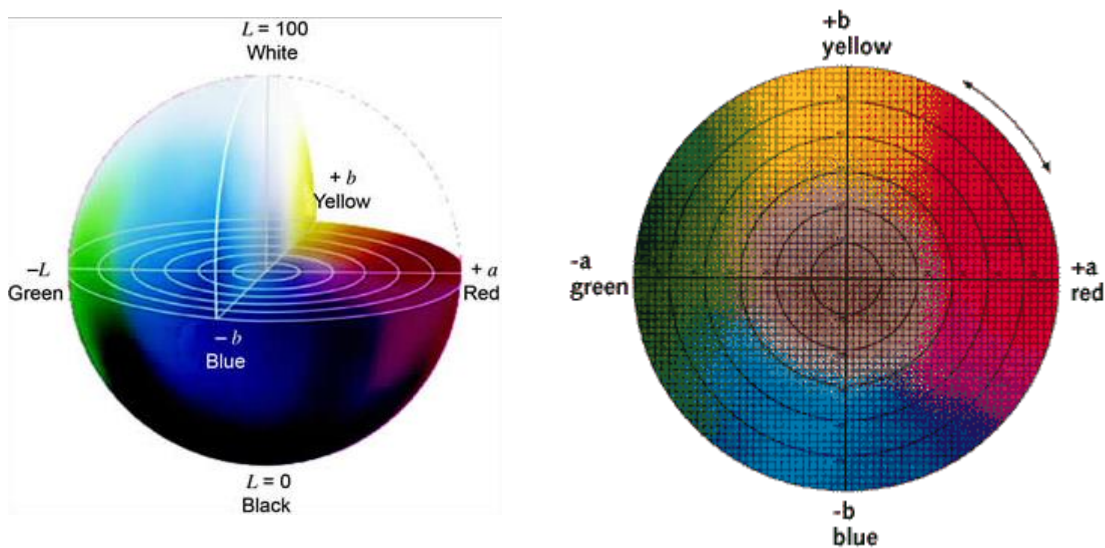


Εικόνα 4.2 Χρωματόμετρο X-rite Eye1pro



Εικόνα 4.3 Χρωματόμετρο X-rite Eye1pro και δείκτες ΤΤΙ.

Η συσκευή αυτή προσδιορίζει τις παραμέτρους L , a και b στο τριαξονικό σύστημα CIELAB. Η παράμετρος a (κυμαίνεται από -60 έως 60) όταν παίρνει αρνητικές τιμές προσδιορίζει το πράσινο χρώμα, ενώ στις θετικές τιμές προσδιορίζει το κόκκινο χρώμα. Επίσης, η παράμετρος b (κυμαίνεται από -60 έως 60) στις αρνητικές τιμές προσδιορίζει το μπλε χρώμα ενώ στις θετικές τιμές το κίτρινο χρώμα. Το L (κυμαίνεται από 0 έως 100) προσδιορίζει την φωτεινότητα του δείγματος.



Εικόνα 4.4 (α) Απεικόνιση στο χώρο των L , a και b και (β) το χρωματικό διάγραμμα a και b .

Οι παράμετροι αυτές επιτρέπουν τον υπολογισμό της συνολικής μεταβολής χρώματος (ΔC) και της συνολικής μεταβολής της οπτικής απόκρισης (ΔE), που δίνονται αντίστοιχα από τις παρακάτω σχέσεις (MacDougall, 1988):

$$\Delta C = \sqrt{(a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (4.1)$$

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (4.2)$$

4.3 Εφαρμογή επιλεγμένων ΤΤΙ για την πρόβλεψη της εναπομένουσας διάρκειας ζωής κατά τη συντήρηση στρειδιών

Βάσει των αποτελεσμάτων της κινητικής μελέτης ασφάλειας και της υποβάθμισης ποιότητας των στρειδιών, πραγματοποιήθηκε μελέτη για την επιλογή του κατάλληλου ΤΤΙ για την αντιστοίχισή του με το χρόνο ζωής του τροφίμου. Με βάση τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα που προέκυψαν για κάθε τύπο ΤΤΙ και

λαμβάνοντας υπόψιν τους χρόνους ζωής του προς μελέτη τροφίμων, προέκυψαν οι καταλληλότεροι δείκτες.

4.3.1 Πειραματική Διαδικασία

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε τέσσερις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10 και 15°C) και σε μια θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενη συνθήκη ($T_{\text{eff}}=7.4^{\circ}\text{C}$). Κατά τη διάρκεια των συγκεκριμένων πειραμάτων στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν:

- Μέτρηση της απόκρισης των ΤΠΙ σε ισοθερμοκρασιακές και μη συνθήκες
- Μέτρηση της απόκρισης των τοποθετημένων στα δείγματα ΤΠΙ
- Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου
- Μέτρηση pH
- Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων

Επίσης, πραγματοποιήθηκε επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Vibrio* spp. σε στρείδια, σε τέσσερις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (15, 20, 23 και 30°C) και σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενη συνθήκη (var).

4.3.1.1 Μέτρηση της απόκρισης των τοποθετημένων στα δείγματα ΤΠΙ

Πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των κατάλληλα επιλεγμένων ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών, οι οποίοι τοποθετήθηκαν στην συσκευασία των δειγμάτων.

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους κατάλληλους θαλάμους σταθερής και μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε κάθε θερμοκρασία και για κάθε στρείδι, γινόταν μέτρηση της μεταβολής του χρώματος των ΤΠΙς με τη χρήση χρωματόμετρου. Ύστερα από επεξεργασία των παραμέτρων του χρώματος εξήχθησαν οι συναρτήσεις απόκρισης των ΤΠΙ. Προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά και ο χρόνος ζωής των δεικτών τα οποία συσχετίστηκαν με εκείνα των παραμέτρων ποιότητας και ασφάλειας του τροφίμου.



Εικόνα 4.5 Τρυβλίο με το δείγμα μερικές μέρες μετά την τοποθέτηση ενζυμικών δεικτών ΤΠΙ

4.3.1.2 Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου

Προετοιμασία δειγμάτων στρειδιών: 100 στρείδια (*Crassostrea gigas*) πλύθηκαν, ανοίχτηκαν ασηπτικά σε laminar flow hood και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri (ένα στρείδι/τρυβλίο). Αρχικά εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένο διάλυμα 3,5% NaCl και δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην τραυματιστεί η σάρκα των στρειδιών. Μελετήθηκαν 4 διαφορετικές θερμοκρασίες: 0, 5, 10 και 15°C, οι οποίες αναγράφονταν στα τρυβλία και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους αντίστοιχους θαλάμους. Τα εξαγόμενα μαθηματικά μοντέλα επαληθεύτηκαν σε μεταβαλλόμενες συνθήκες ($T_{\text{eff}}=7.4^{\circ}\text{C}$).



Εικόνα 4.6 (a) Τα στρείδια μόλις παραδόθηκαν στο εργαστήριο απ' τον προμηθευτή και (b) τοποθετημένα σε αλατόνερο



Εικόνα 4.7 (α&β) Τα στρείδια ανοιγμένα στον απαγωγό



Εικόνα 4.8 Στρείδια τοποθετημένα σε τρυβλία Petri.

A. Ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών

Με τη μέθοδο αυτή προετοιμάστηκαν τα δείγματα με το μη επιλεκτικό υπόστρωμα PCA+NaCl (Plate Count Agar, Merck, Darmstadt, Germany), (NaCl 1%) για τον προσδιορισμό της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, και τα μη επίλεκτα υποστρώματα *Pseudomonas agar* (Oxoid, Cambridge, UK), Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC, Merck, Darmstadt, Germany) για τον προσδιορισμό ψευδομονάδων και ζυμών-μυκητών αντίστοιχα.

Για τον υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα εφαρμόστηκε η μέθοδος της επιφανειακής ανάπτυξης σε τρυβλία. Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι από ένα μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται μία αποικία και συνεπώς η μέτρηση των αποικιών δίνει τον αριθμό των μικροοργανισμών απ' όπου προήλθαν.

Δείγμα (5 g) στρειδιών φέρονται σε αποστειρωμένη πλαστική σακούλα και προστίθενται σε αυτό 45 g αποστειρωμένου διαλύματος Ringer 25% (Ringer Tablets, Merck, Darmstadt, Germany). Το μίγμα ομογενοποιείται για 1 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με τη βοήθεια κατάλληλου ομογενοποιητή (BagMixer®, Interscience, France). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL φέρονται 9 mL

διαλύματος Ringer. Από το ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται 1 mL και τοποθετείται σε έναν σωλήνα και το μείγμα αναδεύεται. Από αυτόν λαμβάνεται 1 mL και φέρεται στον επόμενο σωλήνα. Κάθε αραιώση αποτελεί υποδεκαπλάσια της προηγούμενης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου επιτευχθούν οι επιθυμητές αραιώσεις. 0,1 mL από τα δείγματα λαμβάνονται και φέρονται στην επιφάνεια κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και ακολουθεί επάλειψη με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλες τις αραιώσεις, ενώ πραγματοποιούνται διπλά δείγματα για κάθε αραιώση (Koutsoumanis et al., 2002).

Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 20°C για 5 d και σημειώνεται ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών στο δείγμα, τόσο περισσότερες αραιώσεις απαιτούνται ώστε να είναι εφικτή η καταμέτρηση αποικιών.

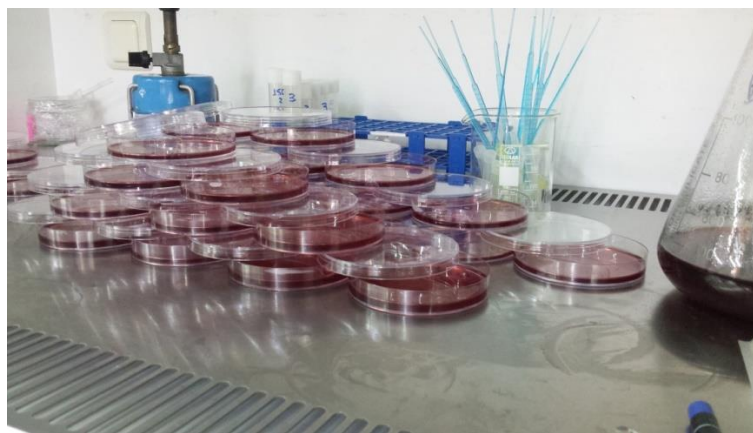
B. Ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών

Για τον προσδιορισμό των *Enterobacteriaceae* spp. σε επιλεκτικό υπόστρωμα VRBD ακολουθείται η εξής τεχνική αναερόβιας ανάπτυξης: Από το κάθε δείγμα λαμβάνεται 1 mL και τοποθετείται σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Το κατάλληλο θρεπτικό υλικό διανέμεται στα τρυβλία έως ότου καλυφθεί η επιφάνεια του τρυβλίου. Τα τρυβλία ανακινούνται προσεκτικά και το υπόστρωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί. Ακολουθεί μία δεύτερη στρώση υποστρώματος, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της πρώτης. Η διαδικασία της δεύτερης επίστρωσης εξασφαλίζει αναερόβιες συνθήκες. Για τη μέτρηση των *Enterobacteriaceae* sp. χρησιμοποιείται το μη επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD, Merck, Darmstadt, Germany) και πραγματοποιείται επώαση στους 20°C για 5 d.

Τα παράγοντα H₂S βακτήρια (*Sewanella putrefaciens*) μετρώνται σε Iron Agar, το οποίο παρασκευάζεται όπως περιγράφουν οι Gram et al. (1987) επώαση στους 25°C για 2 d.



Εικόνα 4.9 Προετοιμασία υποστρωμάτων για αποστείρωση



Εικόνα 4.10 Διασикаσία στερεοποίησης υποστρώματος VRBD

Μετά την επώαση των τρυβλίων, καταμετρούνται οι αναπτυσσόμενες αποικίες. Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιείται σε κατάλληλη αραιώση, ώστε να υπάρχουν 50-200 αποικίες ανά τρυβλίο. Λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση του δείγματος, υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών που περιέχει 1g δείγματος και μεταφράζεται σε $\log_{10} \text{cfu/g}$.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται εικόνες από τον απαγωγό μικροβιολογικής ανάλυσης και το θάλαμο αποστείρωσης που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία διεξαγωγής των πειραμάτων.



Εικόνα 4.11 (α) Απαγωγός μικροβιολογικής ανάλυσης (*laminar flow hood*) και (β) θάλαμος αποστείρωσης

4.3.1.3 Μέτρηση pH

Η μέτρηση pH (pH-meter 338, AMEL Instruments, Milan, Italy) πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποιημένο μίγμα 10% δείγματος στρειδιών σε διάλυμα Ringer, αμέσως μετά τη μικροβιολογική ανάλυση.



Εικόνα 4.12 Πεχάμετρο AMEL Instruments 338

4.3.1.4 Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων

Η οργανοληπτική αξιολόγηση της σάρκας στρειδιών έγινε ως προς την εμφάνιση και την οσμή κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους με απώτερο σκοπό τον καθορισμό του ορίου αποδοχής τους.

Για τη βαθμολόγηση χρησιμοποιήθηκε κλίμακα από το 1 έως το 9, όπου 9: φρέσκο προϊόν και 1: εμφανείς αλλοιώσεις, και ορίστηκε ως όριο αποδοχής ο βαθμός 5. Το έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου που μοιράστηκε στους δοκιμαστές παρατίθεται στο παράρτημα.

4.3.1.5 Επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Vibrio spp.* σε στρείδια

Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε επαλήθευση ενός θεωρητικού μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια των Tsironi et al., 2016, και στηρίζεται στη μελέτη που παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 4.13 Μικροβιακή ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* (TCBS Agar, Merck)

Σε δείγματα στρειδιού του είδους *Crassostrea gigas* μετρήθηκε η ανάπτυξη του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε 4 ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (15, 20, 23 και 30° C) και σε δυναμική συνθήκη (τη θερμοκρασία κατέγραψε data logger).

Σύμφωνα με την FDA (2005), οι ρυθμοί ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* σε θρεπτικό υλικό υπολογίζονται από το ακόλουθο μοντέλο (Miles et al., 1997), με τιμή ενεργότητας του νερού ίση με τη βέλτιστη τιμή $a_{w,opt}=0.985$.

$$\sqrt{k_{Vp}} = \frac{b (T - T_{min}) ((1 - \exp(c (T - T_{max}))) \sqrt{(a_w - a_{w,min}) (1 - \exp(d (a_w - a_{w,max})))})}{\sqrt{\ln(10)}}$$

(4.3)

όπου: k_{Vp} : ο ρυθμός ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* (\log_{10} per minute)

a_w : η ενεργότητα του νερού

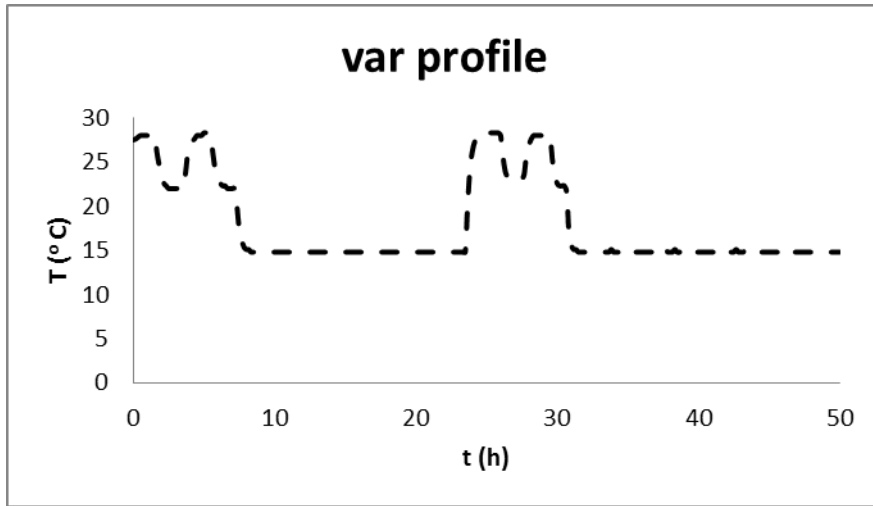
T: η θερμοκρασία σε K.

Οι εκτιμήσεις για τις παραμέτρους είναι $b=0.0356$, $c=0.34$ και $d=263.64$,

$T_{min}=278.5K$ και $T_{max}=319.6K$, $a_{w,min}=0.921$ και $a_{w,max}=0.998$, (FDA, 2005).

Οι επιστήμονες επικύρωσαν το μοντέλο από τη σύγκριση των προβλεπόμενων μοντέλων με τα παρατηρούμενα ποσοστά σύμφωνα με οκτώ άλλες μελέτες ανάπτυξης θρεπτικού υλικού που λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία. Η ανάπτυξη του παθογόνου *V. parahaemolyticus* στα στρείδια σε μία ισοθερμική συνθήκη αποθήκευσης ($T=26^{\circ}\text{C}$) μοντελοποιήθηκε από τους Gooch et al. (2002). Ο ρυθμός ανάπτυξης υπολογίστηκε από τους Miles et al. (1997) και το προβλεπόμενο μοντέλο στους 26°C ήταν $k_{\text{broth},26^{\circ}\text{C}}=0.871 \text{ h}^{-1}$, ο οποίος είναι περίπου 5 φορές μεγαλύτερος από το αντίστοιχο ποσοστό που αναφέρθηκε από τους Gooch et al. (2002) στα στρείδια ($k_{\text{oysters},26^{\circ}\text{C}}=0.17 \text{ h}^{-1}$). Ωστόσο, η εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης υπολογίστηκε διαιρώντας την προβλεπόμενη τιμή για το θρεπτικό υλικό με τον παράγοντα 5. Η εξάρτηση της θερμοκρασία με το ρυθμό ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* περιγράφεται από την εξίσωση Arrhenius. Βάση υπολογισμών για το εύρος θερμοκρασίας $15\text{-}30^{\circ}\text{C}$ και θερμοκρασία αναφοράς $T_{\text{ref}}=15^{\circ}\text{C}$, η ενέργεια ενεργοποίησης εκτιμήθηκε ίση με $E_a=97.8\pm 10.1 \text{ kJ/mol}$, και ο ρυθμός ανάπτυξης $k_{\text{ref},T_{\text{ref}}}=0.031\pm 0.008 \text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.931$) (Tsironi et al., 2016).

Για την επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου που παρουσιάστηκε παραπάνω, στρείδια (*Grassostrea gigas*) ομογενοποιήθηκαν και εμβολιάστηκαν με καλλιέργεια *V. parahaemolyticus* σε φορτίο $2.5 \log_{\text{cfu/g}}$. Για τον εμβολιασμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κλινική καλλιέργεια του παθογόνου και παρασκευάστηκε το εμβόλιο αρχικού φορτίου $6 \log_{\text{cfu/mL}}$ μετά από δύο διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε tryptic soy broth εμπλουτισμένο με 2.5% NaCl με επώαση για 18-20 ώρες στους 35°C (Zarei et al., 2014). 1 g των ομογενοποιημένων δειγμάτων συντηρήθηκε σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες και συντηρήθηκαν ισοθερμοκρασία 15, 20, 23 και 30°C και σε δυναμικές συνθήκες σύμφωνα με το χρονο-θερμοκρασιακό σενάριο που παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα. Το φορτίο του *V. parahaemolyticus* προσδιορίστηκε με τη μέθοδο επιφανειακής επίστρωσης σε TCBS agar (Merch) 18-24 ώρες στους 35°C .



Σχήμα 4.1 Θερμοκρασιακή απεικόνιση της μεταβαλλόμενης μελετούμενης συνθήκης

5. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΤΙ

5.1 Επεξεργασία απόκρισης των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών

Η διαδικασία επεξεργασίας των πειραματικών αποτελεσμάτων αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

5.1.1 Καθορισμός της συνάρτησης $F(X_C)$ των ενζυμικών ΤΤΙ

Στα ενζυμικά ΤΤΙ, η μεταβολή χρώματος εκφράζεται ως:

$$X = \text{norm}(a + b) = \frac{(a+b)_{\max} - (a+b)_{\min}}{(a+b)_{\max} - (a+b)_{\min}} \quad (5.1)$$

όπου a και b : συντεταγμένες του χρώματος που ελήφθησαν από το χρωματόμετρο X-rite (Giannakourou et al., 2004).

Η εξίσωση (5.1) δείχνει την απόκριση του δείκτη, X , η οποία όταν σχεδιαστεί σαν συνάρτηση του χρόνου έχει σιγμοειδή μορφή. Το κινητικό αυτό μοντέλο είναι δύο παραμέτρων και αποδείχτηκε ότι περιγράφει καλύτερα την κινητική των ενζυμικών ΤΤΙ. Στην περίπτωση αυτή η **συνάρτηση απόκρισης** είναι:

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_1 - t}{k_2}\right)} \quad (5.2)$$

όπου k_1 και k_2 : σταθερές των ρυθμών μεταβολής χρώματος των ενζυμικών ΤΤΙ.

5.1.2 Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών k_A και E_A των ενζυμικών ΤΤΙ

Για τον προσδιορισμό των κινητικών χαρακτηριστικών των ενζυμικών ΤΤΙ πραγματοποιήθηκε κατάλληλη επεξεργασία της σιγμοειδούς καμπύλης $F(X_C)$ στο υπολογιστικό πρόγραμμα Sigmaplot 10.0, οπότε προέκυψαν οι σταθερές k_1 και k_2 για κάθε θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα. Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων των ενζυμικών ΤΤΙ ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Με χρήση της εξίσωσης Arrhenius, η εξίσωση (5.2) γίνεται της μορφής:

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1ref} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2ref} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (5.3)$$

Τέλος, με χρήση της εξίσωσης (5.3) και εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης με τη βοήθεια του προγράμματος Systat 10.2 προέκυψαν η ενέργεια ενεργοποίησης E_A και οι δύο σταθερές του ρυθμού απόκρισης, k_{1ref} και k_{2ref} .

5.1.3 Έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων

Ο έλεγχος της αξιοπιστίας του κινητικού μοντέλου πραγματοποιείται μέσω της επεξεργασίας των μετρήσεων του πειράματος που πραγματοποιείται σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (variable temperature conditions). Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται καθώς έχει αναφερθεί σε αρκετές περιπτώσεις επίδραση του θερμοκρασιακού ιστορικού στον παρατηρούμενο ρυθμό δράσης ή απόκρισης των ΤΤΙ (Taoukis & Labuza, 1989).

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες επιλέχθηκε η μεταβολή θερμοκρασίας μεταξύ 5 και 10°C ($T_{eff}=7.4^\circ\text{C}$). Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα μεταβολής θερμοκρασίας συναρτήσει του χρόνου.

Αρχικά, σύμφωνα με το χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ και τη σχέση (1.18) υπολογίστηκε η T_{eff} , δηλαδή η θερμοκρασία που θα είχε την ίδια επίδραση στο ΤΤΙ με τις προαναφερόμενες θερμοκρασίες του χρονο-θερμοκρασιακού κύκλου. Στη συνέχεια, μέσω της τιμής της T_{eff} και με χρήση της σχέσης Arrhenius υπολογίστηκαν οι προβλεπόμενες (θεωρητικές) σταθερές του ρυθμού απόκρισης. Με σύγκριση των προβλεπόμενων και των πειραματικών σταθερών απόκρισης των ΤΤΙ πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων των διαφόρων ΤΤΙ.

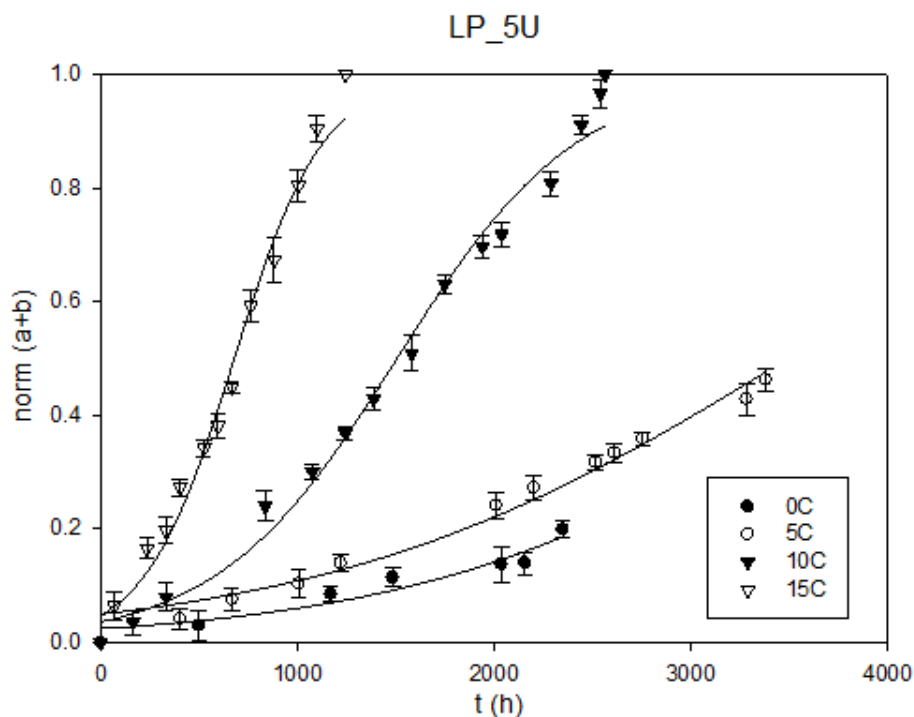
5.2 Κινητική Μελέτη της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ

Οι ενζυμικοί χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν είναι οι εξής: LP_5U, LP_10U, LP_20U, LP_50U, LP_100U, LP_200U, LP_400U, LP_600U.

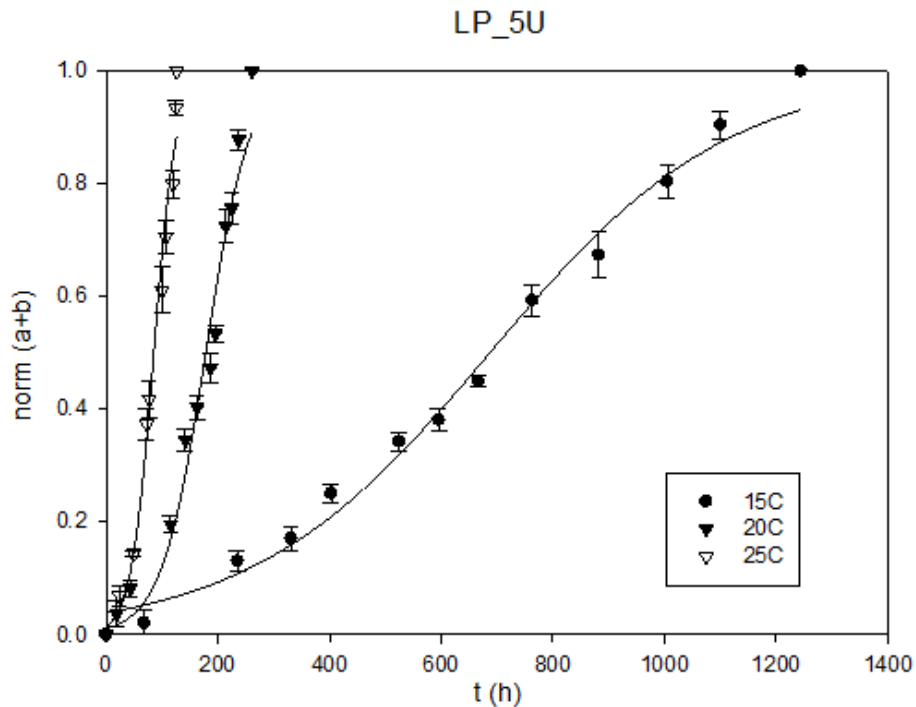
Πραγματοποιήθηκαν ισοθερμοκρασιακά πειράματα σε 7 διαφορετικές θερμοκρασίες: 0°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C και σε κάθε δείκτη διαφορετικής περιεκτικότητας ενζύμου (Units) εφαρμόστηκαν 5 επαναλήψεις. Σύμφωνα με τις πειραματικές μετρήσεις του χρώματος, όπως μετρήθηκαν από το χρωματόμετρο X-rite (λύφθησαν οι τιμές των παραμέτρων L, a, και b), κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα απόκρισης του δείκτη $\text{norm}(a+b)$ (X) συναρτήσει του χρόνου και κατασκευάσθηκε η συνάρτηση απόκρισης $F(X_c)$ για κάθε προς μελέτη θερμοκρασία. Έπειτα έγινε ο προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών E_A , $k_{1\text{ref}}$, $k_{2\text{ref}}$ των ΤΤΙ με θερμοκρασία αναφοράς $T_{\text{ref}}=15^\circ\text{C}=288,15\text{K}$.

5.2.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_5U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C, 5°C, 10°C, 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C, 20°C, 25°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.1 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_5U και για θερμοκρασίες 0°C, 5°C, 10°C, 15°C.



Σχήμα 5.2 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_5U και για θερμοκρασίες 15°C, 20°C, 25°C.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διάγραμμα, η μεταβολή της χρωματικής εξέλιξης του ενζυμικού δείκτη LP_5U στους 0°C και 5°C δεν έχει ολοκληρωθεί. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν έχουν προκύψει μέσω προεκβολής.

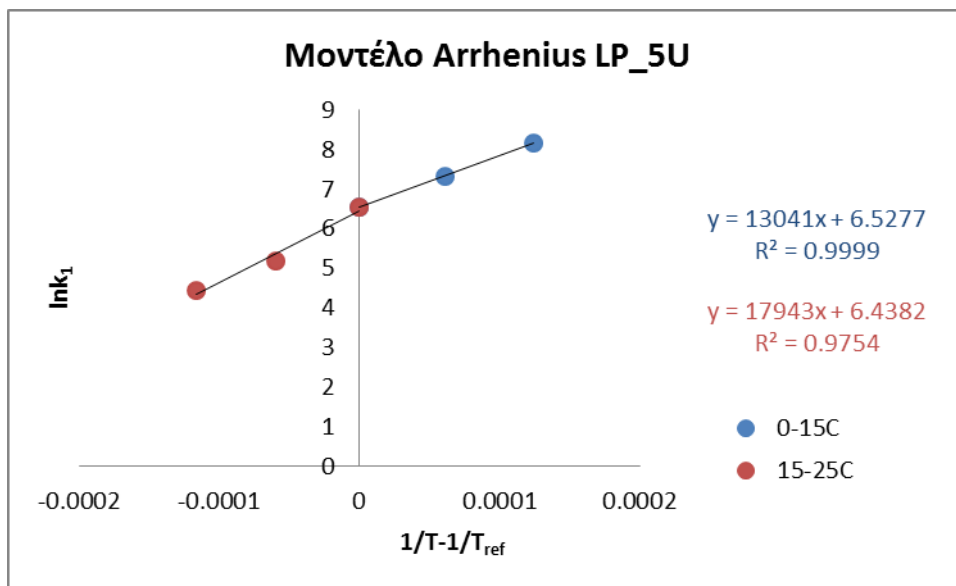
- **Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_5U**

Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

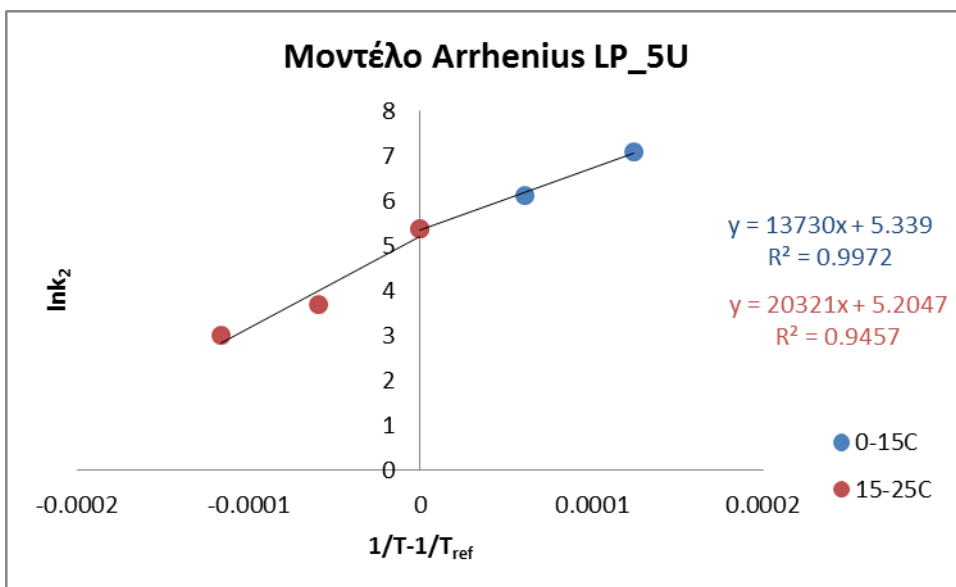
Πίνακας 5.1 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_5U.

T (°C)	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	3907.0	1057.0	0.927
5	3495.3	1185.2	0.979
10	1507.0	458.7	0.986
15	686.9	213.9	0.990
20	178.5	39.4	0.971
25	85.4	20.2	0.977

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_5U. Λόγω του μεγάλου θερμοκρασιακού εύρους που μελετήθηκε (0-30°C) και λόγω της διαφορετικής θερμοκρασιακής εξάρτησης των ρυθμών μεταβολής χρώματος των ΤΤΙ, η εξίσωση Arrhenius εφαρμόστηκε ξεχωριστά στα θερμοκρασιακά εύρη 0-15°C και 15-30°C. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=15^\circ\text{C}$. Ξεχωριστή εφαρμογή Arrhenius για τα προαναφερθέντα θερμοκρασιακά εύρη έχει πραγματοποιηθεί και για τις ποσότητες ενζύμου που παρουσιάζονται στα επόμενα υποκεφάλαια.



Σχήμα 5.3 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_5U



Σχήμα 5.4 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_5U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_5U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.2 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_5U ($T_{ref}=15^{\circ}C$)

	$0 \leq T \leq 15^{\circ}C$	$15 < T \leq 25^{\circ}C$
Ea (kJ/mol)	107.6	151.7
k_{1ref} (h)	678.5	603.8
k_{2ref} (h)	224.3	196.7
R²	0.986	0.885

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίστηκε ο χρόνος λήξης του ενζυμικού

δείκτη LP_5U από την εξίσωση $f(x) = \frac{a}{1 + e^{\frac{k_1 - k_2}{k_2} x}}$ για $f(x) = \text{norm}(a+b) = 0.8$ και $a=1$.

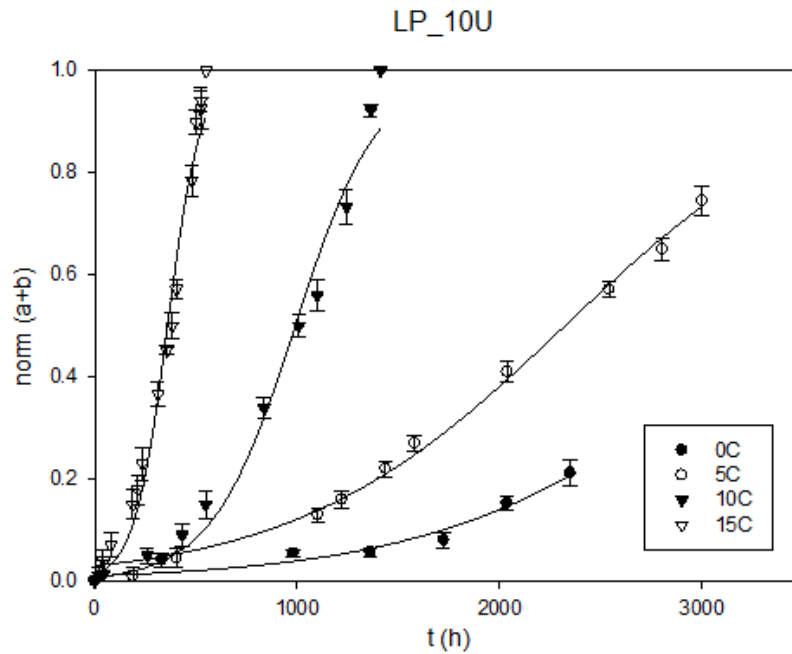
Πίνακας 5.3 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_5U

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	224	5376
5	214	5136
10	89.3	2143
15	41.0	984
20	9.72	233
25	4.72	113

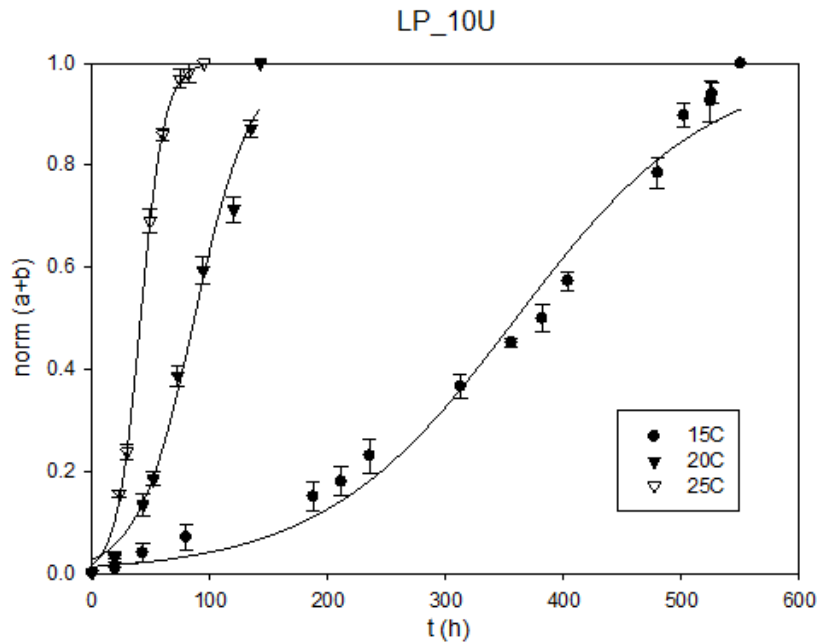
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστή προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη.

5.2.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_10U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.5 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_10U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C , 15°C .



Σχήμα 5.6 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_10U και για θερμοκρασίες 15°C, 20°C, 25°C.

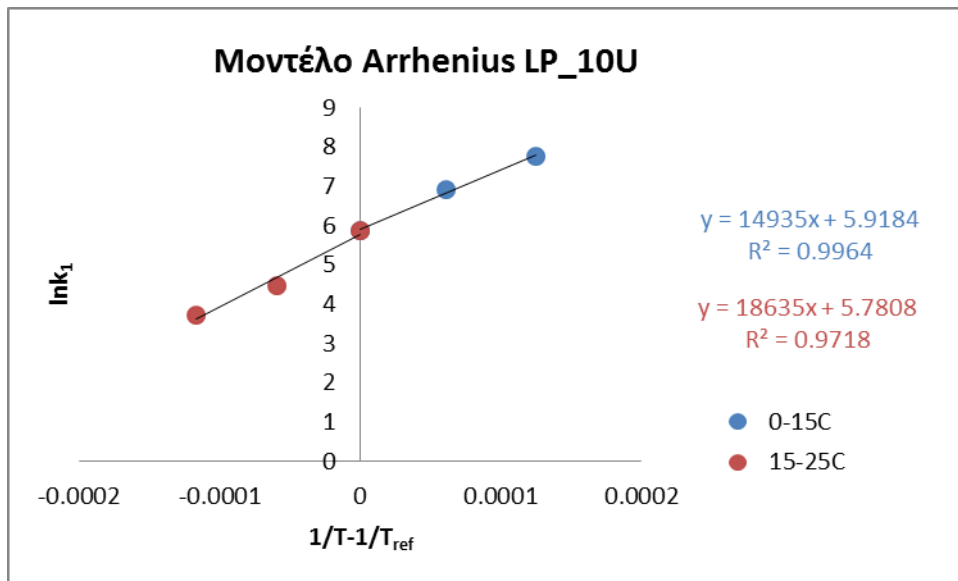
Σύμφωνα με τα παραπάνω διάγραμμα, η μεταβολή της χρωματικής εξέλιξης του ενζυμικού δείκτη LP_10U στους 0°C και 5°C δεν έχει ολοκληρωθεί. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν έχουν προκύψει μέσω προεκβολής.

- **Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_10U**

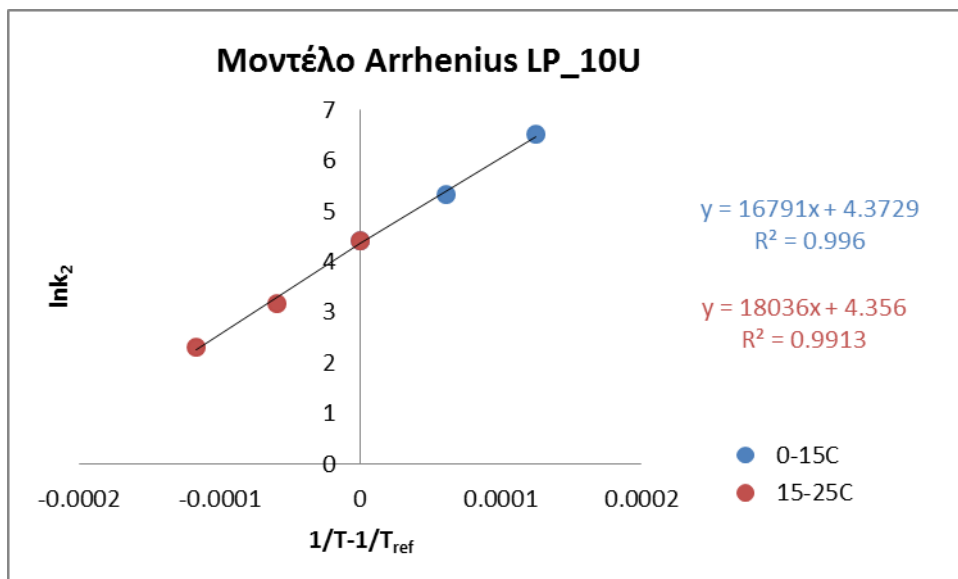
Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_10U.

T (°C)	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	3333.7	735.7	0.952
5	2322.1	668.8	0.995
10	990.4	205.4	0.980
15	359.8	82.4	0.984
20	86.9	23.9	0.981
25	41.3	10.1	0.999



Σχήμα 5.7 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_10U



Σχήμα 5.8 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_10U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_10U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.5 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_10U ($T_{ref}=15^\circ\text{C}$)

	$0 \leq T \leq 15^\circ\text{C}$	$15 < T \leq 25^\circ\text{C}$
Ea (kJ/mol)	125.3	164.9
k_{1ref} (h^{-1})	362.0	339.5
k_{2ref} (h^{-1})	94.1	88.3
R^2	0.974	0.946

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται ο χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη

LP_10U από την εξίσωση $f(x) = \frac{a}{1+e^{k_1 - \frac{t}{k_2}}}$ για $f(x)=\text{norm}(a+b)=0.8$ και $a=1$.

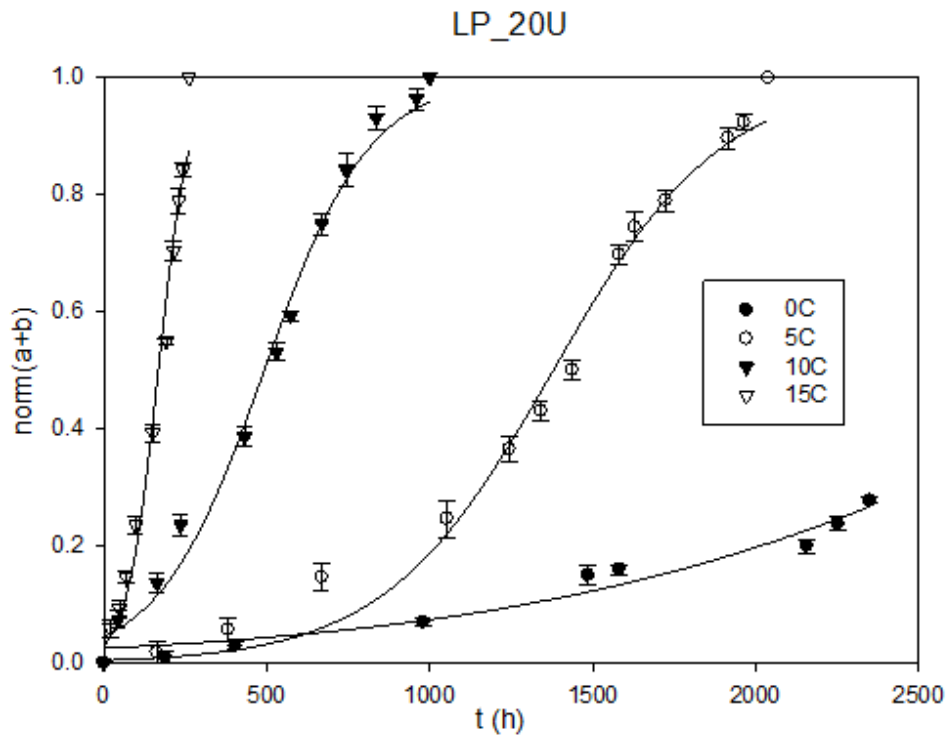
Πίνακας 5.6 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_10U

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	181	4344
5	135	3240
10	53.1	1274
15	19.8	475
20	5.00	120
25	2.30	55.2

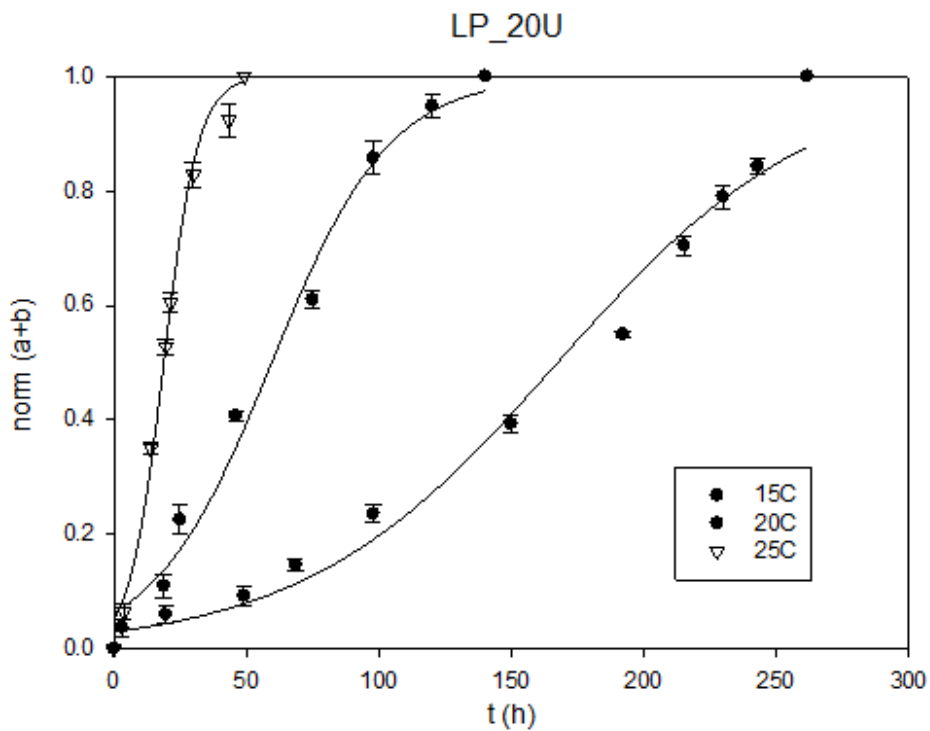
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστή προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη.

5.2.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_20U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C, 5°C, 10°C, 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C, 20°C, 25°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.9 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_20U και για θερμοκρασίες 0°C, 5°C, 10°C, 15°C.



Σχήμα 5.10 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_20U και για θερμοκρασίες 15°C, 20°C, 25°C.

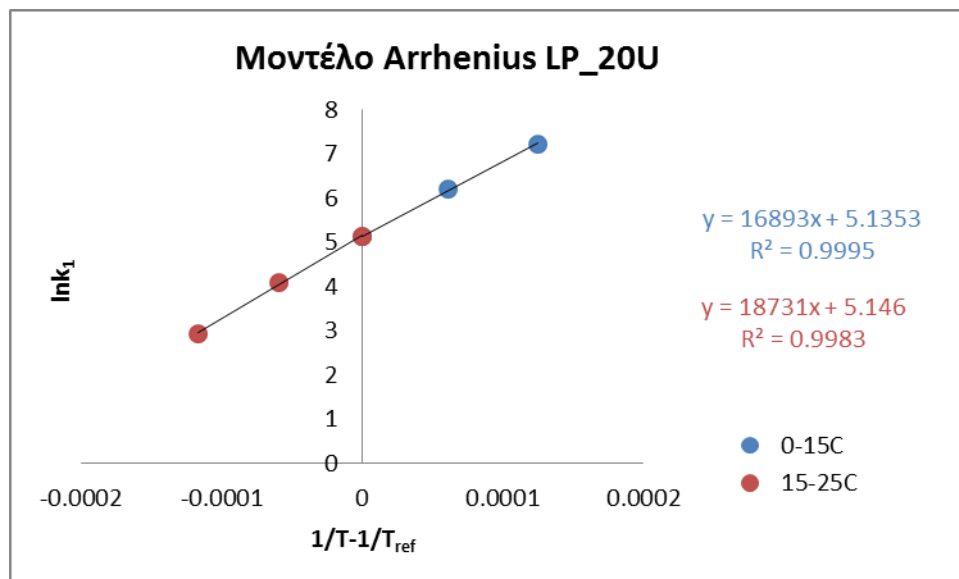
Σύμφωνα με τα παραπάνω διάγραμμα, η μεταβολή της χρωματικής εξέλιξης του ενζυμικού δείκτη LP_20U στους 0°C δεν έχει ολοκληρωθεί. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν έχουν προκύψει μέσω προεκβολής.

- Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_20U

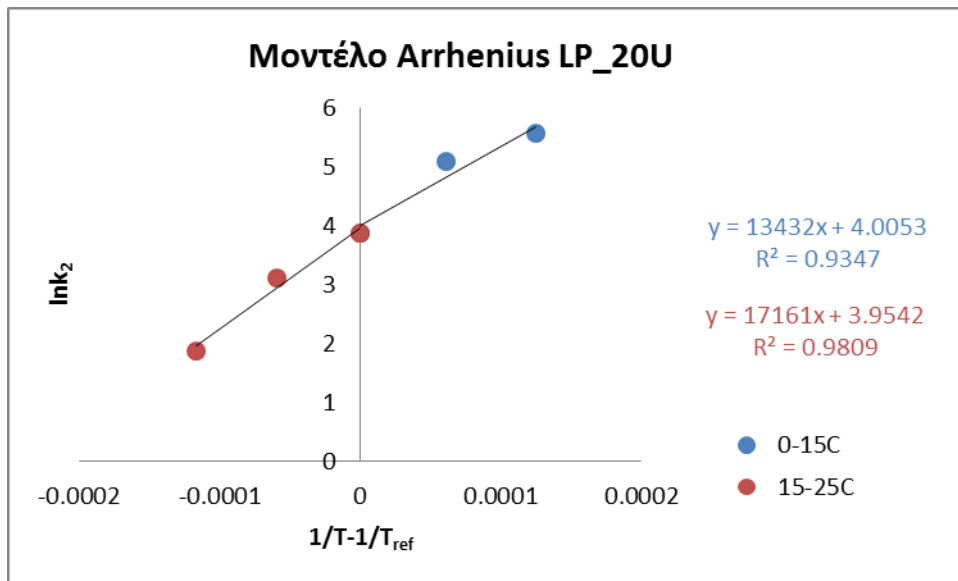
Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.7 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_20U.

T (°C)	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	3250.2	892.8	0.957
5	1378.9	258.7	0.988
10	492.3	161.5	0.991
15	167.5	48.2	0.980
20	59.7	22.2	0.988
25	18.9	6.5	0.992



Σχήμα 5.11 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_20U



Σχήμα 5.12 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_20U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_20U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.8 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_20U ($T_{ref}=15^{\circ}\text{C}$)

	$0 \leq T \leq 15^{\circ}\text{C}$	$15 < T \leq 25^{\circ}\text{C}$
Ea (kJ/mol)	135.0	152.8
k_{1ref} (h)	174.9	165.5
k_{2ref} (h)	49.3	54.9
R²	0.975	0.981

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται ο χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη

LP_20U από την εξίσωση $f(x) = \frac{a}{1 + e^{\frac{k_1 - t}{k_2}}}$ για $f(x) = \text{norm}(a+b) = 0.8$ και $a=1$.

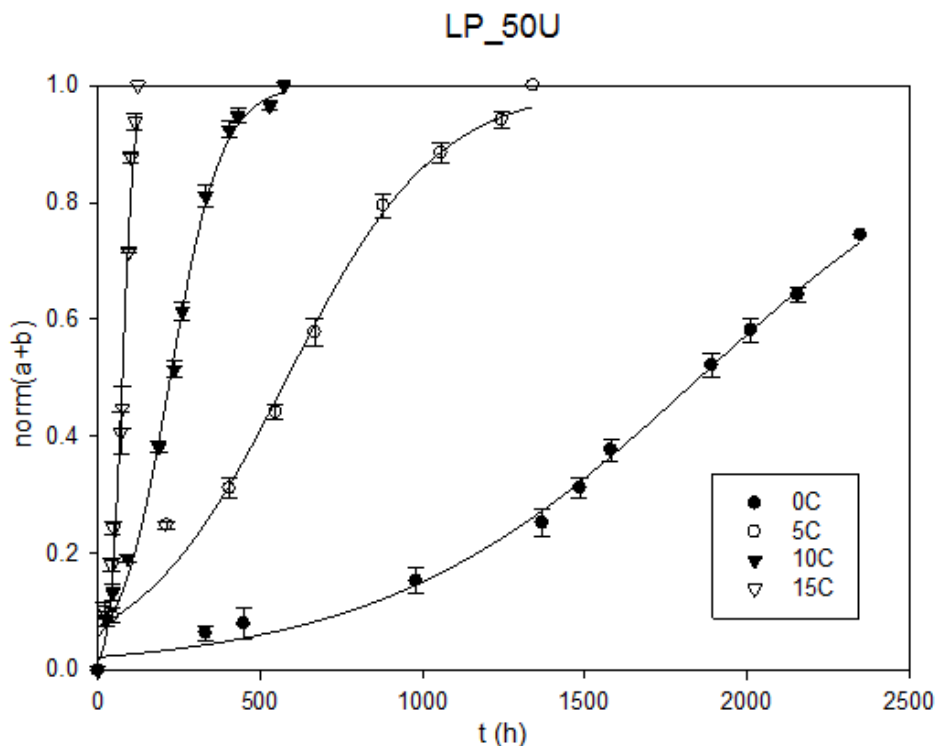
Πίνακας 5.9 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_20U

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	187	4488
5	72.4	1738
10	29.8	715
15	9.76	234
20	3.77	90.5
25	1.16	27.8

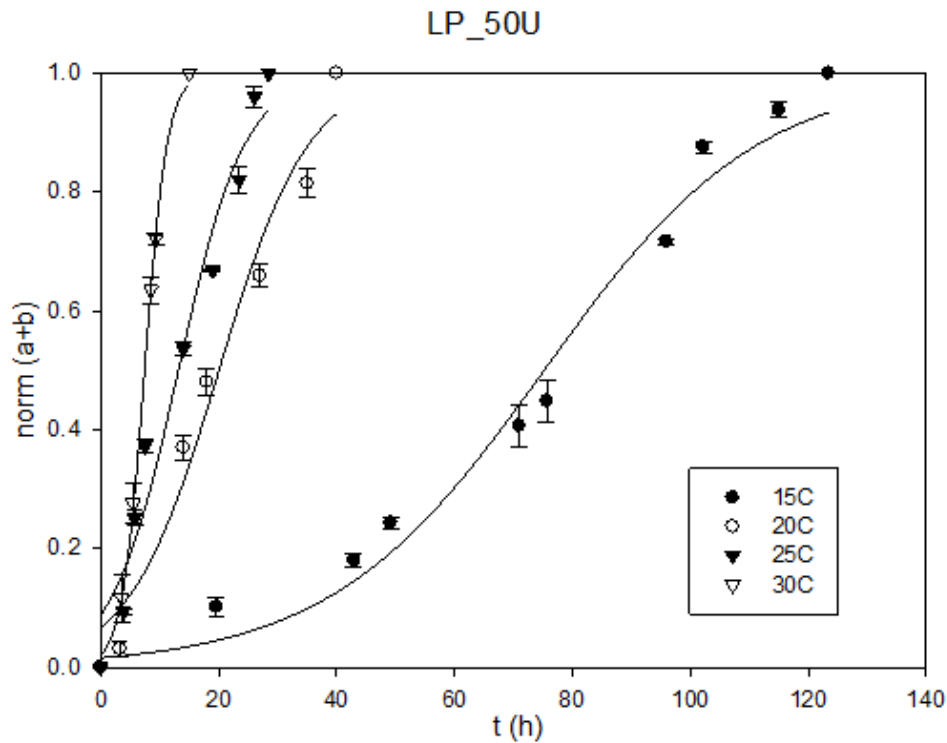
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστή προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη.

5.2.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_50U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C , 30°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.13 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_50U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C , 15°C .



Σχήμα 5.14 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_50U και για θερμοκρασίες 15°C, 20°C, 25°C, 30°C.

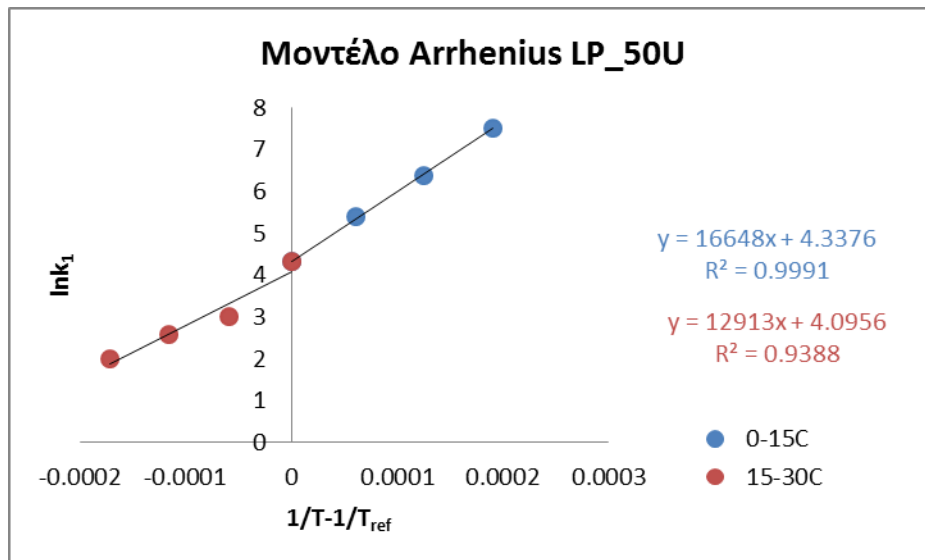
Σύμφωνα με τα παραπάνω διάγραμμα, η μεταβολή της χρωματικής εξέλιξης του ενζυμικού δείκτη LP_50U στους 0°C δεν έχει ολοκληρωθεί. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν έχουν προκύψει μέσω προεκβολής.

- Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_50U

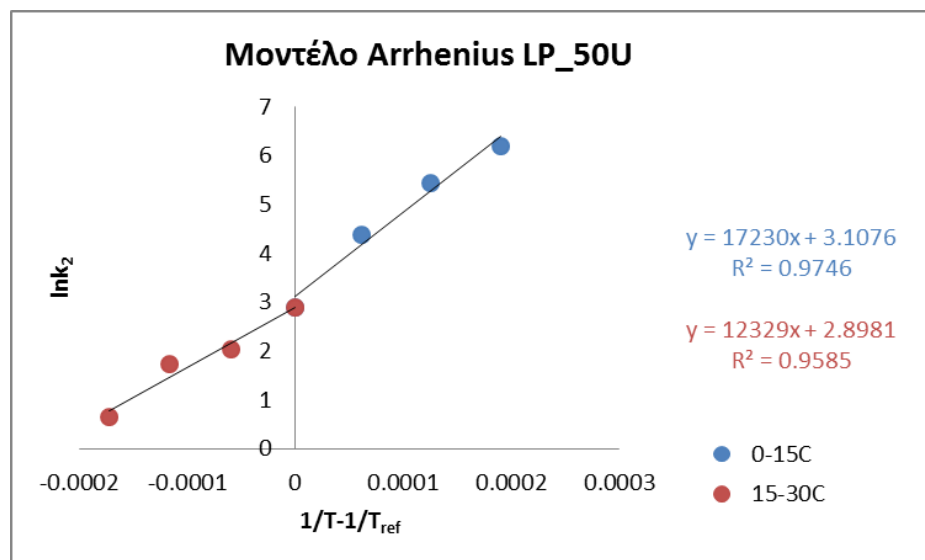
Με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.10.

Πίνακας 5.10 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_50U.

T (°C)	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	1852.9	494.0	0.996
5	583.4	231.0	0.985
10	223.0	79.3	0.994
15	75.1	18.2	0.976
20	20.0	7.6	0.970
25	13.2	5.6	0.953
30	7.4	1.9	0.998



Σχήμα 5.15 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_50U



Σχήμα 5.16 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_50U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_50U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.11 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_50U ($T_{ref}=15^{\circ}\text{C}$)

	$0 \leq T \leq 15^{\circ}\text{C}$	$15 < T \leq 25^{\circ}\text{C}$
Ea (kJ/mol)	140.2	110.1
k_{1ref} (h^{-1})	74.9	60.9
k_{2ref} (h^{-1})	23.2	24.0
R^2	0.979	0.856

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται ο χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη

LP_50U από την εξίσωση $f(x) = \frac{a}{1+e^{\frac{k_1-t}{k_2}}}$ για $f(x)=\text{norm}(a+b)=0.8$ και $a=1$.

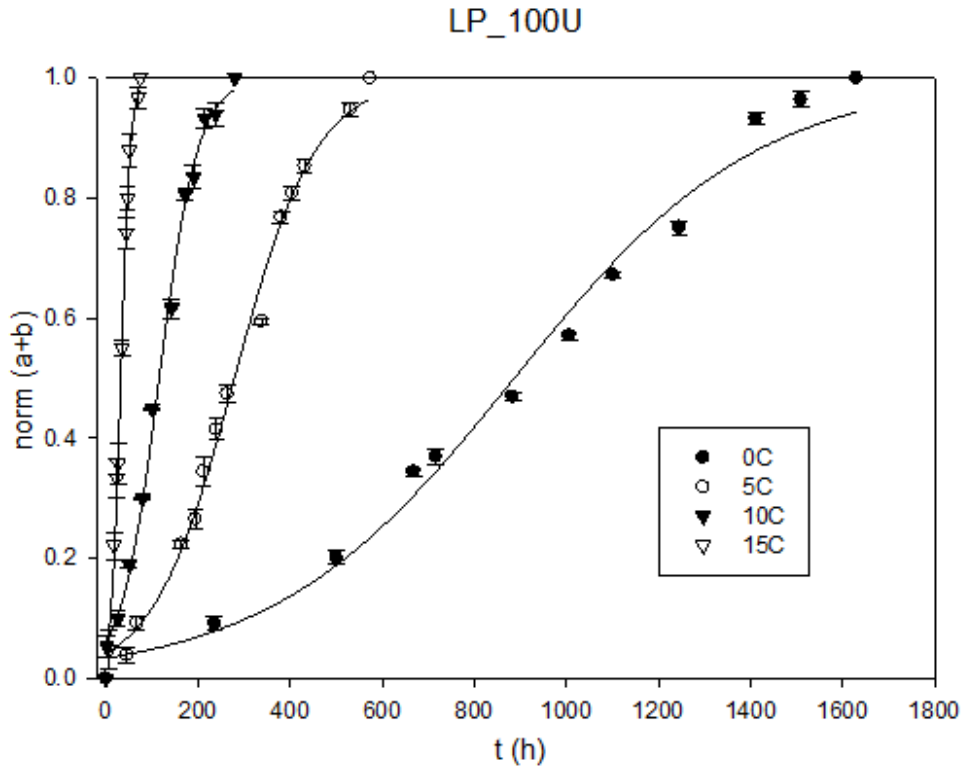
Πίνακας 5.12 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_50U

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	106	2544
5	37.7	905
10	13.9	334
15	4.18	100
20	1.28	30.7
25	0.873	21.0
30	0.423	10.2

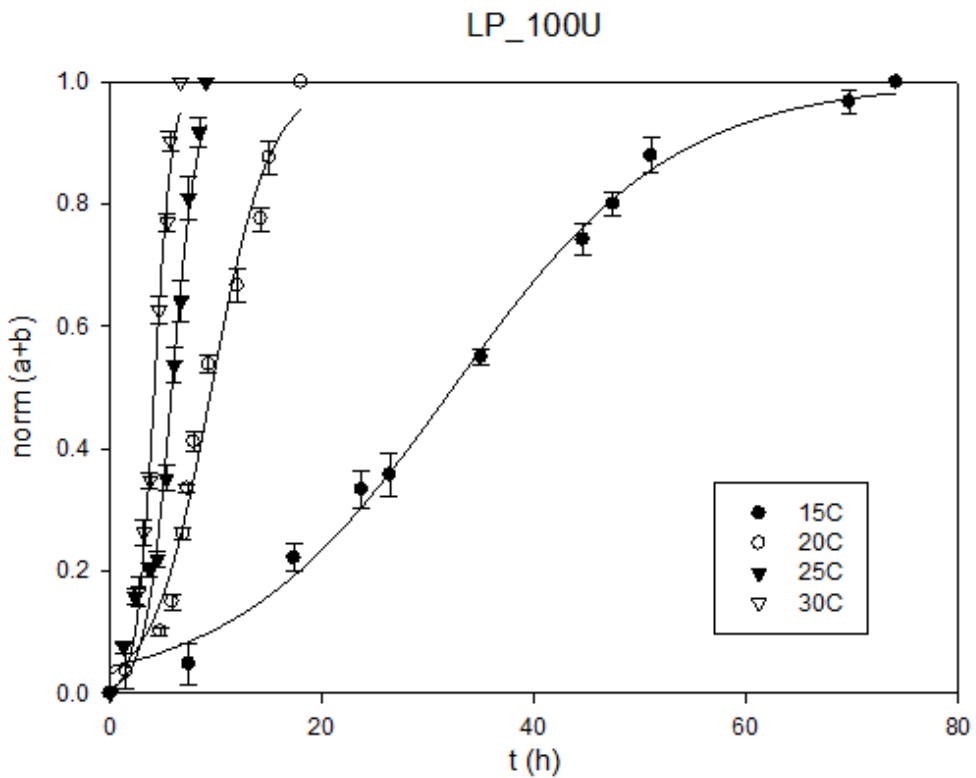
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστή προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη.

5.2.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_100U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσεως του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C, 5°C, 10°C, 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C, 20°C, 25°C, 30°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.17 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U και για θερμοκρασίες 0°C, 5°C, 10°C, 15°C.



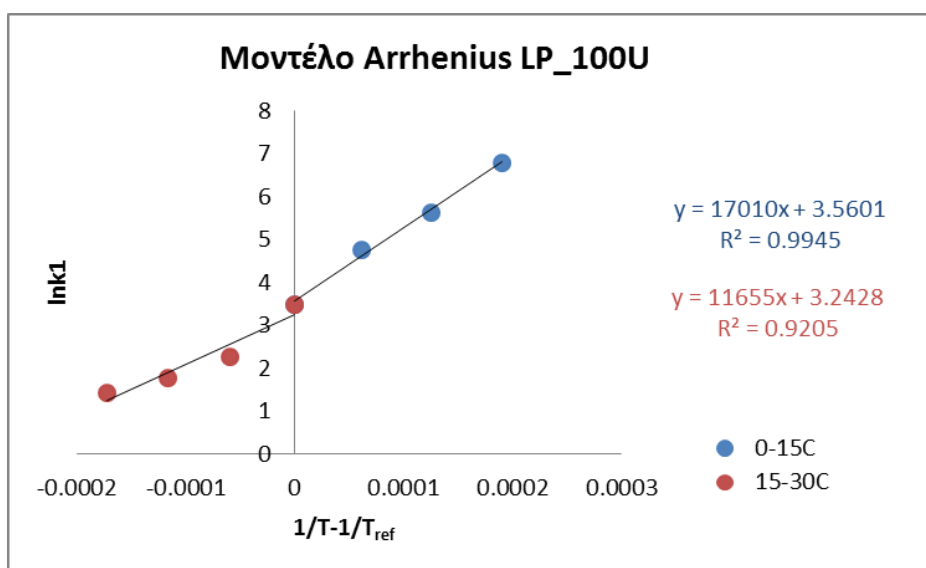
Σχήμα 5.18 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U και για θερμοκρασίες 15°C, 20°C, 25°C, 30°C.

- Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_100U

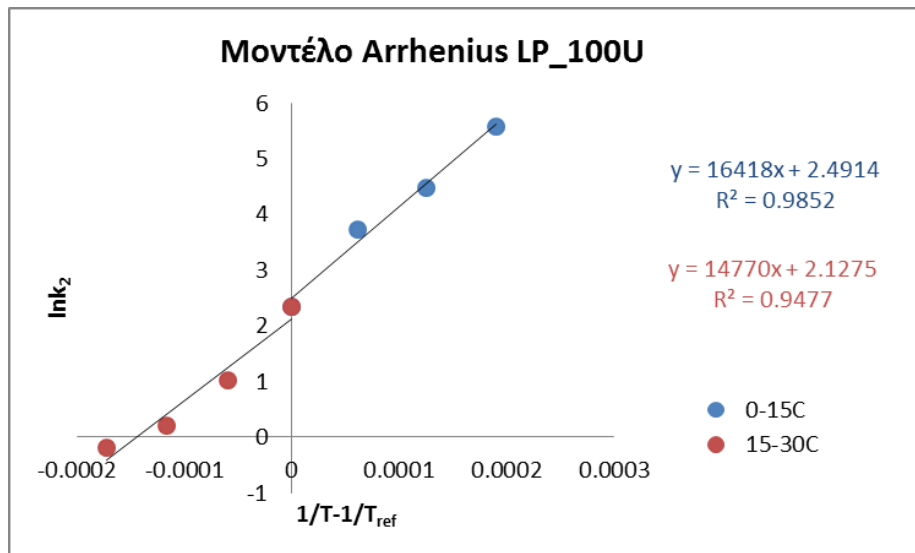
Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.13.

Πίνακας 5.13 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_100U.

T (°C)	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	886.5	264.8	0.984
5	279.0	88.8	0.993
10	115.8	41.9	0.994
15	32.4	10.5	0.994
20	9.6	2.8	0.982
25	5.8	1.2	0.975
30	4.2	0.8	0.987



Σχήμα 5.19 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_100U



Σχήμα 5.20 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_100U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_100U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.14 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_100U ($T_{ref}=15^{\circ}\text{C}$)

	$0 \leq T \leq 15^{\circ}\text{C}$	$15 < T \leq 25^{\circ}\text{C}$
E_a (kJ/mol)	141.6	95.1
k_{1ref} (h)	34.3	23.8
k_{2ref} (h)	11.2	7.7
R^2	0.987	0.850

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται ο χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη

LP_100U από την εξίσωση $f(x) = \frac{a}{1 + e^{k_1 - \frac{t}{k_2}}}$ για $f(x) = \text{norm}(a+b) = 0.8$ και $a=1$.

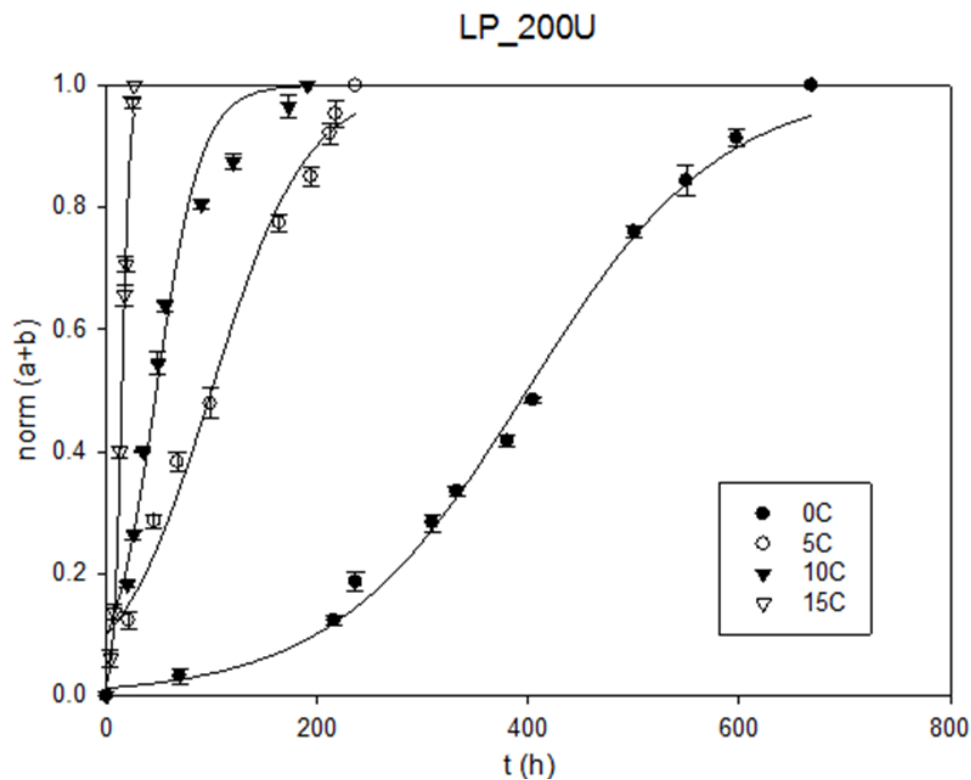
Πίνακας 5.15 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_100U

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	52.2	1253
5	16.8	403
10	7.24	174
15	1.95	46.8
20	0.564	13.5
25	0.317	7.61
30	0.223	5.35

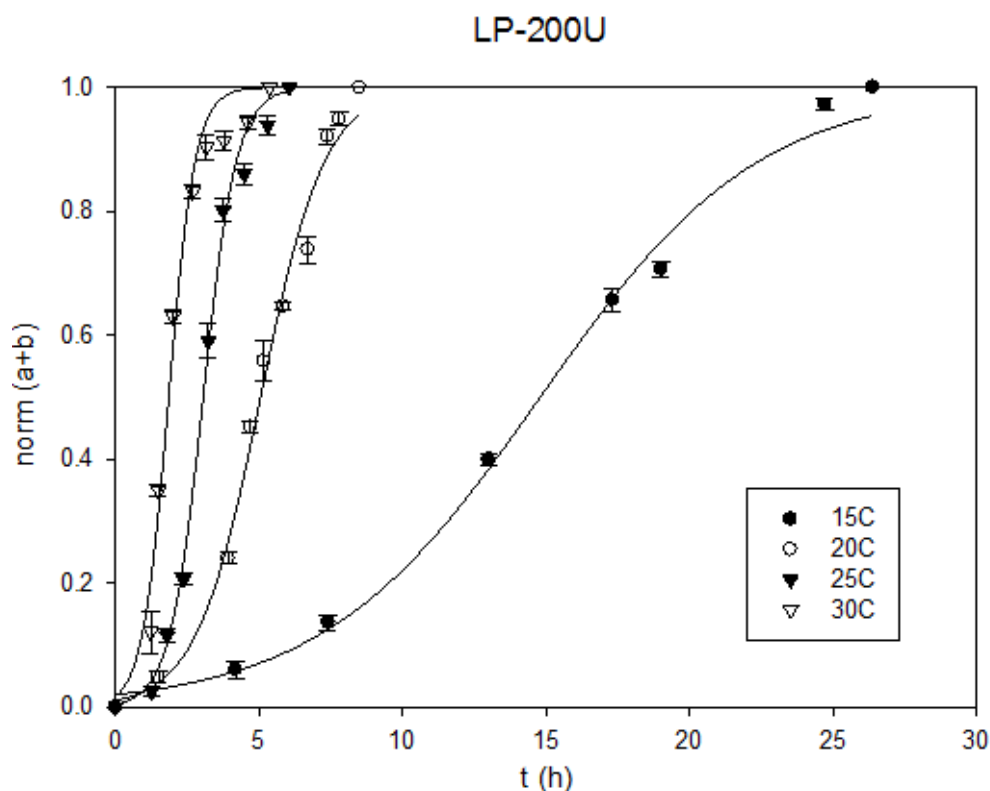
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστή προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη.

5.2.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_200U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C , 30°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.21 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_200U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C , 15°C .



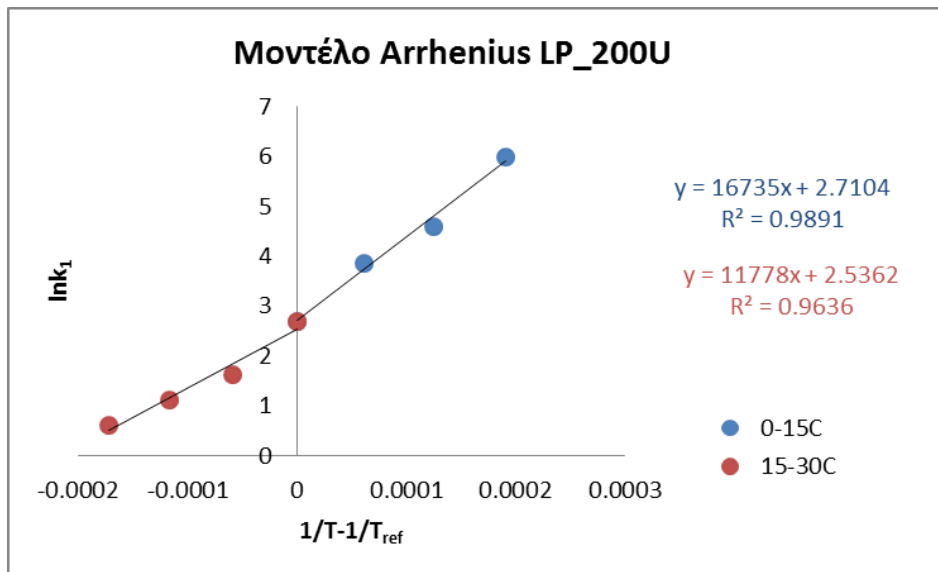
Σχήμα 5.22 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_200U και για θερμοκρασίες 15°C, 20°C, 25°C, 30°C.

- Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_200U

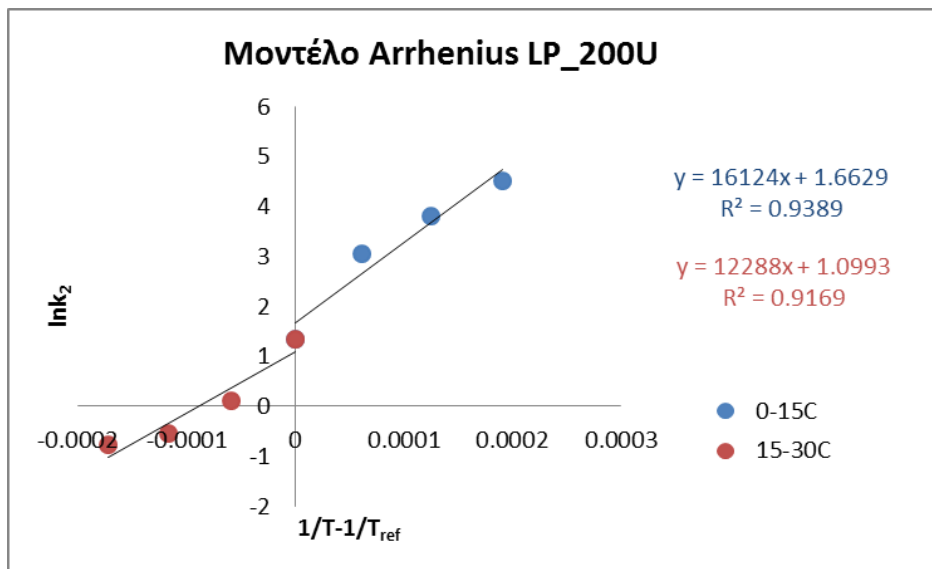
Με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.16.

Πίνακας 5.16 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_200U.

T (°C)	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	398.8	91.3	0.995
5	99.7	45.2	0.982
10	47.5	21.0	0.973
15	14.8	3.8	0.994
20	5.1	1.1	0.988
25	3.1	0.58	0.994
30	1.9	0.46	0.981



Σχήμα 5.23 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_200U



Σχήμα 5.24 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_200U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_200U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.17 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_200U ($T_{ref}=15^\circ\text{C}$)

	0<T≤15°C	15<T≤25°C
Ea (kJ/mol)	142.6	92.7
k_{1ref} (h)	14.6	11.1
k_{2ref} (h)	4.6	2.7
R²	0.955	0.923

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται ο χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη

LP_200U από την εξίσωση $f(x) = \frac{a}{1 + e^{\frac{k_1 - k_2}{t}}}$ για $f(x) = \text{norm}(a+b) = 0.8$ και $a=1$.

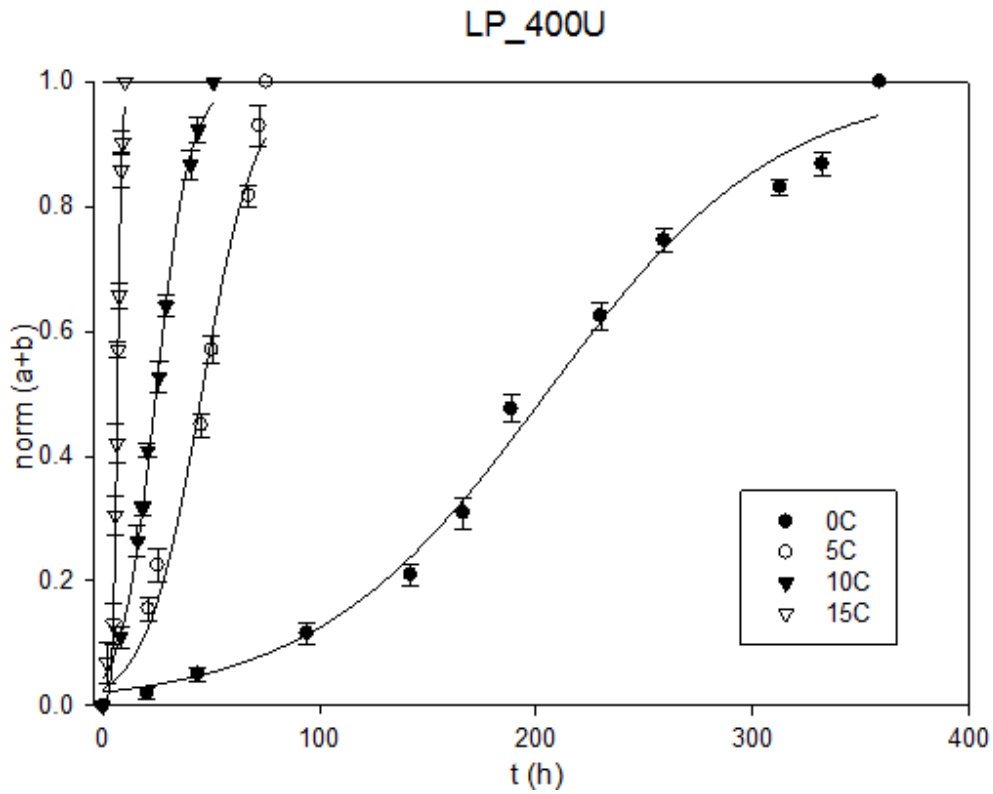
Πίνακας 5.18 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_200U

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	21.9	526
5	6.76	162
10	3.21	77.0
15	0.845	20.3
20	0.276	6.62
25	0.161	3.86
30	0.104	2.50

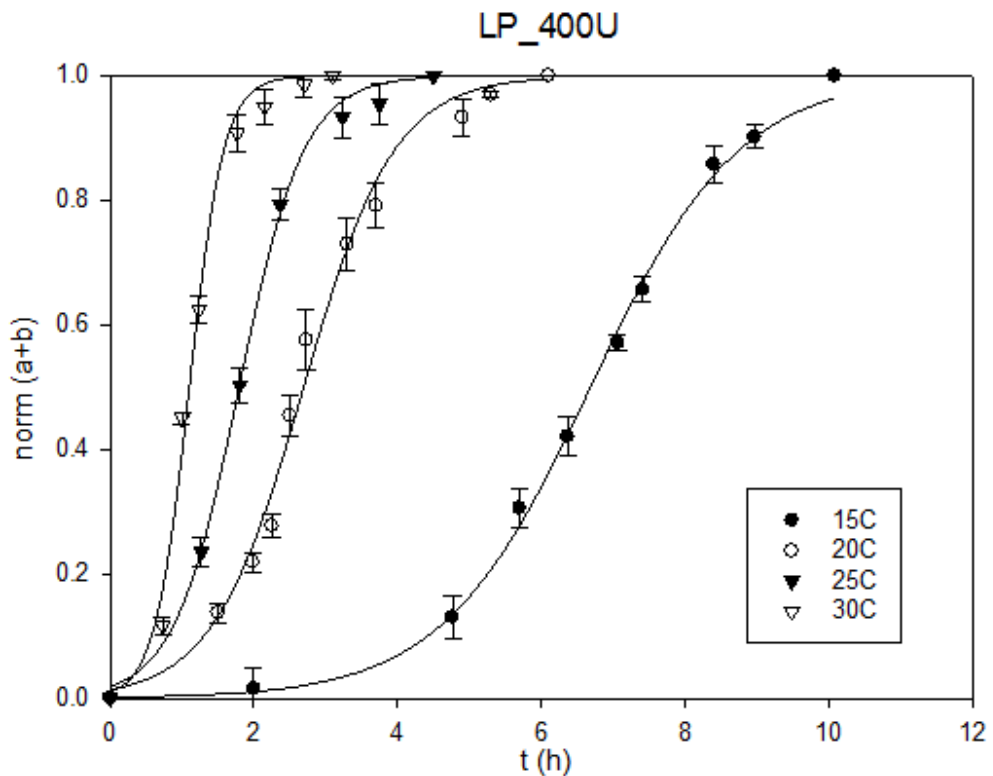
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστή προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη.

5.2.7 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_400U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C, 5°C, 10°C, 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C, 20°C, 25°C, 30°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.25 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_400U και για θερμοκρασίες 0°C, 5°C, 10°C, 15°C.



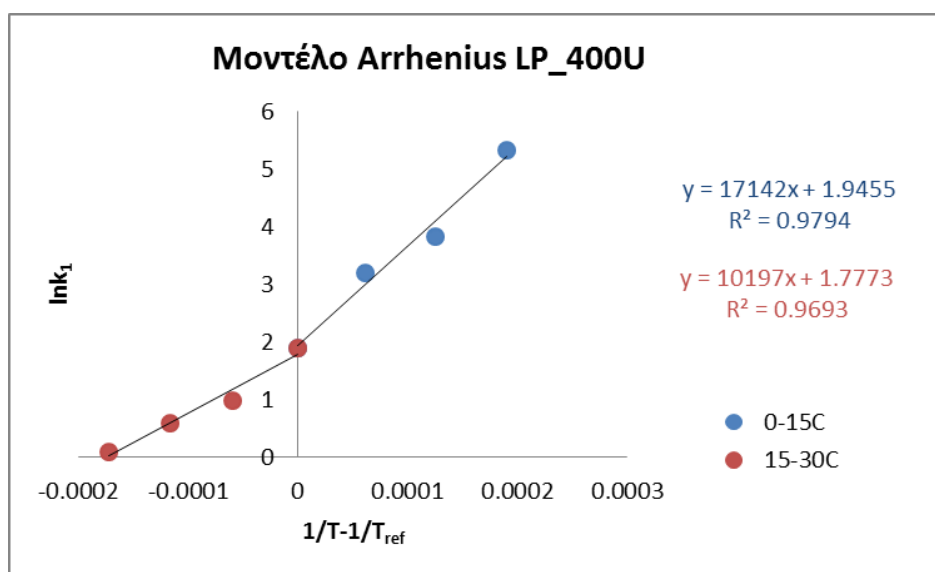
Σχήμα 5.26 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_400U και για θερμοκρασίες 15°C, 20°C, 25°C, 30°C.

- Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_400U

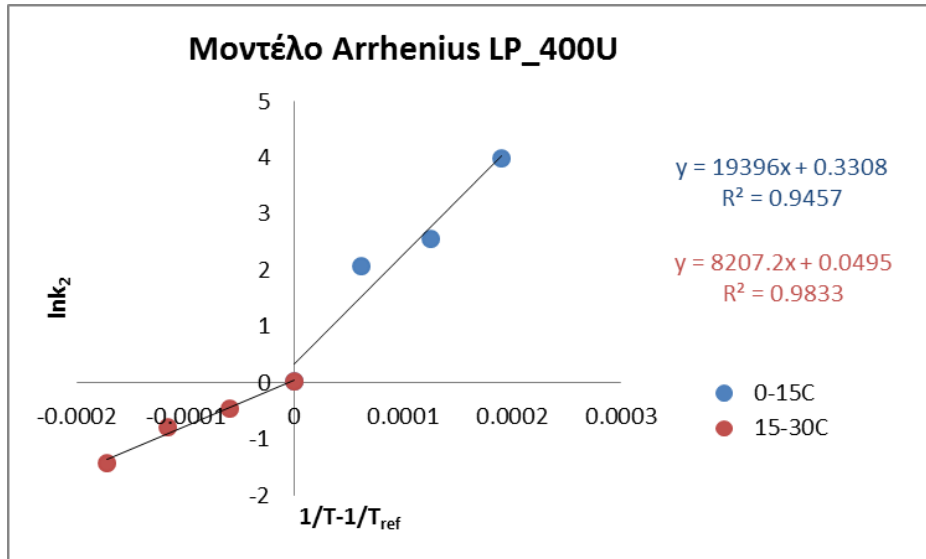
Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.19.

Πίνακας 5.19 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_400U.

T (°C)	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	204.6	53.8	0.992
5	45.6	12.7	0.982
10	24.5	7.9	0.996
15	6.7	1.0	0.998
20	2.7	0.63	0.991
25	1.8	0.45	0.998
30	1.1	0.24	0.992



Σχήμα 5.27 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_400U



Σχήμα 5.28 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_400U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_400U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.20 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_400U ($T_{ref}=15^\circ\text{C}$)

	$0 \leq T \leq 15^\circ\text{C}$	$15 < T \leq 25^\circ\text{C}$
Ea (kJ/mol)	145.5	87.1
k_{1ref} (h)	6.3	6.0
k_{2ref} (h)	1.7	1.5
R²	0.890	0.939

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται ο χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη

LP_400U από την εξίσωση $f(x) = \frac{a}{1 + e^{k_1 - \frac{t}{k_2}}}$ για $f(x) = \text{norm}(a+b) = 0.8$ και $a=1$.

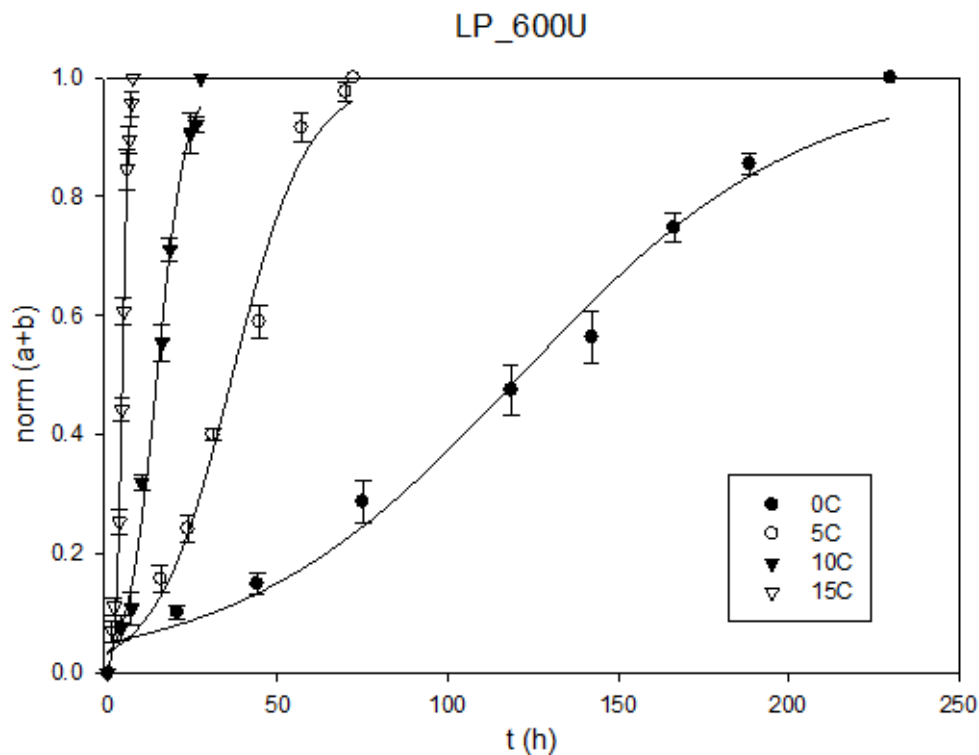
Πίνακας 5.21 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_400U

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	11.6	278
5	2.64	63.4
10	1.48	35.5
15	0.338	8.11
20	0.148	3.55
25	0.101	2.42
30	0.060	1.44

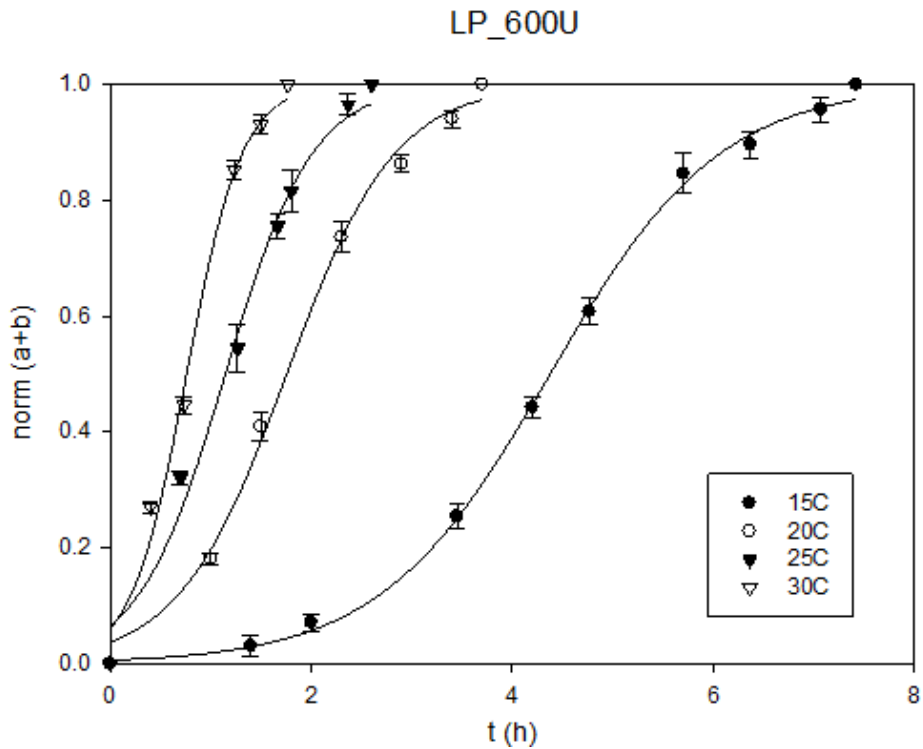
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστή προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη.

5.2.8 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_600U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (h) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C , 30°C) ξεχωριστά.



Σχήμα 5.29 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_600U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C , 15°C .



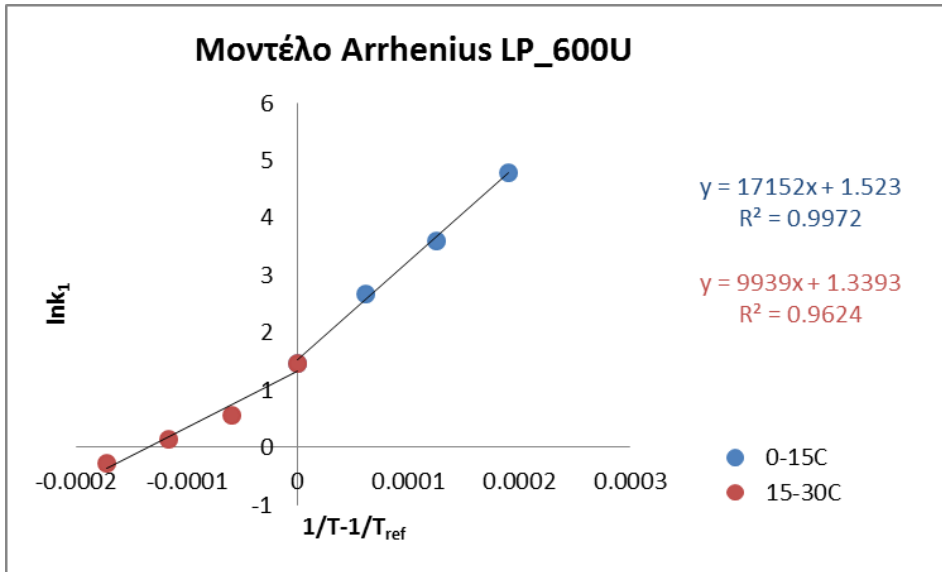
Σχήμα 5.30 Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_600U και για θερμοκρασίες 15°C , 20°C , 25°C , 30°C .

- Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_600U

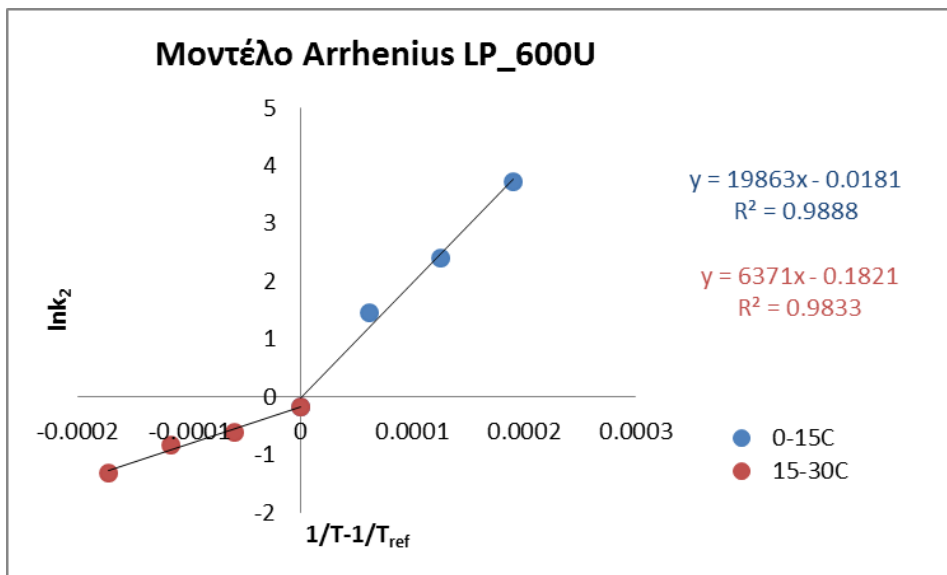
Με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.22.

Πίνακας 5.22 Κινητικά χαρακτηριστικά ενζυμικού δείκτη LP_600U.

$T (^{\circ}\text{C})$	k_1 (h)	k_2 (h)	R^2
0	121.4	41.4	0.987
5	36.7	11.1	0.982
10	14.5	4.3	0.990
15	4.4	0.85	0.995
20	1.8	0.54	0.995
25	1.2	0.43	0.981
30	0.76	0.27	0.983



Σχήμα 5.31 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_600U



Σχήμα 5.32 Γραμμικές προσαρμογές του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP_600U

Με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_600U που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.23 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_600U ($T_{ref}=15^\circ\text{C}$)

	$0 \leq T \leq 15^\circ\text{C}$	$15 < T \leq 25^\circ\text{C}$
Ea (kJ/mol)	146.4	85.1
k_{1ref} (h)	4.4	3.9
k_{2ref} (h)	1.2	1.2
R²	0.974	0.955

Στη συνέχεια, για κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται ο χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη

$$LP_{600U} \text{ από την εξίσωση } f(x) = \frac{a}{1+e^{\frac{k_1-t}{k_2}}} \text{ για } f(x)=\text{norm}(a+b)=0.8 \text{ και } a=1.$$

Πίνακας 5.24 Χρόνος λήξης ενζυμικού δείκτη LP_{600U}

T (°C)	response time (d)	response time (h)
0	7.45	179
5	2.17	52.1
10	0.851	20.4
15	0.231	5.54
20	0.104	2.50
25	0.073	1.75
30	0.047	1.13

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης του ΤΤΙ παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστής προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος του δείκτη LP και με την αύξηση θερμοκρασίας μειώνεται ο χρόνος λήξης του ενζυμικού δείκτη. Στους επόμενους πίνακες παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα κινητικά χαρακτηριστικά και οι διάρκειες ζωής όλων των ενζυμικών ΤΤΙ για τα δύο διαφορετικά θερμοκρασιακά εύρη που μελετήθηκαν (μελετήθηκαν τα εύρη 0-15°C και 15-30°C λόγω της διαφορετικής θερμοκρασιακής εξάρτησης των ρυθμών μεταβολής χρώματος των ΤΤΙ).

Πίνακας 5.25 Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των ενζυμικών δεικτών ενζυμικών ΤΤΙ για το θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C ($T_{ref}=15^\circ C$)

ΤΤΙ	E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (h)	k_{2ref} (h)	R^2
LP_5U	107.6	678.5	224.3	0.986
LP_10U	125.3	362.0	94.1	0.974
LP_20U	135.0	174.9	49.3	0.975
LP_50U	140.2	74.9	23.2	0.979
LP_100U	141.6	34.3	11.2	0.987
LP_200U	142.6	14.6	4.6	0.955
LP_400U	145.5	6.3	1.7	0.890
LP_600U	146.4	4.4	1.2	0.974

5. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΤΙ

Πίνακας 5.26 Ενέργειες ενεργοποίησης και πειραματικές διάρκειες ζωής των ενζυμικών ΤΤΙ για το θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C ($T_{ref}=15^{\circ}C$)

Τύπος ενζυμικού ΤΤΙ	E_A (kJ/mol)	Πειραματική διάρκεια ζωής του κάθε δείκτη σε (d)			
		0°C	5°C	10°C	15°C
LP_5U	107.6	224	214	89.3	41.0
LP_10U	125.3	181	135	53.1	19.8
LP_20U	135.0	187	72.4	29.8	9.76
LP_50U	140.2	106	37.7	13.9	4.18
LP_100U	141.6	52.2	16.8	7.24	1.95
LP_200U	142.6	21.9	6.76	3.21	0.836
LP_400U	145	11.60	2.63	1.48	0.338
LP_600U	146	7.45	2.17	0.851	0.231

Πίνακας 5.27 Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των ενζυμικών δεικτών ενζυμικών ΤΤΙ για το θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C ($T_{ref}=15^{\circ}C$)

ΤΤΙ	E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (h)	k_{2ref} (h)	R^2
LP_5U	151.7	603.8	196.7	0.885
LP_10U	164.9	339.5	88.3	0.946
LP_20U	152.8	165.5	54.9	0.981
LP_50U	110.1	60.9	24.0	0.856
LP_100U	95.1	23.8	7.7	0.850
LP_200U	92.7	11.1	2.7	0.923
LP_400U	87.1	6.0	1.5	0.939
LP_600U	85.1	3.9	1.2	0.955

Πίνακας 5.28 Ενέργειες ενεργοποίησης και πειραματικές διάρκειες ζωής των ενζυμικών ΤΤΙ για για το θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C ($T_{ref}=15^{\circ}C$)

Τύπος ενζυμικού ΤΤΙ	E_A (kJ/mol)	Πειραματική διάρκεια ζωής του κάθε δείκτη σε (d)			
		15°C	20°C	25°C	30°C
LP_5U	152	41.0	9.72	4.72	-
LP_10U	165	19.8	5.00	2.30	-
LP_20U	153	9.76	3.77	1.16	-
LP_50U	110	4.18	1.28	0.873	0.423
LP_100U	95.1	1.95	0.56	0.317	0.223
LP_200U	92.7	0.836	0.276	0.161	0.104
LP_400U	87.1	0.338	0.148	0.101	0.060
LP_600U	85.1	0.231	0.104	0.073	0.047

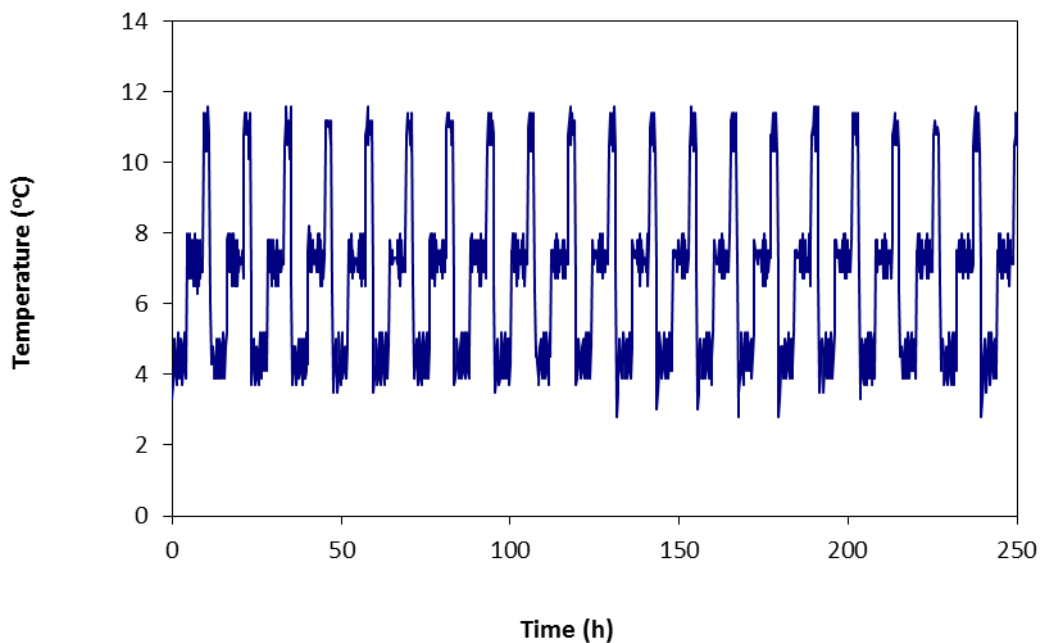
Από τους παραπάνω πίνακες προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα και παρατηρήσεις:

- Όλα τα ΤΤΙ έχουν υψηλό συντελεστή προσαρμογής R^2 , το οποίο αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.
- Και στα δύο θερμοκρασικά εύρη όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές του ρυθμού απόκρισης των ΤΤΙ k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΤΙ, τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση του ρυθμού μεταβολής χρώματος.
- Και στα δύο θερμοκρασικά εύρη όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΤΙ, μειώνεται και η διάρκεια ζωής του, αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου, τόσο πιο ταχεία θα είναι η ενζυμική αντίδραση.
- Για τις χαμηλές θερμοκρασίες (0-15°C) η Ενέργεια Ενεργοποίησης E_A φάνηκε να αντιστοιχεί σε τιμή ίση με 143.4 kJ/mol (Εξίσωση 5.8). Ωστόσο, οι δείκτες χαμηλής συγκέντρωσης ενζύμου (LP_5U και LP_10U) παρουσιάζουν απόκλιση από την εκτιμώμενη τιμή της Ενέργειας Ενεργοποίησης γιατί η μεταβολή της χρωματικής εξέλιξής τους στους 0°C και 5°C δεν είχε ολοκληρωθεί και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν μέσω προεκβολής. Για το θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C η τιμή της Ενέργειας Ενεργοποίησης E_A φάνηκε να αντιστοιχεί σε τιμή ίση με 105.8 kJ/mol (Εξίσωση 5.9).
- Για τις υψηλές θερμοκρασίες, η διαφορά που παρουσιάζεται στην τιμή της Ενέργειας Ενεργοποίησης στα εύρη συγκέντρωσης ενζύμου 5-20 Units και 50-600 Units οφείλεται στο διαφορετικό θερμοκρασιακό εύρος βάση του οποίου υπολογίστηκαν οι τιμές (15-25°C και 15-30°C).
- Μετά από αποθήκευση των ενζυμικών δεικτών LP με χαμηλή συγκέντρωση ενζύμου (5-20 Units) σε θερμοκρασία 30°C, παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της χρωματικής εξέλιξης των δεικτών, πιθανώς λόγω μερικής απενεργοποίησης του περιεχόμενου στο ΤΤΙ ένζυμο. Για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων δεικτών δεν παρουσιάζονται.

5.2.9 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονο - θερμοκρασιακού προφίλ για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U

Για τη μελέτη της αξιοπιστίας του κινητικού μοντέλου των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP, πραγματοποιήθηκε μελέτη της απόκρισης του ενζυμικού δείκτη LP_100U σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η μέση θερμοκρασιακή κατανομή (var) που κατέγραψε το καταγραφικό θερμοκρασίας (data logger) κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος εναλλασσόμενου χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ για το δείκτη LP_100U.



Σχήμα 5.33 Χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ (var) για τον ενζυμικό δείκτη LP_50U

Σύμφωνα με το παραπάνω χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ και με τη χρήση της E_A , υπολογίστηκε η τιμή της T_{eff} :

$$T_{eff} = \left(\frac{E_A}{R}\right) \left(\frac{1}{\ln\left(\frac{\sum k_i}{\sum t_i}\right)}\right) \quad (5.4)$$

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας την T_{eff} και τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_100U (E_A , k_{1ref} και k_{2ref}), υπολογίζονται οι προβλεπόμενες σταθερές τους ρυθμού απόκρισης k_{1pred} και k_{2pred} μέσω της σχέσης:

$$k_{pred} = k_{ref} e^{\left[\left(\frac{E_A}{R} \right) \left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right]} \quad (5.5)$$

με $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}=277.15\text{K}$ και $R=8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$

Πραγματοποιήθηκε γραμμική παλινδρομική ανάλυση (Regression) για διάστημα εμπιστοσύνης 95% (εξαρτημένη μεταβλητή θεωρήθηκε η $\ln k$ και ανεξάρτητη η $(1/T)-(1/T_{ref})$) στο Excel και με τη χρήση της εξίσωσης Arrhenius (5.5) υπολογίστηκαν οι θεωρητικές τιμές ρυθμών απόκρισης (k_{1pred} , k_{2pred}), καθώς και οι ελάχιστες και μέγιστες προβλεπόμενες τιμές των σταθερών αυτών (k_{1pred_min} , k_{2pred_min} , k_{1pred_max} και k_{2pred_max}). Χρησιμοποιώντας τις τιμές που προέκυψαν και την εξίσωση (5.6) εκτιμήθηκαν η προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη αλλά και η ελάχιστη και μέγιστη τιμή της ($F(x)_{pred}$, $F(x)_{pred_min}$ και $F(x)_{pred_max}$). Τέλος, οι πειραματικές τιμές συγκρίθηκαν με τις προβλεπόμενες.

$$F(x)_{pred} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{k_1 - t}{k_2} \right)}} \quad (5.6) \text{ με } F(x) = \text{norm}(a+b)$$

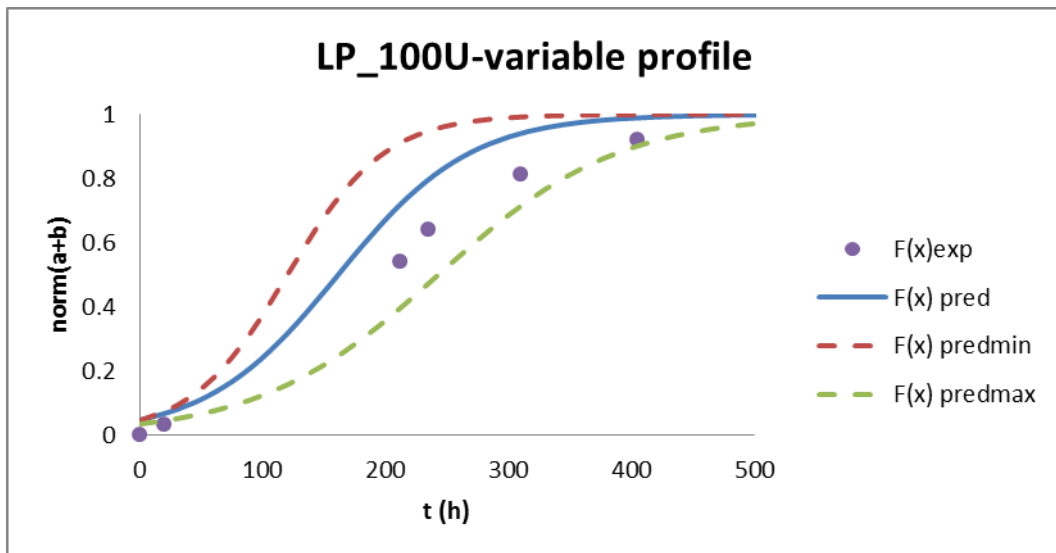
Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραπάνω επεξεργασίας και στο Σχήμα 5.32 παρουσιάζεται η απεικόνιση του δείκτη LP_100U για το εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ var.

Πίνακας 5.29 Προβλεπόμενες και πειραματικές σταθερές του ρυθμού για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U

$T_{eff} (^{\circ}\text{C})$	$k_{1exp} (\text{h})$	$k_{2exp} (\text{h})$	$k_{1pred} (\text{h})$	$k_{2pred} (\text{h})$
7.4	204.3	64.3	161.1	53.8

Πίνακας 5.30 Ελάχιστες και μέγιστες προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

$T_{eff} (^{\circ}\text{C})$	$k_{1pred_min} (\text{h})$	$k_{1pred_max} (\text{h})$	$k_{2pred_min} (\text{h})$	$k_{2pred_max} (\text{h})$
7.4	119.9	242.5	39.5	73.2



Σχήμα 5.34 Απόκριση του δείκτη LP_100U για το εναλλασσόμενο χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ Var και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Όπως παρατηρείται από τις τιμές των σταθερών αλλά και από το παραπάνω σχήμα, τα πειραματικά αποτελέσματα συσχετίζονται πολύ καλά με τις τιμές που προέκυψαν από το μοντέλο. Διαπιστώνεται ότι οι μετρήσεις του δείκτη LP_100U που είχε τοποθετηθεί στο στρείδι και ήταν αποθηκευμένο σε θάλαμο μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας, είναι εντός επιτρεπτών ορίων. Επομένως, ο δείκτης αυτός μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστος για το συγκεκριμένο τρόφιμο.

5.3 Προσδιορισμός συνολικών μαθηματικών μοντέλων της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αποτελεσμάτων των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP προσδιορίστηκε ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο. Το μοντέλο αυτό περιγράφεται από την εξίσωση 5.7, η οποία προέκυψε έπειτα από αντικατάσταση της σχέσης Arrhenius στη συνάρτηση απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ. Λόγω του μεγάλου θερμοκρασιακού εύρους που μελετήθηκε (0-30°C), προσδιορίζονται δύο μαθηματικά μοντέλα που αντιστοιχούν στα θερμοκρασιακά εύρη 0-15°C και 15-30°C.

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1ref}(C=1) C^{-a} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]^{-t}}{k_{2ref}(C=1) C^{-b} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (5.7)$$

Το συγκεκριμένο μοντέλο περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP από το χρόνο αποθήκευσης t (d), τη θερμοκρασία T (K) και τη συγκέντρωση του ενζύμου C (Units) των ΤΤΙ, $X = \text{norm}(a+b) = f(t, T, C)$.

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SYSTAT 10.2 (Statistics 2002, SPCC Inc., Chicago, Ill, USA) και με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης υπολογίστηκαν οι παράμετροι της εξίσωσης (5.7) που παραθέτονται στους παρακάτω πίνακες.

- **Μαθηματικό μοντέλο ανάπτυξης στο θερμοκρασιακό εύρος $0 \leq T \leq 15^\circ\text{C}$**

Πίνακας 5.31 Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP για το θερμοκρασιακό εύρος $0-15^\circ\text{C}$

Ενζυμικό Μαθηματικό Μοντέλο	
$k_{1\text{ref}} (C=1U) (h)$	3410.0
a	1.03
$E_A (kJ/mol)$	143.4
$k_{2\text{ref}} (C=1U) (h)$	1356.4
b	1.08
R^2	0.932

Επομένως η εξίσωση (5.7) γίνεται:

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{3410 C^{-1.03} \exp\left[17251.1 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right] - t}{1356.4 C^{-1.08} \exp\left[17251.1 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right]}\right)} \quad (5.8)$$

όπου T : η θερμοκρασία που βρίσκεται ο δείκτης LP (K)

C : η συγκέντρωση ενζύμου (Units) και

t : ο χρόνος αποθήκευσης (d)

Εφαρμόζοντας την εξίσωση (5.8) για διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης και συγκέντρωσης ενζύμου με τη βοήθεια του προγράμματος Solver στο Excel, υπολογίζεται η θεωρητική διάρκεια ζωής κάθε δείκτη με βάση το μοντέλο που αναπτύχθηκε (Πίνακας 5.32).

Πίνακας 5.32 Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών ΤΤΙ όπως έχουν προκύψει από το μαθηματικό μοντέλο για το θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C

Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP				
Response time (d) Θεωρητική διάρκεια ζωής				
T(°C)	0	5	10	15
5U	1094	352	118	40.9
10U	530	170	56.9	19.8
20U	257	82.4	27.6	9.58
50U	98.4	31.6	10.6	3.67
100U	47.7	15.3	5.12	1.78
200U	23.1	7.42	2.48	0.862
400U	11.2	3.60	1.20	0.418
600U	7.33	2.36	0.788	0.274

- Μαθηματικό μοντέλο ανάπτυξης στο θερμοκρασιακό εύρος 15<T≤30°C

Πίνακας 5.33 Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP για το θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C

Ενζυμικό Μαθηματικό Μοντέλο	
k _{1ref} (C=1U) (h)	2147.4
a	0.96
E _A (kJ/mol)	105.8
K _{2ref} (C=1U) (h)	1102.7
b	1.05
R ²	0.834

Επομένως η εξίσωση (5.7) γίνεται:

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{2147.4 C^{-0.96} \exp\left[12725.2\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right] - t}{1102.7 C^{-1.05} \exp\left[12725.2\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right]}\right)} \quad (5.9)$$

όπου T: η θερμοκρασία που βρίσκεται ο δείκτης LP (K)

C: η συγκέντρωση ενζύμου (Units) και

t: ο χρόνος αποθήκευσης (d)

Εφαρμόζοντας την εξίσωση 5.9 για διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης και συγκέντρωσης ενζύμου με τη βοήθεια του προγράμματος Solver στο Excel, υπολογίζεται η θεωρητική διάρκεια ζωής κάθε δείκτη με βάση το μοντέλο που αναπτύχθηκε (Πίνακας 5.34).

Πίνακας 5.34 Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών ΤΤΙ όπως έχουν προκύψει από το μαθηματικό μοντέλο για το θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C

Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP				
Response time (d) Θεωρητική διάρκεια ζωής				
T(°C)	15	20	25	30
5U	30.8	14.5	7.01	3.47
10U	15.5	7.29	3.52	1.74
20U	7.78	3.67	1.77	0.876
50U	3.14	1.48	0.714	0.353
100U	1.58	0.745	0.360	0.178
200U	0.797	0.375	0.181	0.090
400U	0.402	0.189	0.091	0.045
600U	0.270	0.127	0.061	0.030

Τα διαγράμματα που αποτυπώνονται συνολικά οι χρόνοι ζωής όλων των μελετώμενων ενζυμικών ΤΤΙ στα μελετώμενα θερμοκρασιακά εύρη παρουσιάζονται στο 7^ο κεφάλαιο, όπου πραγματοποιείται και διερεύνηση της χρήσης επιλεγμένων ΤΤΙ για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας στρεπιδιών.

5.4 Μελέτη αξιοπιστίας των μαθηματικών μοντέλων - στατιστική επεξεργασία

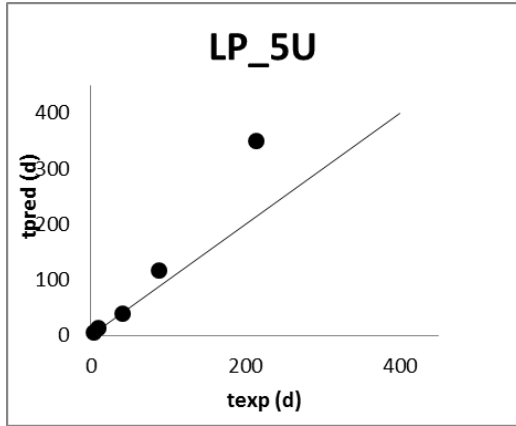
Για τη σύγκριση μεταξύ των πειραματικών και των θεωρητικών χρόνων των ΤΤΙ που μελετήθηκαν για κάθε συγκέντρωση κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα σύγκρισής τους. Οι πειραματικές με τις θεωρητικές τιμές έχουν μικρή απόκλιση αν τα σημεία τείνουν στη διχοτόμο του καρτεσιανού επιπέδου $y=x$. Για την ακριβή διαπίστωση συσχέτισης, υπολογίστηκαν ο συντελεστής accuracy factor και ο συντελεστής bias factor, πάνω στους οποίους βασίστηκε η σύγκριση μεταξύ των πειραματικών χρόνων ζωής και των προβλεπόμενων (θεωρητικών, όπως υπολογίστηκαν από το μαθηματικό μοντέλο που αναπτύχθηκε παραπάνω). Όταν οι συντελεστές είναι ίση με 1, τότε υπάρχει τέλεια συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και των θεωρητικών χρόνων ζωής (Ross, 1996). Οι παράγοντες υπολογίζονται από τις ακόλουθες σχέσεις:

$$Accuracy\ factor = 10^{\frac{\sum \left| \log\left(\frac{y_{predicted}}{y_{experimental}}\right) \right|}{n}} \quad (5.10)$$

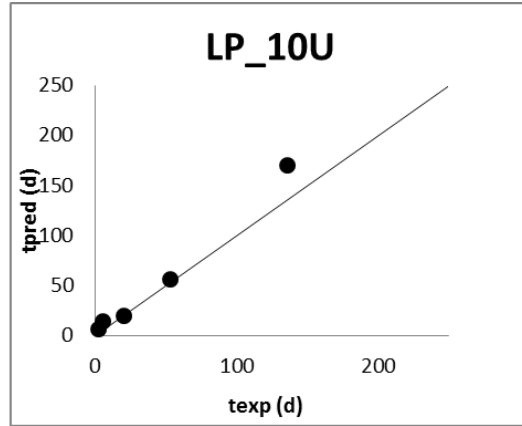
$$Bias\ factor = 10^{\frac{\sum \log\left(\frac{y_{predicted}}{y_{experimental}}\right)}{n}} \quad (5.11)$$

όπου n: ο αριθμός των παρατηρήσεων.

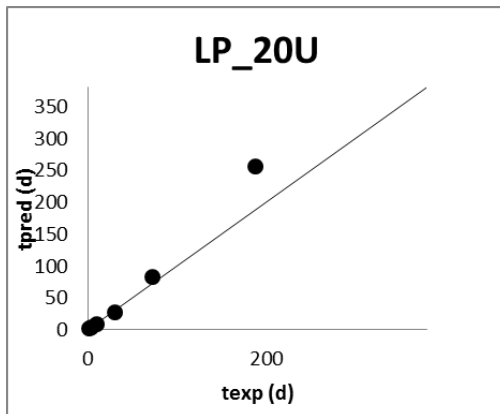
Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζεται η συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για όλα τα δείγματα ΤΤΙ τύπου LP που μελετήθηκαν, σε θερμοκρασιακό εύρος 0-30°C.



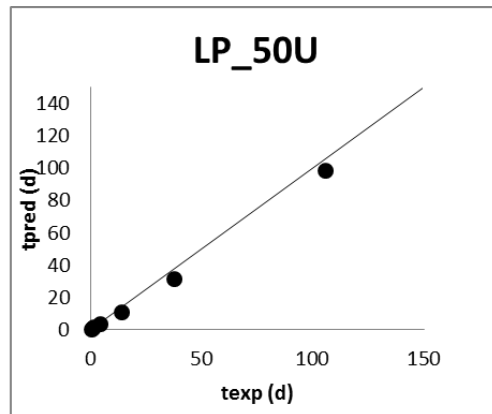
Σχήμα 5.35 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_5U (bias factor=1.36)



Σχήμα 5.36 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_10U (bias factor=1.25)

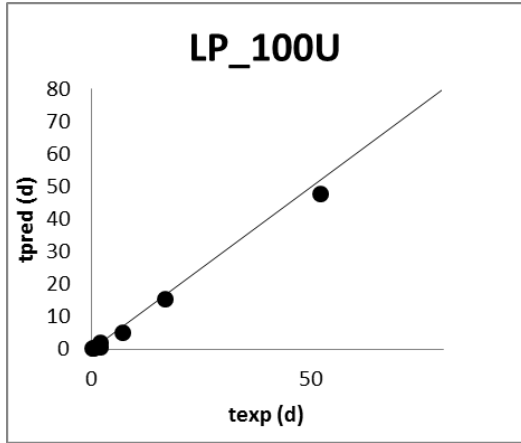


Σχήμα 5.37 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_20U (bias factor=1.14)

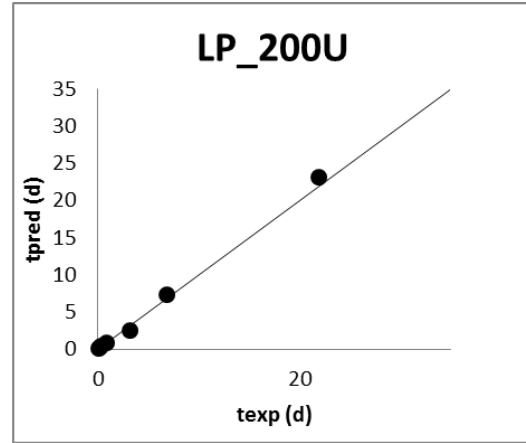


Σχήμα 5.38 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_50U (bias factor=0.88)

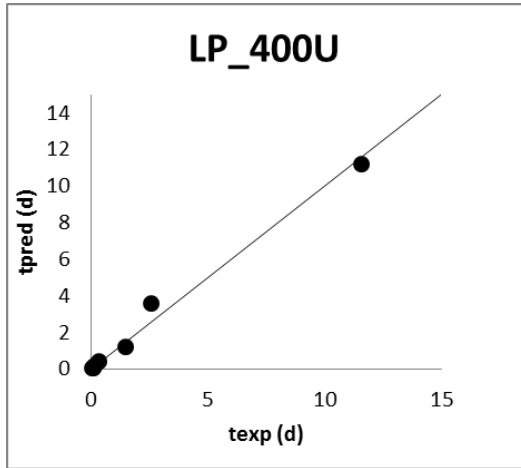
5. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΤΙ



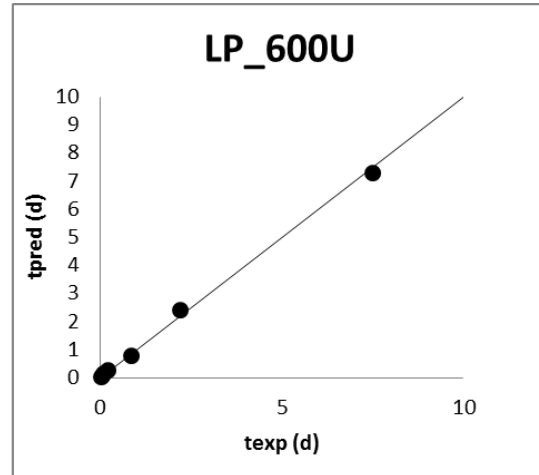
Σχήμα 5.39 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U (*bias factor*=0.95)



Σχήμα 5.40 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_200U (*bias factor*=1.03)



Σχήμα 5.41 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_400U (*bias factor*=1.03)



Σχήμα 5.42 Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τον ενζυμικό δείκτη LP_600U (*bias factor*=0.96)

Πίνακας 5.35 Οι συντελεστές *accuracy factor*, *bias factor* και το % σφάλμα πρόβλεψης που συσχετίζουν τους πειραματικούς με τους θεωρητικούς χρόνους ζωής στα ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP

	LP_5U	LP_10U	LP_20U	LP_50U	LP_100U	LP_200U	LP_400U	LP_600U
Accuracy factor	1.10	1.05	1.02	1.03	1.01	1.01	1.05	1.01
Bias factor	1.36	1.25	1.14	0.88	0.95	1.03	1.03	0.96
Μέσο %RE	-34.7	-26.5	-10.5	14.0	7.61	-1.49	-1.23	6.57

Για τη καλή συσχέτιση των πειραματικών και θεωρητικών τιμών ο συντελεστής bias factor πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.7 (ασφαλές όριο) και 1.15 (κρίσιμο-επικίνδυνο όριο) (Ross, Dalgaard & Tienungoon, 2000).

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και τον πίνακα, παρατηρείται ότι ο συντελεστής bias factor είναι εκτός ορίων για τους ενζυμικούς δείκτες LP_5U και LP_10U. Οι τιμές που αποκλίνουν περισσότερο από τη διχοτόμο $y=x$ στα διαγράμματα 5.33 και 5.34 είναι τα σημεία που οι πειραματικοί χρόνοι ζωής προέκυψαν μέσω προεκβολής και αντιστοιχούν στους 0°C.

Για τους υπόλοιπους δείκτες, διαπιστώθηκε ότι οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP έχουν ελάχιστη απόκλιση από τους χρόνους απόκρισης που πρόεκυψαν από τα κινητικά μοντέλα. Ο παράγοντας μεροληψίας είναι εντός ορίων και οι τιμές στα διαγράμματα προσεγγίζουν ή βρίσκονται πάνω στη διχοτόμο $y=x$. Ο δείκτης με την καλύτερη συσχέτιση είναι ο LP_600U, διότι λόγω της μικρής διάρκειας χρόνου λήξης του έχει εκτιμηθεί με μεγάλη ακρίβεια η πειραματική τιμή του (ελήφθησαν πολλά πειραματικά σημεία).

Επίσης υπολογίστηκε ο μέσος όρος του σφάλματος πρόβλεψης (%RE). Το όριο που χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία για το σφάλμα πρόβλεψης είναι το $\pm 20\%$ (Dalgaard et al., 1997; Gougouli et al., 2008). Από τον πίνακα 5.35 παρατηρείται ότι οι μόνες τιμές που αποκλίνουν από τα επιτρεπτά όρια είναι για τους ενζυμικούς δείκτες LP_5U και LP_10U, αφού στις χαμηλότερες μελετούμενες θερμοκρασίες προέκυψαν μέσω προεκβολής. Διαπιστώνεται επομένως ότι τα συμπεράσματα που μπορούμε να εξάγουμε από τις τιμές των συντελεστών bias και accuracy factor συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα που προκύπτουν μέσω των σφαλμάτων πρόβλεψης.

6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ

6.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο 4^ο κεφάλαιο, μετρήθηκε το μικροβιακό φορτίο σε στρείδια *Classosterea gigas* τόσο σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10 και 15°C) όσο και σε δυναμικές συνθήκες (θερμοκρασία μεταξύ 5 και 10°C).

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε δυναμικές συνθήκες είχε ως στόχο την επιβεβαίωση του μοντέλου που προέκυψε από τα ισοθερμοκρασιακά πειράματα. Τη μεταβολή της θερμοκρασίας αποτύπωσε το καταγραφικό θερμοκρασίας (data logger) κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ για το δείκτη LP_100U.

Η **δραστική θερμοκρασία** υπολογίστηκε και βρέθηκε ίση με 7,4°C.

Κατά τη διάρκεια των συγκεκριμένων πειραμάτων στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν:

- Μέτρηση της απόκρισης των τοποθετημένων στα δείγματα ΤΤΙ
- Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου
- Μέτρηση pH
- Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων
- Επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Vibrio* spp. σε στρείδια.

Για την αλλοίωση των στρειδιών, μετρήθηκαν:

- Η ολική μικροβιακή χλωρίδα
- Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων.

6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής στρεδιών

6.2.1 Μέτρηση μικροβιακού φορτίου

Για τη μελέτη διατηρησιμότητας και τη διερεύνηση των κυρίαρχων αλλοιογόνων μικροοργανισμών κατά τη συντήρηση των στρειδιών υπό ψύξη, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική μελέτη σε θερμοκρασία 0 και 5°C και καταμετρήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί:

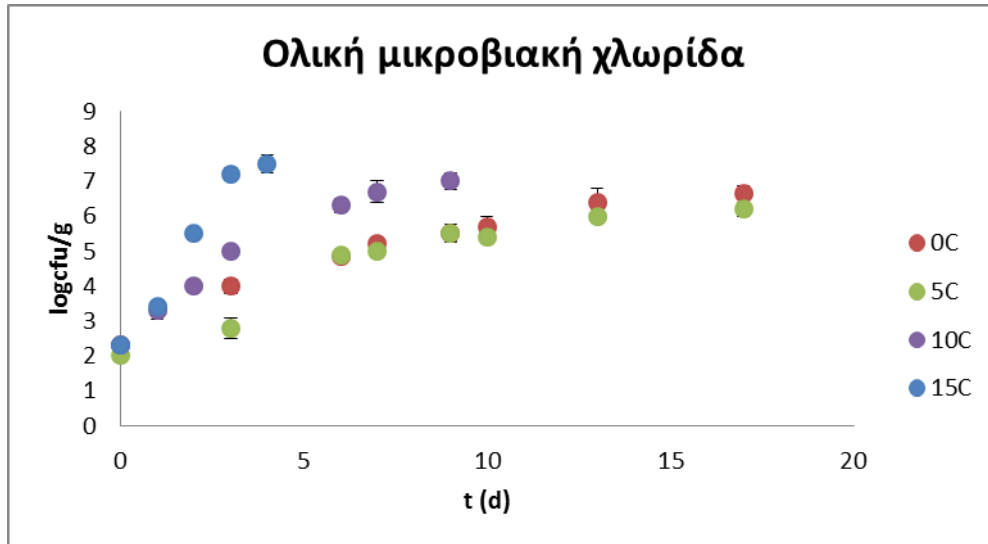
- η ολική μικροβιακή χλωρίδα
 1. με υπόστρωμα PCA
 2. με υπόστρωμα PCA+NaCl (NaCl 1%)
- ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp.
 1. με υπόστρωμα CFC
 2. με υπόστρωμα CFC+NaCl (NaCl 1%)
- 3. με υπόστρωμα *Pseudomonas agar*
- ο παθογόνος *Vibrio* spp. (TCBS)
- τα παραγόμενα βακτήρια από H₂S (IA)
- ο πληθυσμός των *Enterobacteriaceae* spp. (VRBD).
- τα γαλακτικά βακτήρια (MRS)
- οι μύκητες (PDA) και
- οι ζύμες - μύκητες (RBC).

Από τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης, διαπιστώθηκε ότι ο κυρίαρχος αλλοιογόνος μικροοργανισμός είναι οι **ψευδομονάδες** (όπως καταμετρήθηκαν με υπόστρωμα *Pseudomonas agar*). Γι' αυτό το λόγο, μελετήθηκαν εκτενέστερα η κινητική των ψευδομονάδων και της ολικής μικροβιακής χλωρίδας.

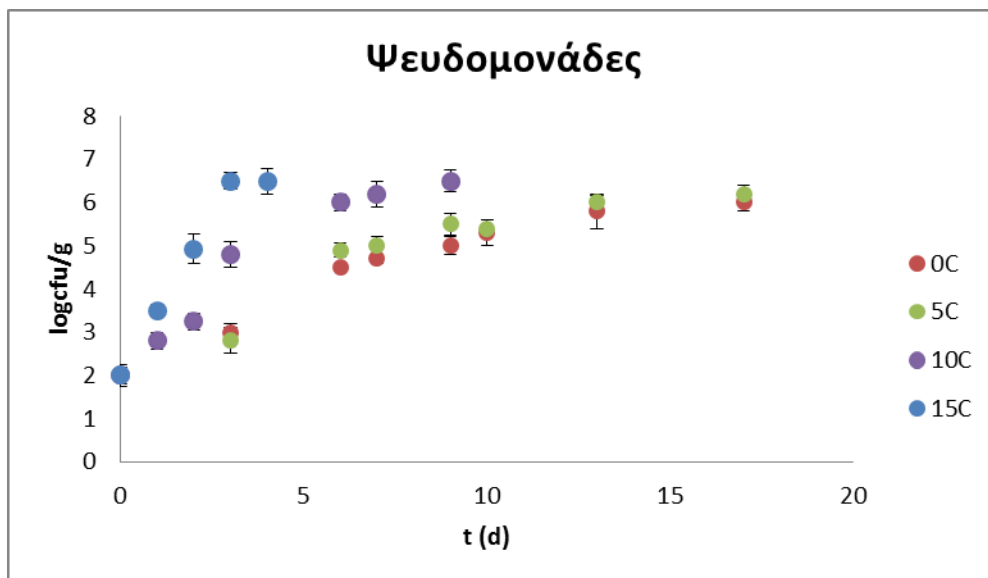
Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες στους 4 και 5°C (Chen et al., 2013; Madigan, 2014; Cao, 2009; Rong, 2010).

Επίσης ως υπόστρωμα για τον προσδιορισμό της ολικής μικροβιακής χλωρίδας επιλέχθηκε το PCA+NaCl με περιεκτικότητα NaCl 1%, διότι παρουσίασε μεγαλύτερη ανάκτηση (Dalgaard, 2000).

Παρακάτω, παρατίθενται διαγράμματα που απεικονίζουν τις μετρήσεις των μικροβιολογικών αναλύσεων τόσο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας όσο και των ψευδομονάδων.



Σχήμα 6.1 Εξέλιξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα στρειδιών



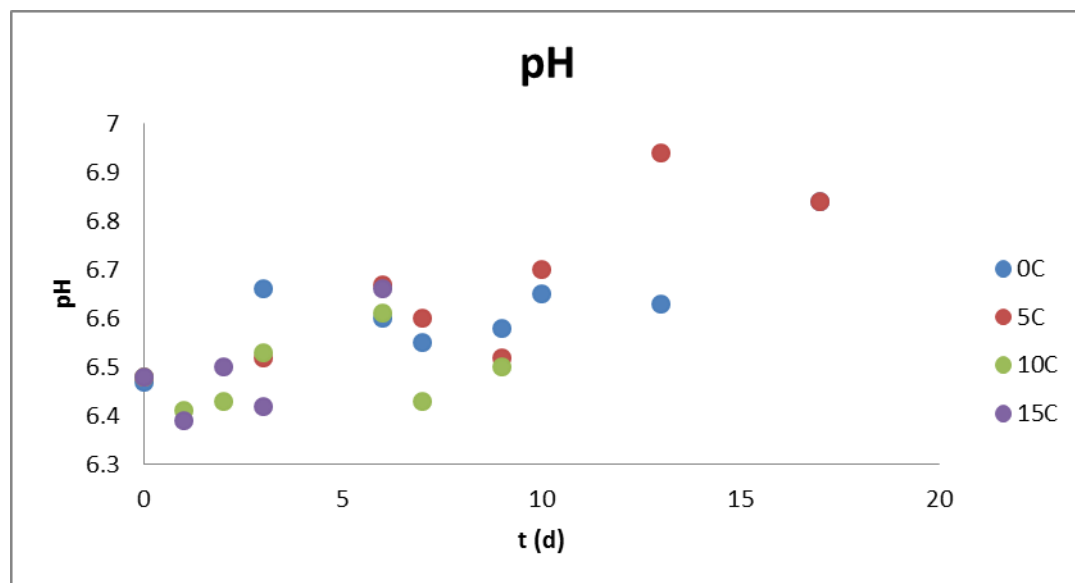
Σχήμα 6.2 Εξέλιξη των ψευδομονάδων σε δείγματα στρειδιών

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η υψηλότερη θερμοκρασία οδήγησε και σε ταχύτερη ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως ήταν αναμενόμενο. Επίσης παρατηρείται τα δείγματα να έχουν παρόμοιο τελικό φορτίο.

6.2.2 Μέτρηση pH

Η τιμή pH είναι πολύ σπουδαία παράμετρος των τροφίμων γιατί επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες, τα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αλλά και

το είδος της αναπτυσσόμενης μικροβιακής χλωρίδας των προϊόντων. Είναι πολύ σημαντική η παρακολούθηση της μεταβολής της τιμής κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, μιας και προκαλούνται απώλειες υγρασίας εξαιτίας της μείωσης της διαλυτότητας των πρωτεϊνών, αλλά και αλλοίωση της γεύσης και της υφής. Και αντιστρόφως όμως το pH επηρεάζεται από την ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας. Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για όλα τα δείγματα.



Σχήμα 6.3 Η μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης, για θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C.

Με την αύξηση του πληθυσμού των ψευδομονάδων, που είναι ο κύριος αλλοιογόνος μικροοργανισμός, παρατηρείται μια τάση αύξησης της τιμής του pH (Chun et al., 2014). Οι τιμές pH που μετρήθηκαν είναι σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες διατηρησιμότητας στρειδιών σε ψύξη (Madigan et al., 2014).

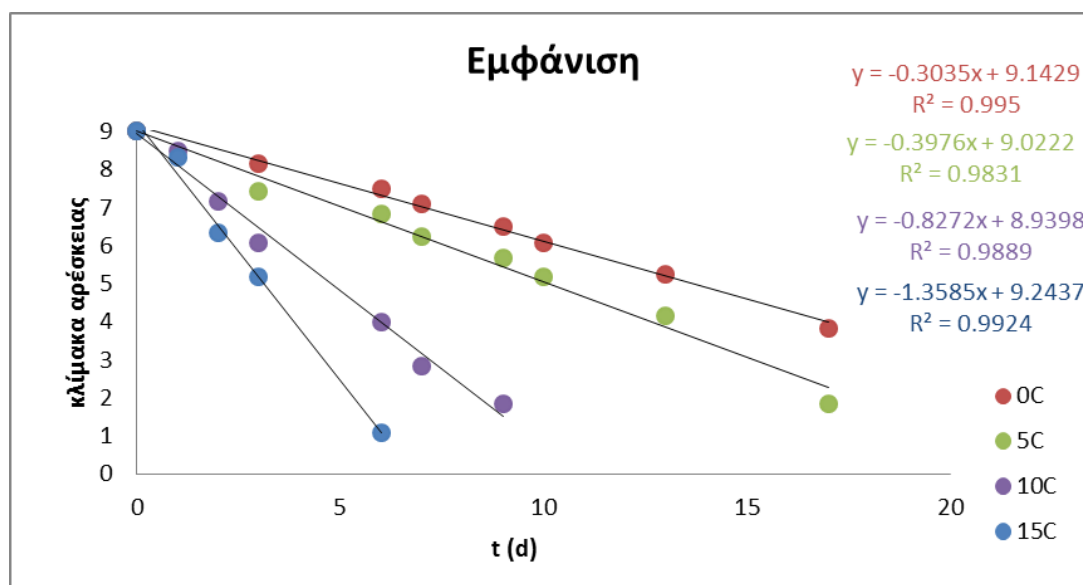
6.2.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση δειγμάτων

Πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων κατά τη συντήρηση σε ψύξη (οσμή, εμφάνιση, συνολική εντύπωση), τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται παρακάτω. Για τη βαθμολόγηση χρησιμοποιήθηκε κλίμακα από το 1 έως το 9, όπου 9: φρέσκο και 1: εμφανείς αλλοιώσεις, και ορίστηκε ως όριο αποδοχής η βαθμολόγηση 5 για τη συνολική οργανοληπτική εντύπωση.

Στις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν προσαρμόζεται γραμμική συνάρτηση, όπως φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν. Επίσης, εφαρμόζοντας το μοντέλο Arrhenius για τη μεταβολή του ρυθμού υποβάθμισης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών συναρτήσει της θερμοκρασίας αποθήκευσης, υπολογίζονται οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης του φαινομένου της υποβάθμισης. Με αυτόν τον τρόπο ποσοτικοποιείται η εξάρτηση της υποβάθμισης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών από τη θερμοκρασία συντήρησης των δειγμάτων.

- **Εμφάνιση**

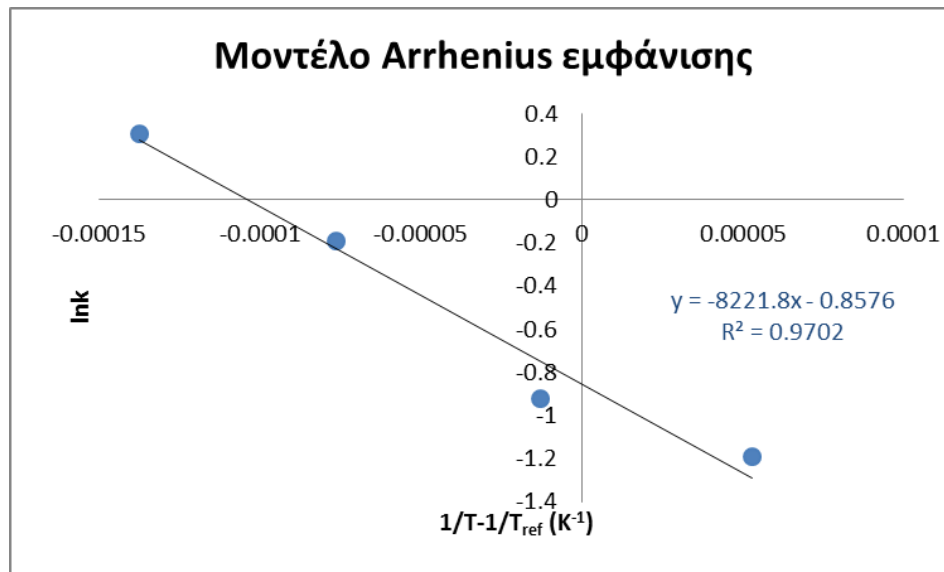
Η εμφάνιση είναι το πρώτο από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, το οποίο οι δοκιμαστές αντιλαμβάνονται και κρίνουν για το αν το τρόφιμο είναι αλλοιωμένο ή είναι αποδεκτό.



Σχήμα 6.4 Διάγραμμα βαθμολόγησης εμφάνισης στρειδιών για θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C

Πίνακας 6.1 Ρυθμός υποβάθμισης της εμφάνισης

T (°C)	k_{exp} (d ⁻¹)
0	0.304±0.009
5	0.398±0.021
10	0.827±0.039
15	1.359±0.068



Σχήμα 6.5 Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius για την αξιολόγηση της εμφάνισης

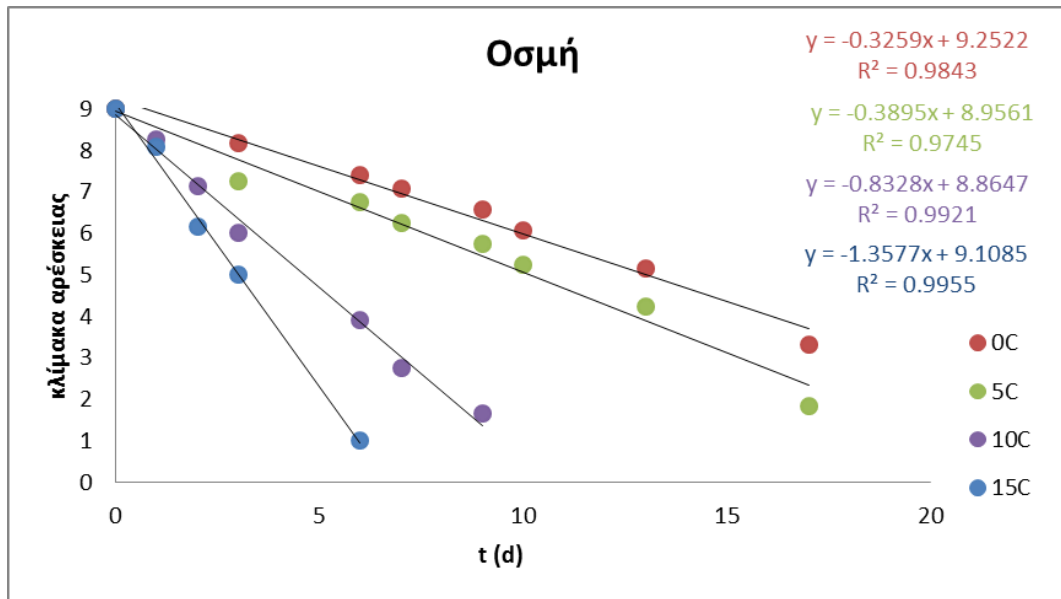
Πίνακας 6.2 Κινητικά χαρακτηριστικά για την αξιολόγηση της εμφάνισης

E_A (kJ/mol)	k_{ref} (d ⁻¹)	R^2
68.3	0.424	0.970

Αρχικά, από το διάγραμμα είναι φανερό ότι ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων έχει σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) στην αρέσκεια των δοκιμαστών ως προς την εμφάνιση των δειγμάτων σε όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης. Εφόσον αυξάνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης τα δείγματα γίνονται λιγότερο αποδεκτά με αύξηση του χρόνου αποθήκευσης. Μάλιστα ο ρυθμός μείωσης της προτίμησης των δοκιμαστών είναι ταχύτερος σε υψηλότερες θερμοκρασίες αποθήκευσης των δειγμάτων.

6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ

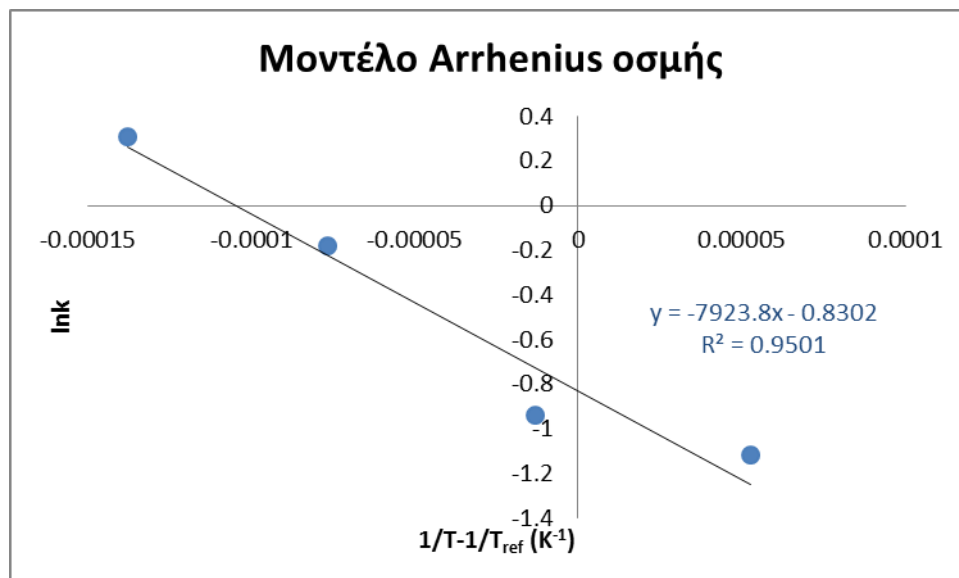
• Οσμή



Σχήμα 6.6 Διάγραμμα βαθμολόγησης οσμής στρειδιών για θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C

Πίνακας 6.3 Ρυθμός υποβάθμισης της οσμής

T (°C)	k_{exp} (d ⁻¹)
0	0.326±0.017
5	0.390±0.026
10	0.833±0.033
15	1.357±0.053



Σχήμα 6.7 Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius για την αξιολόγηση της οσμής

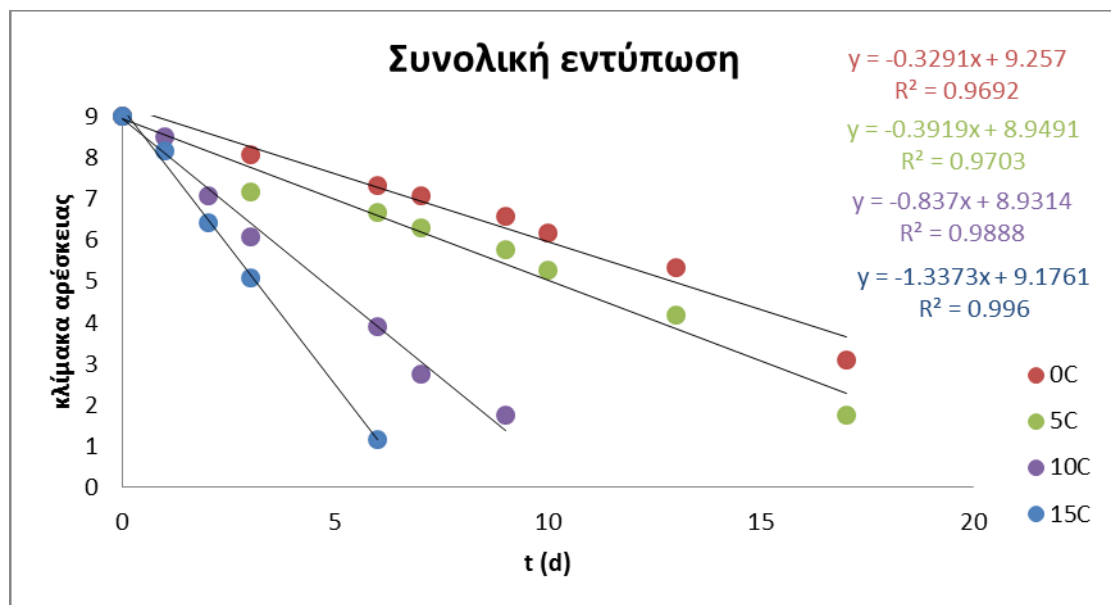
Πίνακας 6.4 Κινητικά χαρακτηριστικά για την αξιολόγηση της οσμής

E_A (kJ/mol)	k_{ref} (d ⁻¹)	R^2
65.8	0.436	0.950

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι φανερό ότι με την πάροδο των ημερών και με αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης των δειγμάτων, ο ρυθμός μείωσης αρέσκειας της οσμής από τους δοκιμαστές αυξάνεται. Ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων έχει σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) στην οσμή τους. Ειδικά τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες (10 και 15°C) ήταν μη αποδεκτά μετά από 5 και 3 ημέρες, αντίστοιχα.

- **Συνολική εντύπωση**

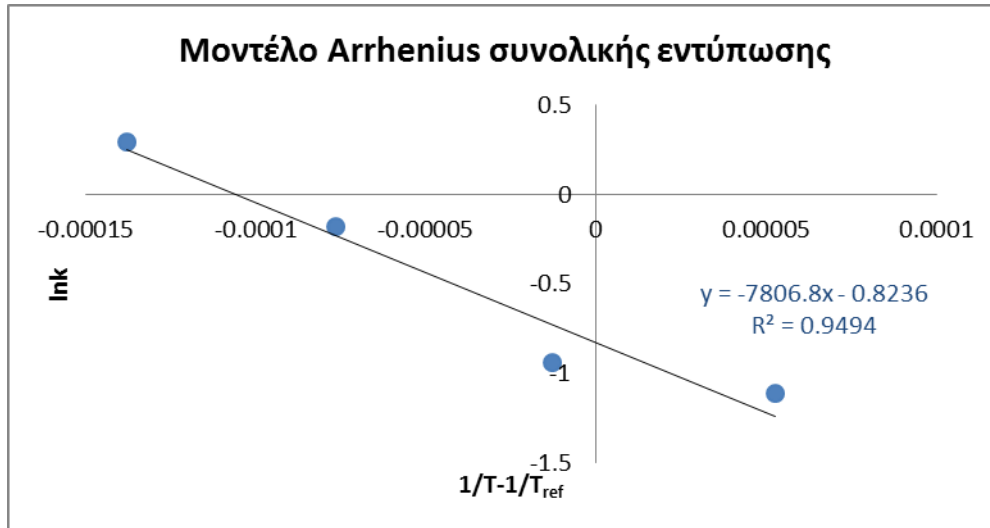
Η τάση υποβάθμισης της συνολικής εντύπωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων με την πάροδο του χρόνου, στις τέσσερις θερμοκρασίες αποθήκευσης, όπως προέκυψε μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του οργανοληπτικού ελέγχου, παρουσιάζεται στο επόμενο διάγραμμα.



Σχήμα 6.8 Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής εντύπωσης στρειδιών για θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C.

Πίνακας 6.5 Ρυθμός υποβάθμισης της συνολικής εντύπωσης

T (°C)	k_{exp} (d ⁻¹)
0	0.329±0.024
5	0.392±0.028
10	0.837±0.040
15	1.337±0.049



Σχήμα 6.9 Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius για την αξιολόγηση συνολικής εντύπωσης

Πίνακας 6.6 Κινητικά χαρακτηριστικά για την αξιολόγηση της συνολικής εντύπωσης

E_A (kJ/mol)	k_{ref} (d ⁻¹)	R^2
64.9	0.439	0.950

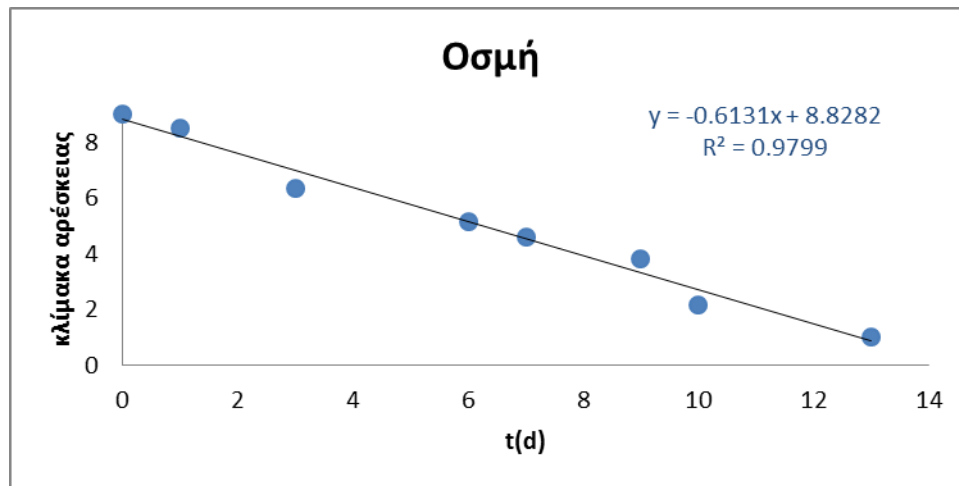
Πίνακας 6.7 Χρόνοι ζωής στρειδιών σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση (όριο βαθμολόγησης 5 για τη συνολική εντύπωση)

T (°C)	Χρόνος ζωής (d)
0	14
5	8
10	5
15	3

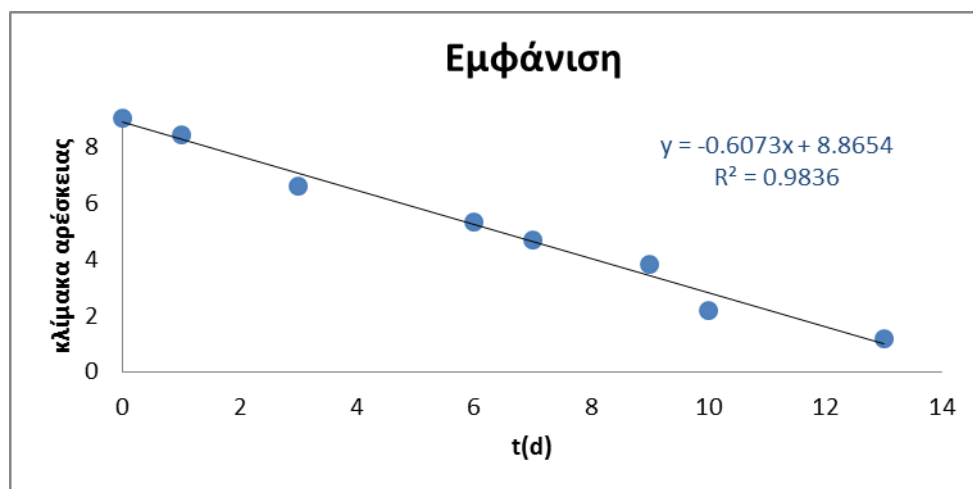
- **Μεταβαλλόμενη θερμοκρασιακά συνθήκη**

Το πείραμα της παρούσας διπλωματικής πραγματοποιήθηκε και σε δυναμική συνθήκη, όπου σύμφωνα με το χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ και το καταγραφικό θερμοκρασίας η δραστική θερμοκρασία T_{eff} βρέθηκε ίση με 7.4°C. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα οσμής, εμφάνισης και συνολικής εντύπωσης για τη θερμοκρασία αυτή, καθώς και ένας πίνακας με τους πειραματικούς και θεωρητικούς ρυθμούς υποβάθμισης των στρειδιών.

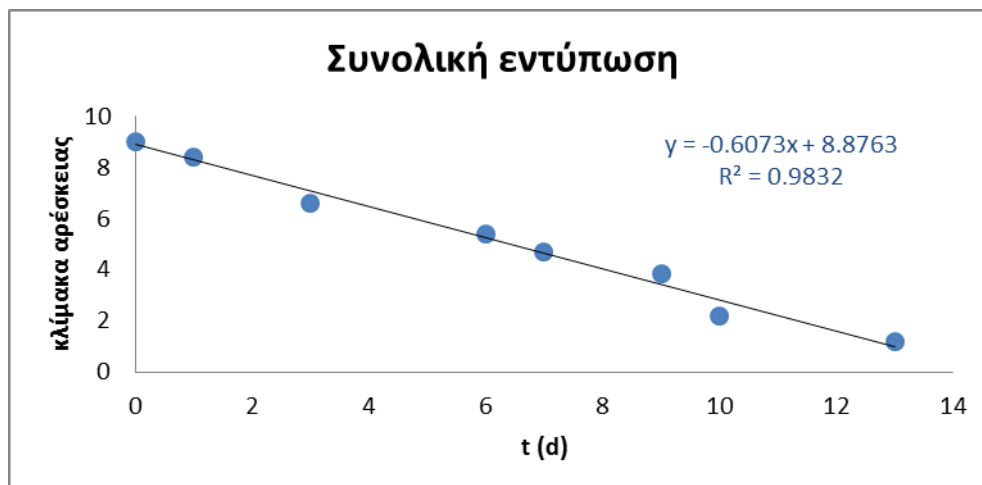
6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ



Σχήμα 6.11 Διάγραμμα βαθμολόγησης οσμής στρειδιών για θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενη συνθήκη



Σχήμα 6.12 Διάγραμμα βαθμολόγησης εμφάνισης στρειδιών για θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενη συνθήκη



Σχήμα 6.13 Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής εντύπωσης στρειδιών για θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενη συνθήκη

Πίνακας 6.8 Θεωρητικοί και πειραματικοί ρυθμοί υποβάθμισης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν

	$k_{pred} (d^{-1})$	$k_{exp} (d^{-1})$	%RE
Οσμή	0.616	0.613±0.036	-0.55
Εμφάνιση	0.608	0.607±0.032	-0.07
Συνολική Εντύπωση	0.617	0.607±0.032	-1.64

$$\text{όπου } \%RE = \frac{k_{exp} - k_{pred}}{k_{pred}}$$

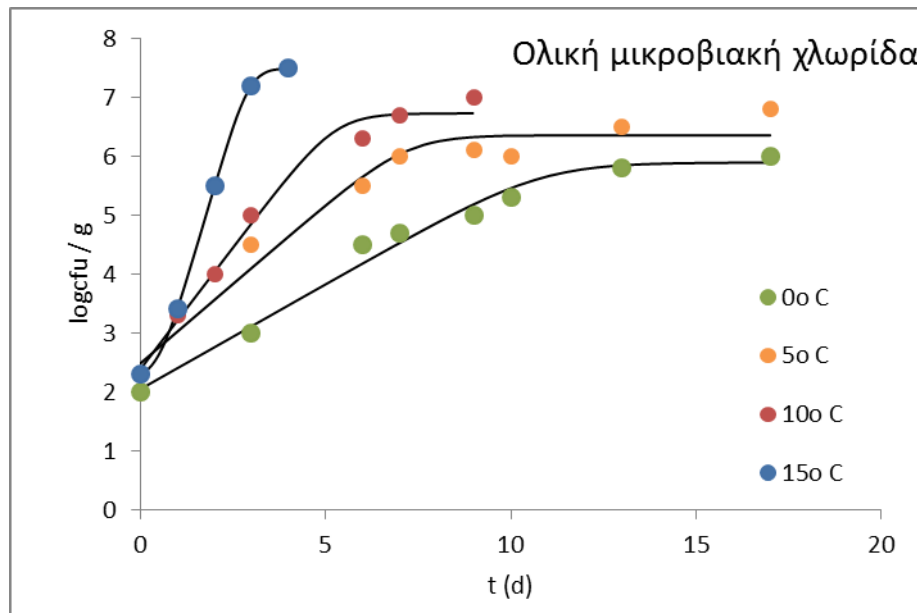
Παρατηρείται ότι το % σφάλμα πρόβλεψης (RE) είναι για όλες τις περιπτώσεις πολύ χαμηλότερο από το όριο $\pm 20\%$ που χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία ως κριτήριο εφαρμογής του μαθηματικού μοντέλου (Dalgaard et al., 1997; Gougouli et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα τα ακριβή όρια του σφάλματος πρόβλεψης είναι $-0.3 < RE < 0.15$, $RE_{max} = 0.138$ και $RE_{min} = -0.252$ (Oscar, 2005).

6.3 Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης της μικροβιολογικής αλλοίωσης σε στρείδια

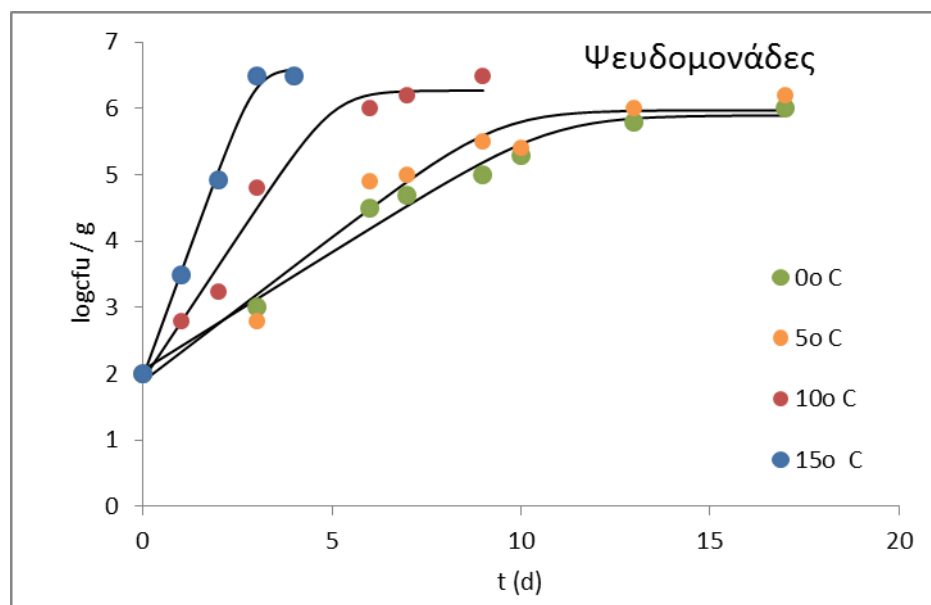
6.3.1 Ισοθερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης - Ανάπτυξη κινητικού μοντέλου

Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi, μέσω του προγράμματος Dmfit, και υπολογίστηκαν οι ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης για την ολική μικροβιακή χλωρίδα και για τις ψευδομονάδες. Η καμπύλη του μοντέλου Baranyi που προέκυψε είχε σιγμοειδής μορφή, με λανθάνουσα, εκθετική και φάση στασιμότητας και ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροβιακού φορτίου αναφέρθηκε στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και των ψευδομονάδων για τα δείγματα στρειδιών στις θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C.

6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ



Σχήμα 6.14 Καμπύλη ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε στρείδια σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C.



Σχήμα 6.15 Καμπύλη ανάπτυξης των ψευδομονάδων σε στρείδια σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C.

Από την προσαρμογή των μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi προέκυψαν οι εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και των ψευδομονάδων σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C, οι οποίοι ορίστηκαν από την ακόλουθη σχέση:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = kt \quad (6.1)$$

όπου N: ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t και
N₀: το αρχικό μικροβιακό φορτίο.

6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ

Πίνακας 6.6 Εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης ολικής μικροβιακής χλωρίδας και ψευδομονάδων των στρειδιών σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 10°C (μοντέλο Baranyi)

T (°C)	k ολικής μικροβ.χλωρ. (d ⁻¹)	k ψευδομονάδων (d ⁻¹)
0	0.390 ± 0.0712	0.356 ± 0.0293
5	0.539 ± 0.0813	0.435 ± 0.0563
10	0.826 ± 0.1024	0.860 ± 0.1326
15	2.146 ± 0.0232	1.562 ± 0.1176

Από τα σχήματα (6.14) και (6.15) γίνεται εμφανές ότι με αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης, αυξήθηκε και ο εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης τόσο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, όσο και των ψευδομονάδων. Από τη συμφωνία των ρυθμών ανάπτυξης στις αντίστοιχες θερμοκρασίες συντήρησης, προέκυψε ότι οι ψευδομονάδες αποτελέσαν τον κυριάρχο αλλοιογόνο μικροοργανισμό και για το λόγο αυτό λήφθηκαν υπόψη για την εκτίμηση της διατηρησιμότητας των στρειδιών.

6.3.2 Εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών από τη θερμοκρασία συντήρησης

Οι ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης που προσδιορίστηκαν με χρήση του μοντέλου Baranyi προσαρμόστηκαν στη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius.

$$\ln k = \ln k_{ref} + \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \quad (6.2)$$

όπου k: η σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών (d⁻¹)

k_{ref}: η αντίστοιχη σταθερά στη θερμοκρασία αναφοράς (d⁻¹)

E_A: η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol)

R: η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/mol*K)

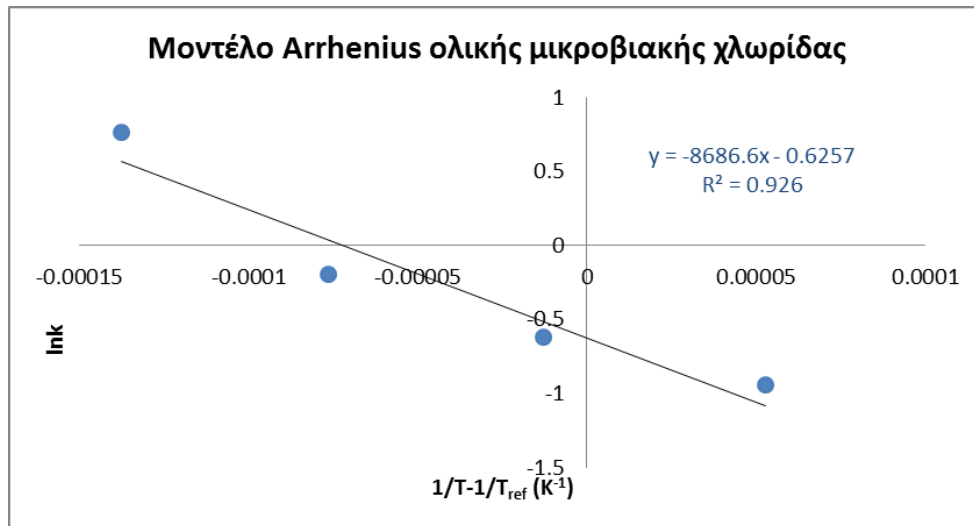
T: η απόλυτη θερμοκρασία (K).

Θερμοκρασία αναφοράς: T_{ref}=4° C

Με χρήση της εξίσωσης Arrhenius και της εξίσωσης (6.1), προέκυψε η κινητική εξίσωση ανάπτυξης μικροοργανισμών σε στρείδια.

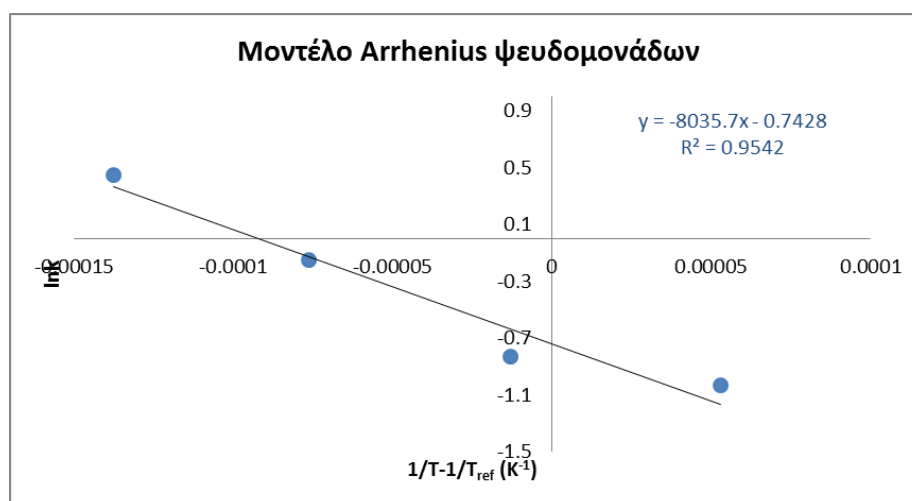
$$\log N = \log N_o + \left(k_{ref} + e^{\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right)} \right) t \quad (6.3)$$

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης τόσο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας όσο και των ψευδομονάδων στα στρείδια παρουσιάζονται στα επόμενα διαγράμματα.



Σχήμα 6.16 Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε στρείδια

Από το σχήμα 6.16 προκύπτει ότι η ενέργεια ενεργοποίησης E_A με βάση την ανάπτυξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας ισούται με 72.2 kJ/mol και ο ρυθμός ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας k_{ref} στη θερμοκρασία αναφοράς ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$) ισούται με 0.535 d^{-1} .



Σχήμα 6.17 Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων σε στρείδια

Από το Σχήμα 6.17 προκύπτει ότι η ενέργεια ενεργοποίησης E_A με βάση την ανάπτυξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας ισούται με 66.8 kJ/mol και ο ρυθμός

ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας k_{ref} στη θερμοκρασία αναφοράς ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$) ισούται με 0.476 d^{-1} .

Πίνακας 6.7 Τιμές E_A και k_{ref} στους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν στα στρείδια για $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$

Μικροοργανισμοί	E_A (kJ/mol)	k_{ref} (d^{-1})	R^2
Ολική μικροβιακή χλωρίδα	72.2	0.535	0.926
Ψευδομονάδες	66.8	0.476	0.9542

Επομένως η εξίσωση ανάπτυξης ψευδομονάδων σε στρείδια είναι η ακόλουθη:

$$\log N = 2 + \left(0.4758 + \exp \left(8035.7 \left(\frac{1}{277.15} - \frac{1}{T} \right) \right) \right) t \quad (6.4)$$

όπου, $\log N$: αριθμός γαλακτικών βακτηρίων τη χρονική στιγμή t ($\log \text{cfu/g}$)

T : απόλυτη θερμοκρασία διεξαγωγής του πειράματος (K)

t : χρόνος μέτρησης των γαλακτικών βακτηρίων (d)

- **Προσδιορισμός του χρόνου ζωής**

Για τις θερμοκρασίες μελέτης των δειγμάτων, υπολογίστηκε η διάρκεια ζωής (shelf life) των στρειδιών με χρήση των πειραματικών δεδομένων του ρυθμού ανάπτυξης ψευδομονάδων στην εξίσωση (6.1). Η ανάπτυξη των ψευδομονάδων αποτέλεσε έναν αξιόπιστο δείκτη ποιότητας, με το φορτίο των ψευδομονάδων $6 \log \text{cfu/g}$ να συμπίπτει με την οργανοληπτική απόρριψη των στρειδιών σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Σύμφωνα με την εξίσωση, η αρχική τιμή που χρησιμοποιήθηκε είναι $\log N_0=2 \text{ cfu/g}$ (μέσος όρος των μετρήσεων των αρχικών μικροβιακών φορτίων για τις μελετώμενες θερμοκρασίες).

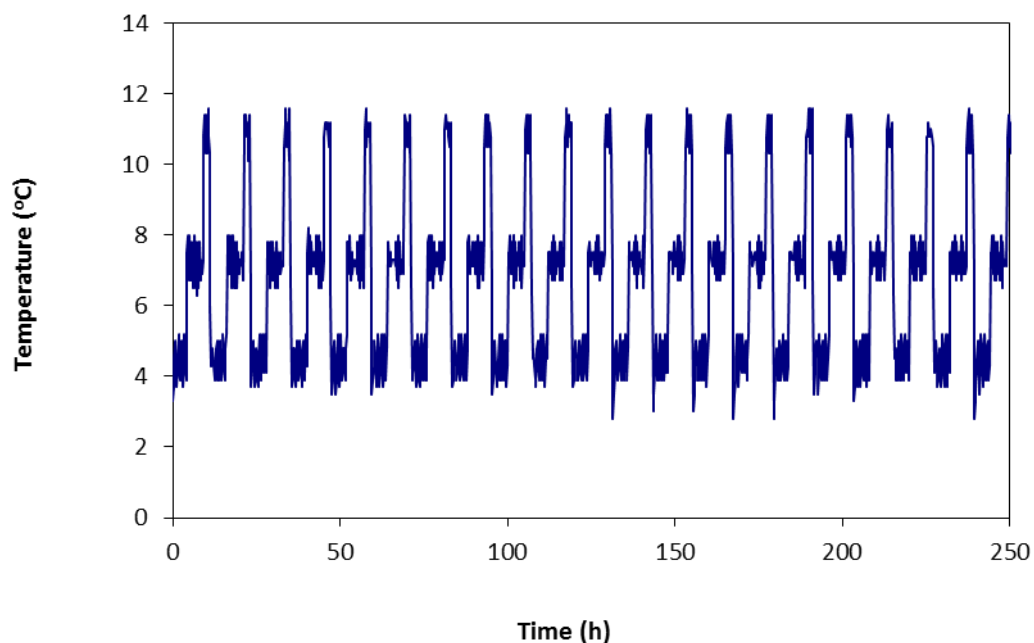
Παρόμοιες τιμές αναφέρονται και στη βιβλιογραφία (Borch et al., 1996; Devlieghere et al., 1998; Devlieghere et al., 2000a, Fernández-López et al., 2008; Korkeala et al., 1987; Koutsoumanis et al., 2005; Mataragas et al., 2006; Nychas et al., 2008; Samelis et al., 2000; Βαϊκούση, 2009; Γαβριήλ, 2009; Gogou et al., 2006; Καραμπέρη, 2010).

Πίνακας 6.8 Χρόνοι ζωής δειγμάτων σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 10°C

T (°C)	Χρόνος ζωής (d)
0	13
5	8
10	5
15	3

6.3.4 Επαλήθευση μαθηματικού μοντέλου σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες

Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε πείραμα σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η μέση θερμοκρασιακή κατανομή (var), όπως καταγράφηκε από το καταγραφικό θερμοκρασίας (data logger) κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος εναλλασσόμενου χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ.

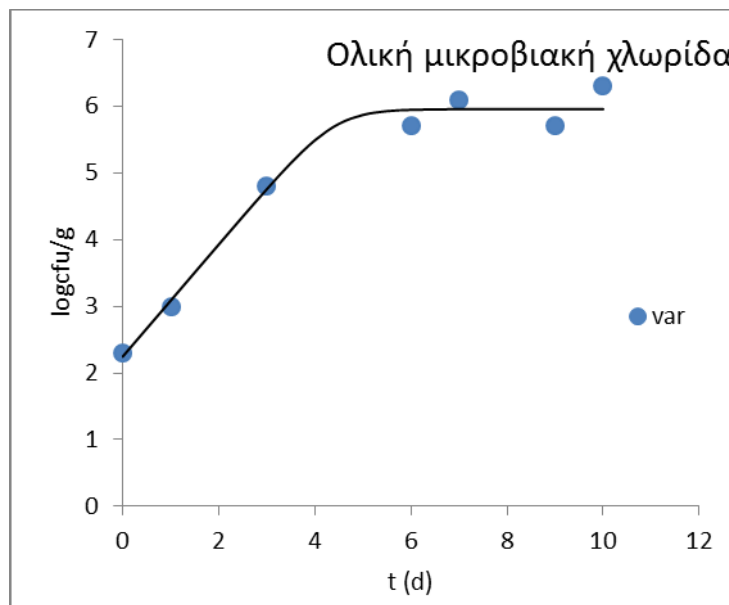


Σχήμα 6.18 Συνθήκες θερμοκρασίας αποθήκευσης κατά τη διάρκεια του πειράματος αποθήκευσης σε μεταβαλλόμενες συνθήκες

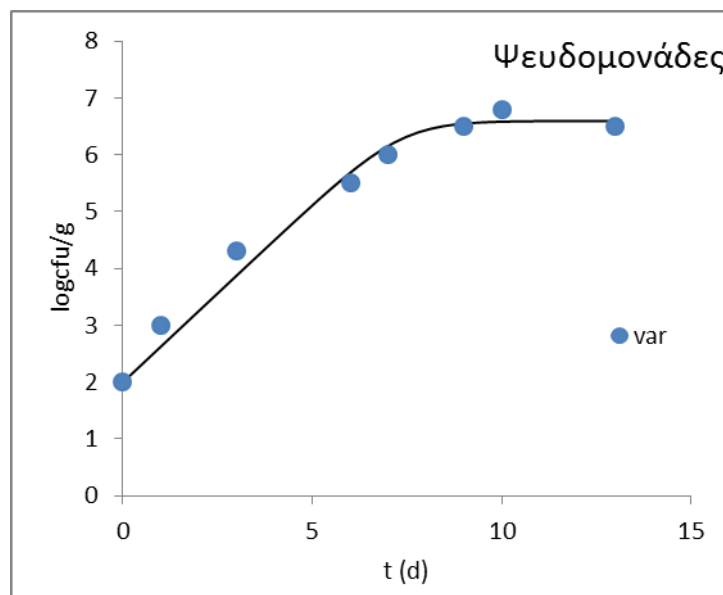
Στα διαγράμματα που ακολουθούν πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μετρήσεων ανάπτυξης των ολικών και των γαλακτικών βακτηρίων στο μοντέλο Baranyi, από όπου και προέκυψαν οι εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Τα

6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ

σημεία είναι οι πειραματικές μετρήσεις και οι συνεχείς καμπύλες προκύπτουν από την προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 6.19 Καμπύλη ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε στρείδια κατά την αποθήκευσή τους σε μεταβαλλόμενη θερμοκρασία.



Σχήμα 6.20 Καμπύλη ανάπτυξης των ψευδομονάδων σε στρείδια κατά την αποθήκευσή τους σε μεταβαλλόμενη θερμοκρασία.

Με βάση το χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ του σχήματος (6.18) υπολογίστηκε η δραστική θερμοκρασία T_{eff} , η οποία βρέθηκε ίση με 7.4°C , και μέσω αυτής υπολογίστηκαν στη συνέχεια οι προβλεπόμενοι ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και των ψευδομονάδων.

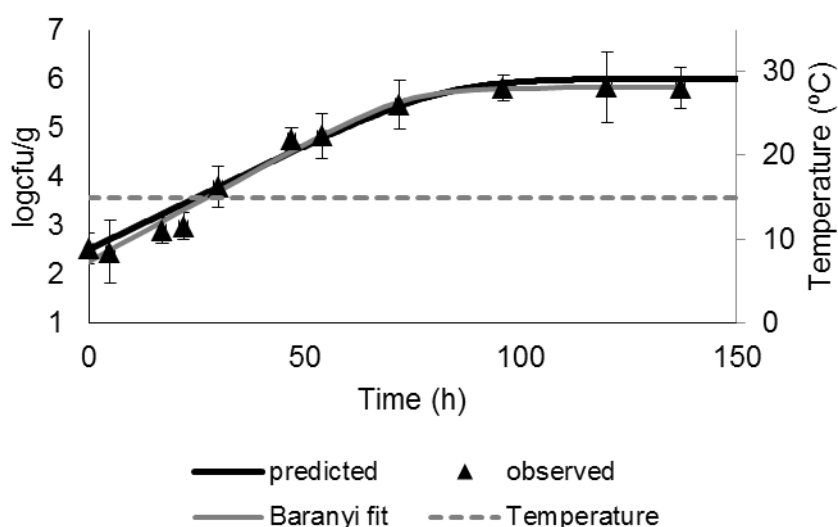
Πίνακας 6.9 Θεωρητικός και πειραματικός ρυθμός ανάπτυξης ολικής μικροβιακής χλωρίδας και ψευδομονάδων σε μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ

Μικροοργανισμοί	$k_{pred} (d^{-1})$	$k_{exp} (d^{-1})$	%RE
Ολική μικροβιακή χλωρίδα	0.782	0.842±0.126	7.7
Ψευδομονάδες	0.676	0.626±0.076	-7.4

Παρατηρείται ότι το % σφάλμα πρόβλεψης (RE) είναι για όλες τις περιπτώσεις πολύ χαμηλότερο από το όριο $\pm 20\%$ που χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία ως κριτήριο εφαρμογής του μαθηματικού μοντέλου (Dalgaard et al., 1997; Gougouli et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα τα ακριβή όρια του σφάλματος πρόβλεψης είναι $-0.3 < RE < 0.15$, $RE_{max} = 0.138$ και $RE_{min} = -0.252$ (Oscar, 2005).

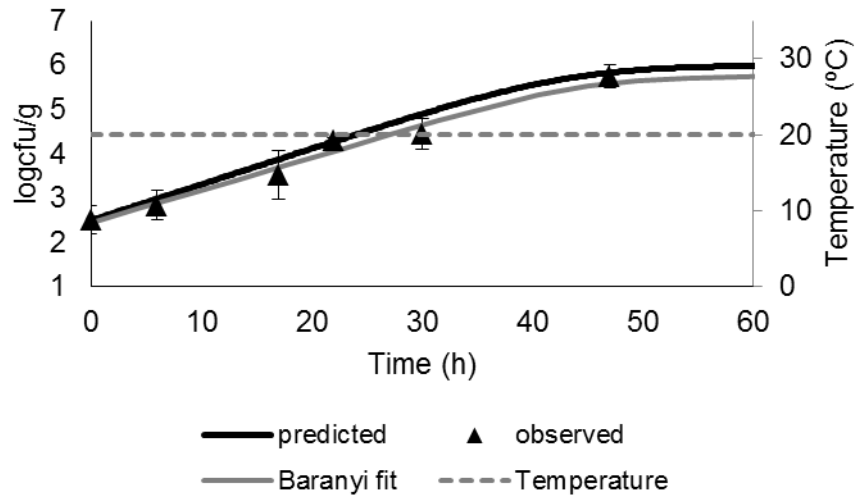
6.4 Επαλήθευση μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια

Σε δείγματα στρειδιού προσδιορίστηκε η ανάπτυξη του παθογόνου *V. Parahaemolyticus* σε 4 ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (15, 20, 23 και 30°C) και σε δυναμικές συνθήκες (τη θερμοκρασία κατέγραψε data logger). Η ανάπτυξη του *V. Parahaemolyticus* και οι ρυθμοί ανάπτυξης που προσδιορίστηκαν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων (observed στα διαγράμματα που ακολουθούν) στο μοντέλο Baranyi (Baranyi fit στα διαγράμματα που ακολουθούν), συγκρίθηκαν με τις προβλέψεις από την εξίσωση (4.3) που παρουσιάστηκε παραπάνω (predicted στα διαγράμματα που ακολουθούν).

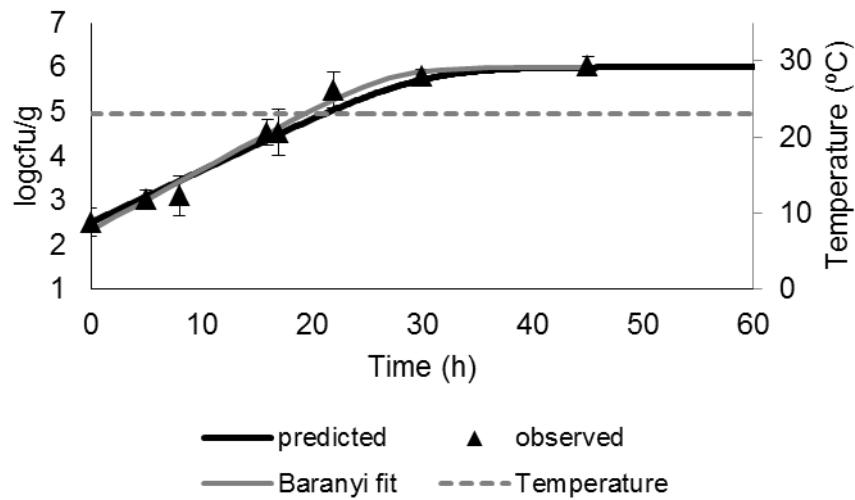


Σχήμα 6.21 Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε $T=15^{\circ}C$.

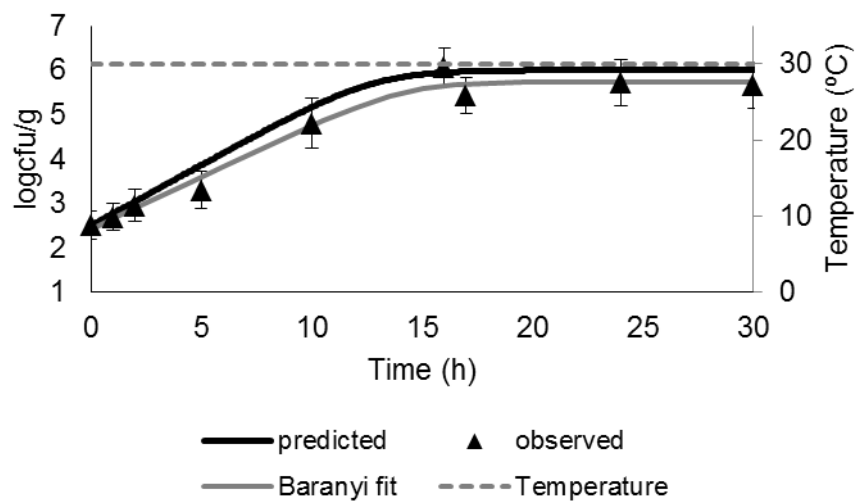
6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ



Σχήμα 6.22 Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε $T=20^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 6.23 Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε $T=23^{\circ}\text{C}$.

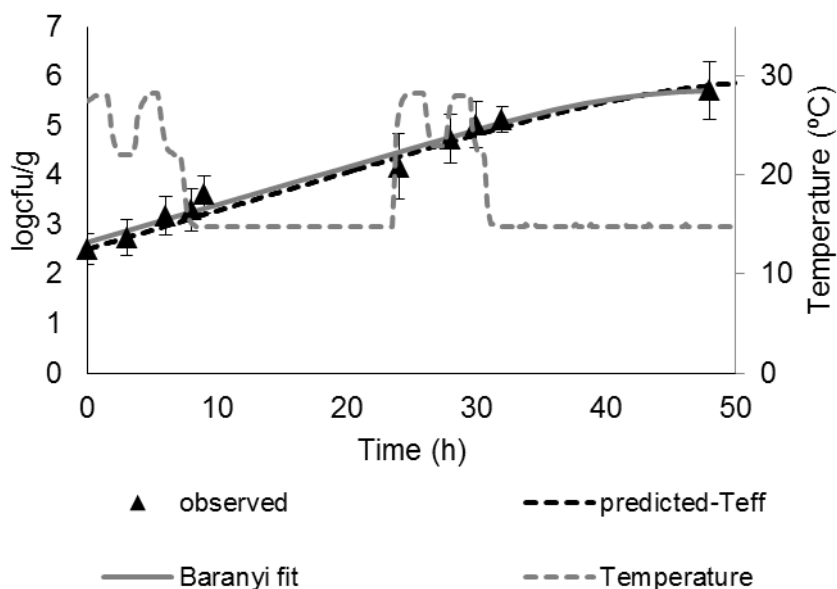


Σχήμα 6.24 Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε $T=30^{\circ}\text{C}$.

6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ

Πίνακας 6.10 Τιμές E_A και k_{ref} για την ανάπτυξη του *V.parahaemolyticus* ($T_{ref}=15^{\circ}C$)

E_A (kJ/mol)	k_{ref} (h^{-1})	R^2
78.9	0.047	0.969



Σχήμα 6.25 Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακά προφίλ

Η μέση θερμοκρασία στο μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακά προφίλ βρέθηκε ίση με $T_{eff}=19,7^{\circ}C$.

Πίνακας 6.11 Θεωρητικοί και πειραματικοί ρυθμοί ανάπτυξης του παθογόνου *V. parahaemolyticus*

T ($^{\circ}C$)	k_{pred} (h^{-1})	k_{exp} (h^{-1})	%RE
15	0.043	0.049±0.0035	14.0
20	0.081	0.073±0.0069	-9.9
23	0.118	0.136±0.0112	15.3
30	0.274	0.235±0.023	-14.2
var	0.081	0.077±0.0065	-4.9

Παρατηρείται ότι το % σφάλμα πρόβλεψης (RE) είναι για όλες τις περιπτώσεις πολύ χαμηλότερο από το όριο $\pm 20\%$ που χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία ως κριτήριο εφαρμογής του μαθηματικού μοντέλου (Dalgaard et al., 1997; Gougouli et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα τα ακριβή όρια του σφάλματος πρόβλεψης είναι $-0.3 < RE < 0.15$, $RE_{max}=0.138$ και $RE_{min}=-0.252$ (Oscar, 2005).

6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ
ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΡΕΙΔΙΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι τα μαθηματικά μοντέλα μπορούν αποτελεσματικά να προβλέψουν την ανάπτυξη του *V.parahaemolyticus* σε στρείδια σε θερμοκρασίες 15-30°C.

7. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΡΕΙΔΙΩΝ

7.1 Εισαγωγή

Αντικείμενο του κεφαλαίου αυτού αποτέλεσε η μελέτη για την επιλογή των κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας στρειδιού. Προσαρτήθηκαν στα τρυβλία των δειγμάτων στρειδιών, όλων των θερμοκρασιών που διεξήχθη το πείραμα, οι ενζυμικοί δείκτες LP_50U, LP_100U, LP_200U και LP_400U (οι δείκτες αυτοί εκτιμήθηκαν ότι θα είχαν την καλύτερη προσέγγιση, σύμφωνα με μελέτη που είχε προϋγηθεί).

Στη συνέχεια, έγινε μελέτη της συσχέτισης των πειραματικών αποκρίσεων των ΤΤΙ με τις θεωρητικές (υπολογισμένες από το μαθηματικό μοντέλο) για επαλήθευση της αξιοπιστίας των ΤΤΙ. Έπειτα, στόχο αποτέλεσε η μετάφραση της ένδειξης του ΤΤΙ σε ποιότητα και σε εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου.

Σημειώνεται ότι το οπτικά παρατηρούμενο τελικό σημείο των ενζυμικών ΤΤΙ αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης σε τιμή απόκρισης $X = \text{norm}(a+b) = 0.8$ και ότι για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε αρχικό φορτίο στρειδιού ίσο με $2 \log \text{cfu/g}$ και όριο λήξης ίσο με $6 \log \text{cfu/g}$.

7.2 Επιλογή κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας στρειδιών

Για να επιλεγούν οι κατάλληλοι ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας του μελετώμενου τροφίμου, πρέπει να γίνει η συσχέτιση των χρόνων ζωής των ΤΤΙ με εκείνων του τροφίμου. Για να πραγματοποιηθεί η συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ και του χρόνου ζωής του στρειδιού, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η **Ενέργεια Ενεργοποίησης** και οι **χρόνοι ζωής** του τροφίμου και των ΤΤΙ να έχουν παραπλήσιες τιμές ($E_{A(\text{τροφίμου})} = E_{A(\text{ΤΤΙ})}$ και $k_{\text{ref}(\text{τροφίμου})} = k_{\text{ref}(\text{ΤΤΙ})}$). Έχει διαπιστωθεί ότι σε περίπτωση που η διαφορά των $E_{A(\text{τροφίμου})}$ και $E_{A(\text{ΤΤΙ})}$ είναι μικρότερη από 40 kJ/mol , τότε το σφάλμα στην εκτίμηση της ποιότητας θα είναι λιγότερο από 15%, το οποίο σε αρκετές περιπτώσεις είναι αποδεκτό (Taoukis and Labuza, 1989a).

7. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΡΕΙΔΙΩΝ

- Για τις χαμηλές θερμοκρασίες (θερμοκρασίες ψύξης) 0-15° C έγινε συσχέτιση του ΤΤΙ με τα στρείδια που αναλύθηκαν μικροβιολογικά (προσδιορισμός ψευδομονάδων) και σύγκριση του χρόνου ζωής του.
- Για τις υψηλές θερμοκρασίες 15-30°C έγινε συσχέτιση του ΤΤΙ με το χρόνο ζωής που προσδιορίστηκε από τις μικροβιολογικές αναλύσεις μελέτης του παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus*, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες 15, 20, 23 και 30°C.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι πειραματικοί χρόνοι ζωής των στρειδιών για τις μελετούμενες θερμοκρασίες 0-15°C.

Πίνακας 7.1 Χρόνοι ζωής στρειδιών σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15° C

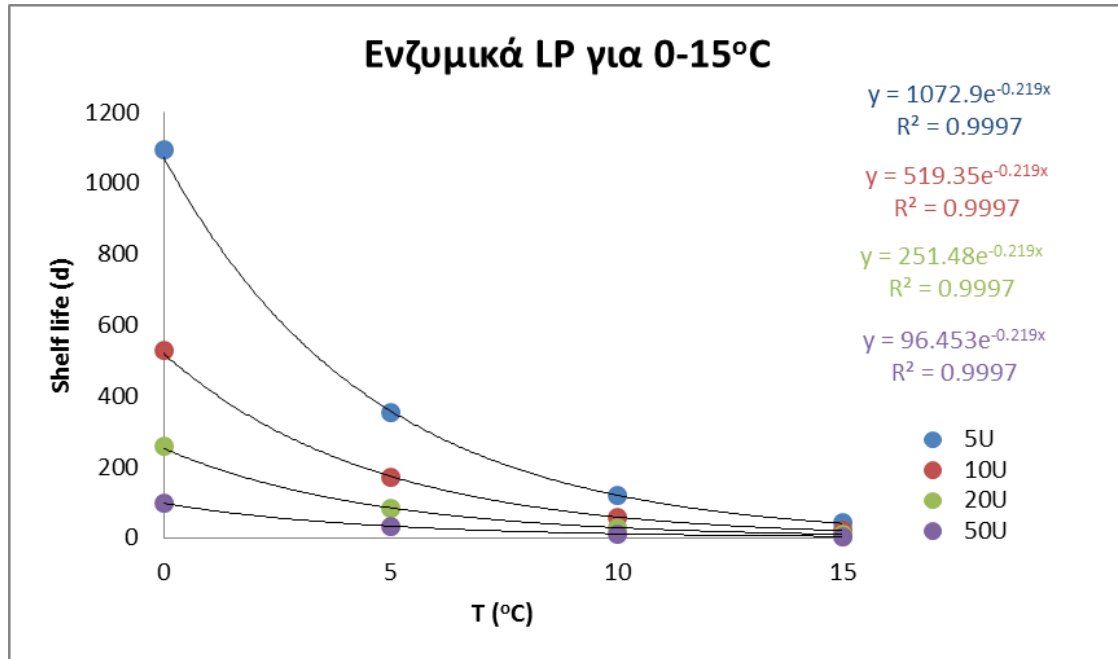
T (°C)	0	5	10	15
t (d)	13	8	5	3

7.2.1 Συσχέτιση του χρόνου ζωής στρειδιών με την απόκριση των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP

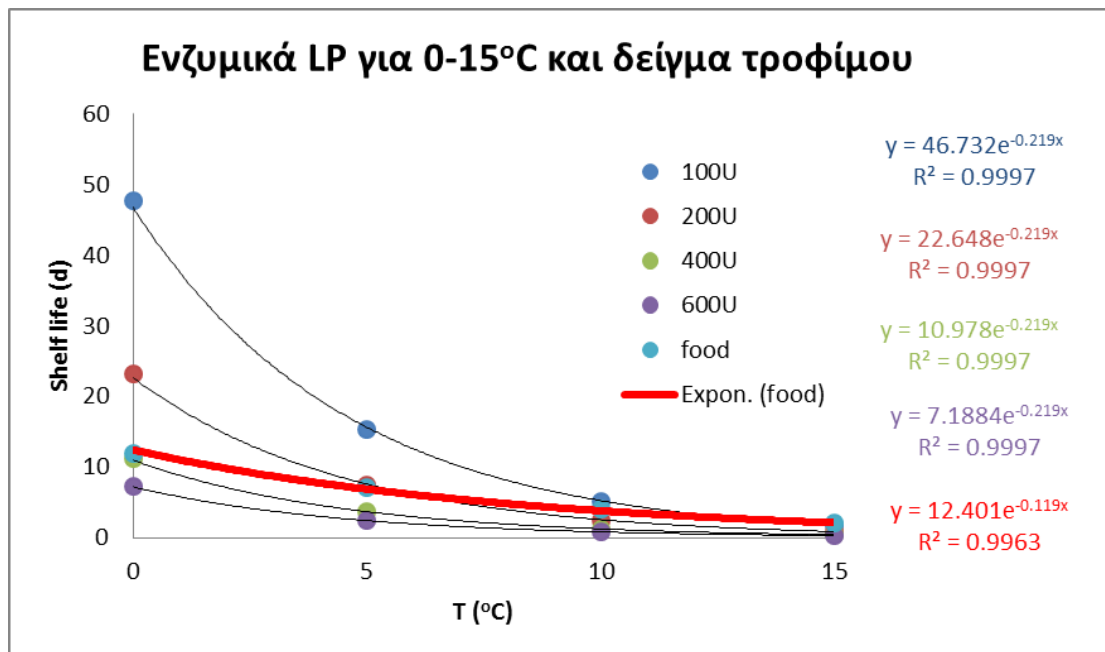
Στο κεφάλαιο 5 υπολογίστηκαν και παρουσιάστηκαν οι θεωρητικοί χρόνοι απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP των μελετούμενων συγκεντρώσεων με τη βοήθεια του προγράμματος Solver στο Excel για τα θερμοκρασιακά εύρη 0-15°C και 15-30°C (Πίνακες 5.32 και 5.34).

Στην προσπάθεια εύρεσης της κατάλληλης συγκέντρωσης υποστρώματος ενζυμικού δείκτη LP για την παρακολούθηση της υποβάθμισης της ποιότητας και ασφάλειας στρειδιών χρησιμοποιήθηκαν τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα που προσδιορίστηκαν.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των χρόνων ζωής του ενζυμικού ΤΤΙ με εκείνη του τροφίμου. Στα διαγράμματα που ακολουθούν αποτυπώνονται οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών ΤΤΙ για τα μελετούμενα θερμοκρασιακά εύρη, καθώς και η συσχέτισή τους με τη χρόνο ζωής του στρειδιού. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο χρόνος ζωής του τροφίμου.



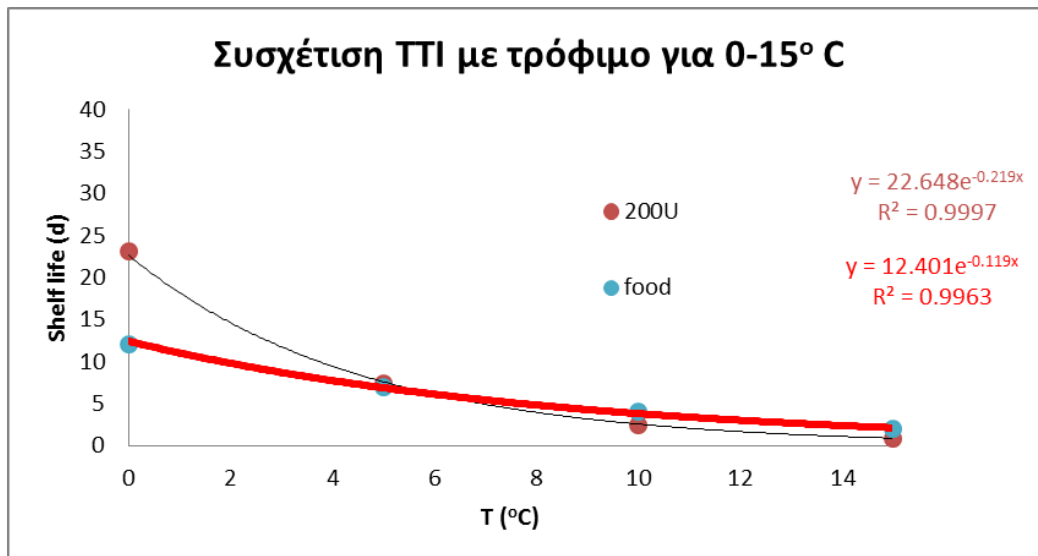
Σχήμα 7.1 Εκθετική προσαρμογή ενζυμικών LP_ΤΤΙ για θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C και συγκεντρώσεις ενζύμων 5, 10, 20 και 50U



Σχήμα 7.2 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών LP_ΤΤΙ με το χρόνο ζωής στρεϊδιού σε χαμηλές θερμοκρασίες (0-15°C).

Στο σχήμα (7.2) παρατηρείται ότι το ενζυμικό ΤΤΙ LP_200U θα μπορούσε να συσχετιστεί με τα στρεΐδια, καθώς παρουσιάζει την καλύτερη δυνατή προσέγγιση για τις διάφορες μελετούμενες θερμοκρασίες.

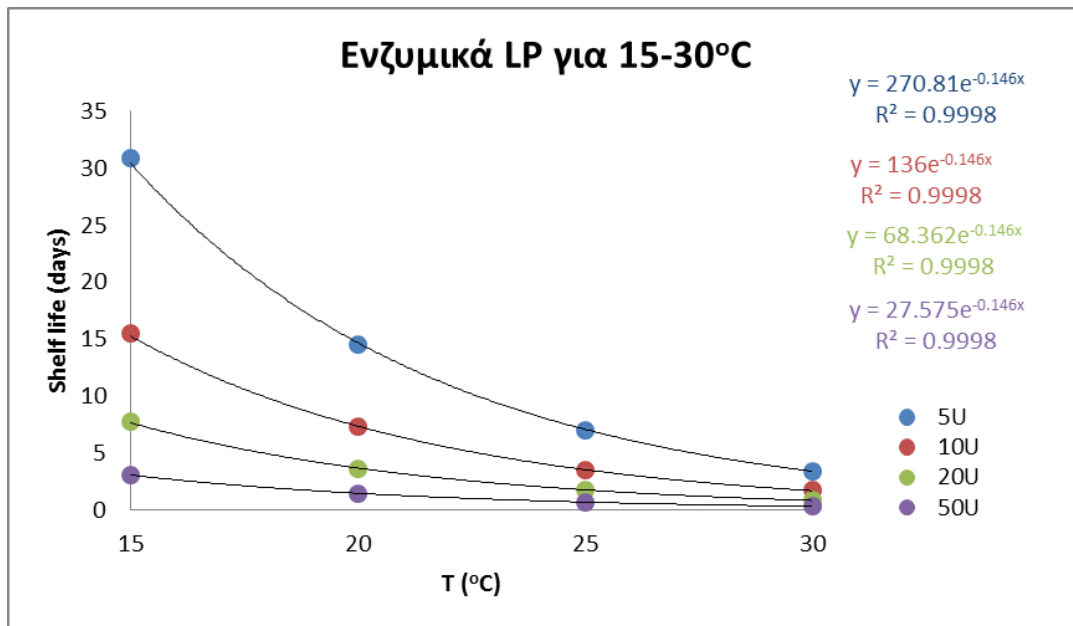
Στο σχήμα (7.3) απεικονίζεται η συσχέτιση του συγκεκριμένου ΤΤΙ με το τρόφιμο.



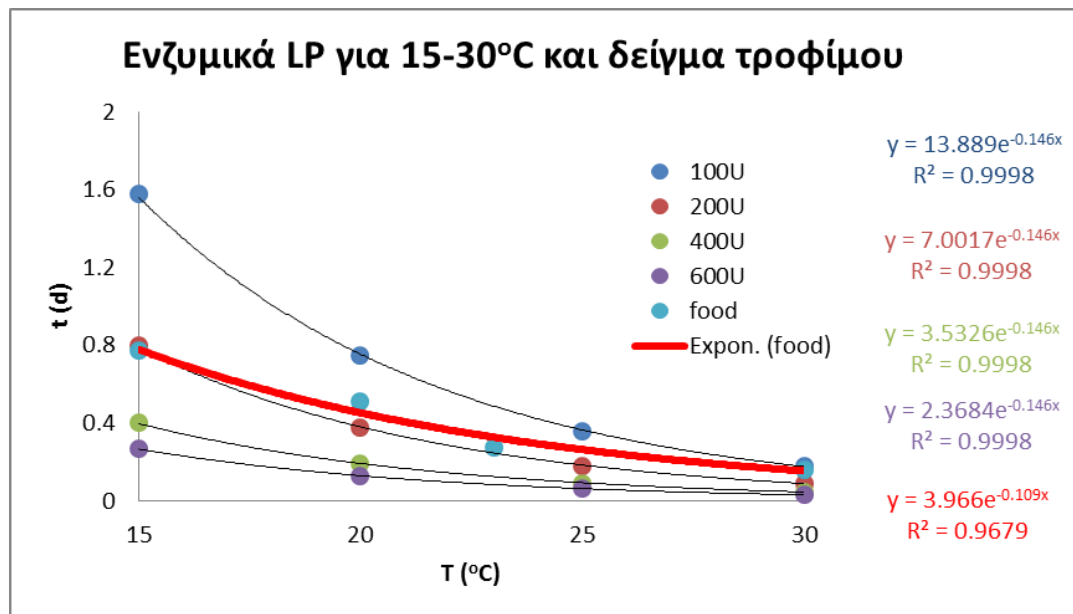
Σχήμα 7.3 Συσχέτιση χρόνου ζωής του μελετούμενου ΤΤΙ LP_200U με το χρόνο ζωής στρειδιών σε χαμηλές θερμοκρασίες (0-15°C)

Για θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 5°C (κρίσιμο θερμοκρασιακό εύρος) το ΤΤΙ εμφανίζεται να λήγει ελάχιστα γρηγορότερα προστατεύοντας τον καταναλωτή από πιθανή κατανάλωση μη αποδεκτής ποιότητας προϊόντος. Έχει γίνει σωστή επιλογή δείκτη, ώστε το ΤΤΙ να δρα συντηρητικά. Στις χαμηλότερες θερμοκρασίες μελέτης, 0-5°C, ο δείκτης λήγει αρκετά πιο αργά από το τρόφιμο, κάτι το οποίο συνίσταται αφού ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου.

Μπορεί να μην παρατηρείται απόλυτη ταύτιση μεταξύ δείκτη και τροφίμου, γι' αυτό και υπάρχει απόκλιση μεταξύ των Ενεργειών Ενεργοποίησης ($E_{A(TTI)}=142.6$ kJ/mol και $E_{A(τροφίμου)}=66.8$ kJ/mol), παρ' όλ' αυτά η επιλογή του συγκεκριμένου ΤΤΙ δρα επικουρικά για τη σωστή χρήση και κατανάλωση του τροφίμου.



Σχήμα 7.4 Εκθετική προσαρμογή ενζυμικών LP_ΤΤΙ για θερμοκρασίες 15, 20, 23 και 30°C και συγκεντρώσεις ενζύμων 5, 10, 20 και 50U



Σχήμα 7.5 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών LP_ΤΤΙ με τον απαιτούμενο χρόνο 3*χρόνο διπλασιασμού του *V.parahaemolyticus* σε στρείδια σε υψηλές θερμοκρασίες (15-30°C).

Στο Σχήμα 7.5 παρατηρείται ότι το ενζυμικό ΤΤΙ LP_200U θα μπορούσε να συσχετιστεί με τα στρείδια, καθώς παρουσιάζει την καλύτερη δυνατή προσέγγιση για τις διάφορες μελετούμενες θερμοκρασίες.

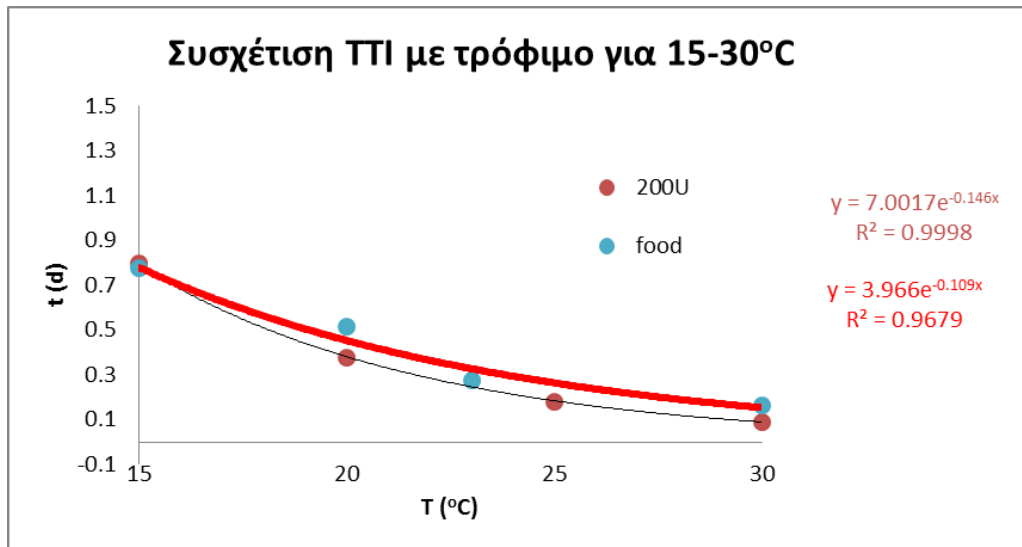
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ο απαιτούμενος χρόνος 3*χρόνο διπλασιασμού του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια στο εύρος θερμοκρασιών 15-30°C.

7. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΡΕΙΔΙΩΝ

Πίνακας 7.2 χρόνος 3*χρόνο διπλασιασμού του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια στο εύρος θερμοκρασιών 15-30°C

T (°C)	15	20	23	30
t (d)	0.77	0.51	0.28	0.16

Στο Σχήμα 7.6 απεικονίζεται η συσχέτιση του συγκεκριμένου ΤΤΙ με το τρόφιμο.



Σχήμα 7.6 Συσχέτιση χρόνου ζωής του μελετούμενου ΤΤΙ LP_200U με τον απαιτούμενο χρόνο 3*χρόνο διπλασιασμού του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια σε υψηλές θερμοκρασίες (15-30°C)

Παρατηρείται ότι η απόκριση του ΤΤΙ LP_200U συσχετίζεται ικανοποιητικά με την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* στο θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C. Η τιμή 3*χρόνος διπλασιασμού επιλέχθηκε ως απαιτούμενος χρόνος για πιθανή ανάπτυξη του παθογόνου σε μη αποδεκτά επίπεδα εφόσον το προϊόν έχει συντηρηθεί σε θερμοκρασιακές συνθήκες κατάλληλες για την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus*, δεδομένου ότι υπάρχει αρχική επιμόλυνση των στρειδιών σε θεωρητικό φορτίο 2 logcfu/g.

Για όλο το θερμοκρασιακό εύρος (15-30°C) το επιλεγμένο ΤΤΙ προβλέπει συντηρικά την πιθανή ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus*, προστατεύοντας τον καταναλωτή από πιθανή κατανάλωση μη αποδεκτής ποιότητας και ασφάλειας προϊόντος.

8. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών ΤΤΙ με ένζυμο τη *Rhizopus oryzae* λιπάση και υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης τριπαλμιτίνης (τύπου LP) καθώς και η επιλογή κατάλληλων δεικτών για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας στρειδιών κατά τη συντήρηση και διακίνησή τους σε πραγματικές συνθήκες.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ σε δύο θερμοκρασιακά εύρη (0-15°C και 15-30°C) για τον υπολογισμό των συναρτήσεων απόκρισης των διαφόρων μελετηθέντων δεικτών ΤΤΙ στις παραπάνω θερμοκρασίες.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης σε στρείδια και επαλήθευση του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus*, με απώτερο σκοπό την επιλογή κατάλληλων δεικτών για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας των στρειδιών. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της συσχέτισης ανάπτυξης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και της κινητικής απόκρισης επιλεγμένων ΤΤΙ.

Κινητική μελέτη ενζυμικών δεικτών ΤΤΙ

Οι ενζυμικοί χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν ήταν τύπου LP με συγκέντρωση ενζύμου 5U, 10U, 20U, 50U, 100U, 200U, 400U και 600U σε θερμοκρασίες ψύξης (0-15°C) αλλά και υψηλότερες (15-30°C).

Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή σιγμοειδούς καμπύλης $F(X_C)$ στο υπολογιστικό πρόγραμμα Sigmaplot 10.0, και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 , k_2 για κάθε θερμοκρασία. Με τη βοήθεια του προγράμματος Systat 10.2 και με τη χρήση τη εξίσωσης (5.3) προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (E_A , k_{1ref} , k_{2ref} , R_2) κάθε ενζυμικού δείκτη (Πίνακες 5.25, 5.27), καθώς και η διάρκεια ζωής τους (Πίνακες 5.26, 5.28).

Η θερμοκρασία των 15°C παρουσιάζεται και στα δύο θερμοκρασιακά εύρη. Ωστόσο, υπολογίζεται με χρήση του μοντέλου του χαμηλού θερμοκρασιακού εύρους 0-15°C,

καθώς παρουσιάζει καλύτερη συσχέτιση πειραματικής με θεωρητικής τιμής και οι αποκλίσεις είναι εντός επιτρεπτών ορίων (95%).

Πίνακας 5.26 Ενέργειες ενεργοποίησης και διάρκειες ζωής των ενζυμικών ΤΤΙ για το θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C ($T_{ref}=15^{\circ}C$)

Τύπος ενζυμικού ΤΤΙ	E_A (kJ/mol)	Διάρκεια ζωής του κάθε δείκτη σε (d)			
		0°C	5°C	10°C	15°C
LP_5U	107.6	224	214	89.3	41.0
LP_10U	125.3	181	136	53.1	19.8
LP_20U	135.0	187	72.4	29.8	9.76
LP_50U	140.2	106	37.7	13.9	4.18
LP_100U	141.6	52.2	16.8	7.24	1.95
LP_200U	142.6	21.9	6.76	3.21	0.836
LP_400U	145.5	11.6	2.64	1.48	0.338
LP_600U	146.4	7.45	2.17	0.851	0.231

Πίνακας 5.28 Ενέργειες ενεργοποίησης και διάρκειες ζωής των ενζυμικών ΤΤΙ για το θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C ($T_{ref}=15^{\circ}C$)

Τύπος ενζυμικού ΤΤΙ	E_A (kJ/mol)	Διάρκεια ζωής του κάθε δείκτη σε (d)			
		15°C	20°C	25°C	30°C
LP_5U	151.7	41.0	9.72	4.72	-
LP_10U	165.0	19.8	5.00	2.30	-
LP_20U	152.8	9.76	3.77	1.16	-
LP_50U	110.1	4.18	1.28	0.873	0.423
LP_100U	95.1	1.95	0.56	0.317	0.223
LP_200U	92.7	0.836	0.276	0.161	0.104
LP_400U	87.1	0.338	0.148	0.101	0.060
LP_600U	85.1	0.231	0.104	0.073	0.047

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αποτελεσμάτων για τα ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP και το μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος μελέτης προσδιορίστηκαν δύο συνολικά μαθηματικά μοντέλα. Τα μοντέλα περιγράφηκαν από την παρακάτω σχέση (Εξίσωση 5.7), η οποία προέκυψε έπειτα από αντικατάσταση της σχέσης Arrhenius στη συνάρτηση απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ.

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1ref} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2ref} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (5.7)$$

Για τα δύο μελετούμενα θερμοκρασιακά εύρη, τα **μαθηματικά μοντέλα** που προέκυψαν μέσω της εξίσωσης (5.7) είναι τα εξής:

- Για $0 \leq T \leq 15^\circ\text{C}$

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{3410 C^{-1.03} \exp\left[17251.1 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right] - t}{1356.4 C^{-1.08} \exp\left[17251.1 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right]}\right)}$$

- Για $15 < T \leq 30^\circ\text{C}$

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{2147.4 C^{-0.96} \exp\left[12725.2 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right] - t}{1102.7 C^{-1.05} \exp\left[12725.2 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{288.15}\right)\right]}\right)}$$

Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι θεωρητικές τιμές της διάρκειας ζωής όλων των μελετώμενων δεικτών.

Πίνακας 5.32 Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών TTI όπως έχουν προκύψει από το μαθηματικό μοντέλο για το θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C

Ενζυμικά TTI τύπου LP				
Response time (d) Θεωρητική διάρκεια ζωής				
T(°C)	0	5	10	15
5U	1094	352	118	40.9
10U	530	170	56.9	19.8
20U	257	82.4	27.6	9.58
50U	98.4	31.6	10.6	3.67
100U	47.7	15.3	5.12	1.78
200U	23.1	7.42	2.48	0.862
400U	11.2	3.60	1.20	0.418
600U	7.33	2.36	0.788	0.274

Πίνακας 5.34 Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών TTI όπως έχουν προκύψει από το μαθηματικό μοντέλο για το θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C

Ενζυμικά TTI τύπου LP				
Response time (d) Θεωρητική διάρκεια ζωής				
T(°C)	15	20	25	30
5U	30.8	14.5	7.01	3.47
10U	15.5	7.29	3.52	1.74
20U	7.78	3.67	1.77	0.876
50U	3.14	1.48	0.714	0.353
100U	1.58	0.745	0.360	0.178

200U	0.797	0.375	0.181	0.090
400U	0.402	0.189	0.091	0.045
600U	0.270	0.127	0.061	0.030

Διαπιστώθηκε ότι όλα τα ΤΠΙ είχαν υψηλό συντελεστή προσαρμογής R^2 , το οποίο αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΠΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΠΙ, τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση του ρυθμού μεταβολής χρώματος. Επίσης, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΠΙ, μειώνεται και η διάρκεια ζωής του, αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου, τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται και η ενζυμική αντίδραση. Για τις χαμηλές θερμοκρασίες (0-15°C) η Ενέργεια Ενεργοποίησης E_A φάνηκε να αντιστοιχεί σε τιμή ίση με 143.4 kJ/mol, ενώ για τις υψηλές (15-30°C) ίση με 105.8 kJ/mol. Απόκλιση από την εκτιμώμενη τιμή παρουσίασαν οι δείκτες χαμηλής συγκέντρωσης ενζύμου (LP_5U και LP_10U) γιατί η μεταβολή της χρωματικής εξέλιξής τους στους 0°C και 5°C ήταν σε αρκετά πρώιμο στάδιο και τα αποτελέσματα προέκυψαν μέσω προεκβολής. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δείκτες με χαμηλή συγκέντρωση ενζύμου (5-20 Units) σε θερμοκρασία 30°C, παρουσίασαν παρεμπόδιση της χρωματικής εξέλιξης των δεικτών, λόγω μερικής απενεργοποίησης του περιεχόμενου στο ΤΠΙ ενζύμο.

Για την αξιοπιστία των ενζυμικών δεικτών, πραγματοποιήθηκε μελέτη της απόκρισης του ενζυμικού δείκτη LP_100U σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ($T_{\text{eff}}=7.4^\circ\text{C}$) και διαπιστώθηκε ότι ο δείκτης αυτός μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστος για το συγκεκριμένο τρόφιμο.

Μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης σε στρείδια *Crassostrea gigas*

Για τη μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης σε στρείδια *Crassostrea gigas* πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές και δυναμικές συνθήκες. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων διερευνήθηκε η ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών και διαπιστώθηκε ότι ο κύριος αλλοιογόνος μικροοργανισμός είναι οι ψευδομονάδες, αφού ο αριθμός τους στα δείγματα, δεν

απέχει ιδιαίτερα από το ύψος του ολικού μικροβιακού φορτίου. Παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας, δηλαδή η υψηλότερη θερμοκρασία οδηγεί σε ταχύτερη ανάπτυξη μικροοργανισμών. Ως όριο απόρριψης παρατηρήθηκε η τιμή $\log N=6$ cfu/g.

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιήθηκε μέτρηση pH αλλά και οργανοληπτική αξιολόγηση. Με αύξηση του πληθυσμού των ψευδομονάδων, παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του pH (pH=6.4-6.9). Οργανοληπτικά διαπιστώθηκε ότι με την πάροδο των ημερών και την αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης των δειγμάτων ο ρυθμός μείωσης αρέσκειας της οσμής, της εμφάνισης αλλά και της συνολικής εντύπωσης από τους δοκιμαστές αυξάνεται με μεγάλο ρυθμό. Όσον αφορά την οσμή, τα δείγματα σε υψηλές θερμοκρασίες είναι μη αποδεκτά από τους δοκιμαστές μετά από μόλις 2-3 ημέρες αποθήκευσης. Επομένως, ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων έχει σημαντική επίδραση σε όλες τις μελετούμενες παραμέτρους.

Με επεξεργασία των αποτελεσμάτων αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης της ανάπτυξης ψευδομονάδων σε στρείδια (μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης της μικροβιολογικής αλλοίωσης των στρειδιών), πάνω στο οποίο στηρίχθηκε μετέπειτα και η επιλογή του κατάλληλου χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη. Εγινε προσομοίωση των μικροβιολογικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi και προέκυψαν οι ρυθμοί ανάπτυξης για κάθε θερμοκρασία (Πίνακας 6.6). Εκτιμήθηκε ότι με αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης, αυξάνεται ο εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης, τόσο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας όσο και των ψευδομονάδων, δηλαδή το τρόφιμο αλλοιώνεται πιο γρήγορα. Έπειτα, με τη βοήθεια των ρυθμών αυτών των ψευδομονάδων και χρήση της εξίσωσης 6.1, προσδιορίστηκαν οι πειραματικοί χρόνοι ζωής του προϊόντος στις μελετώμενες θερμοκρασίες (Πίνακας 6.8). Χρησιμοποιώντας το γραμμικοποιημένο μοντέλο Arrhenius, υπολογίζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (E_A , k_{ref}) (Πίνακας 6.7) και προκύπτει η ακόλουθη εξίσωση ανάπτυξης ψευδομονάδων σε στρείδια:

$$\log N = 2 + \left(0.4758 + \exp \left(8035.7 \left(\frac{1}{277.15} - \frac{1}{T} \right) \right) \right) t \quad (6.4)$$

Υπολογίστηκε ότι σε θερμοκρασία 0°C, η διάρκεια ζωής του τροφίμου αντιστοιχεί σε 13 ημέρες, στους 5°C σε 8 ημέρες, στους 10°C σε 5 ημέρες και στους 15°C σε 3 ημέρες. Ακολούθως, έγινε επαλήθευση του μοντέλου σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες ($T_{\text{eff}}=7.4^\circ\text{C}$).

Στη συνέχεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε επαλήθευση μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια, σε ισοθερμοκρασιακές και μη συνθήκες.

Σε δείγματα στρειδιού μετρήθηκε η ανάπτυξη του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε 4 ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (15, 20, 23 και 30°C) και σε δυναμική συνθήκη. Σύμφωνα με τον FDA (2005), οι ρυθμοί ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* σε θρεπτικό υλικό υπολογίζονται από το ακόλουθο μοντέλο (Miles et al., 1997), με τιμή ενεργότητας του νερού ίση με τη βέλτιστη τιμή $a_{w,\text{opt}}=0.985$.

$$\sqrt{k_{vp}} = \frac{b (T - T_{\min}) ((1 - \exp(c (T - T_{\max}))) \sqrt{(a_w - a_{w,\min}) (1 - \exp(d (a_w - a_{w,\max})))})}{\sqrt{\ln(10)}}$$

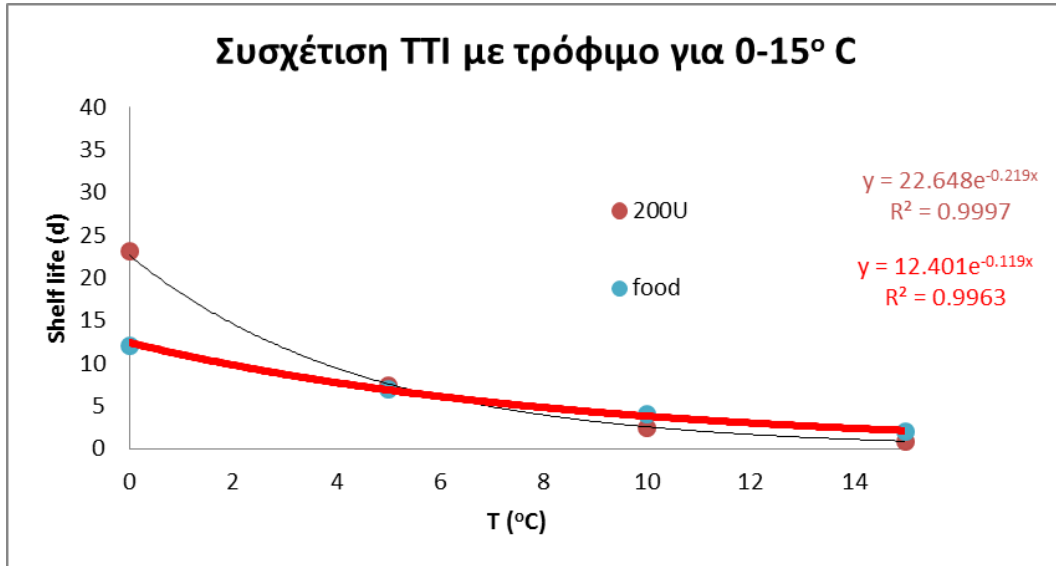
Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι το μαθηματικό μοντέλο που μελετήθηκε μπορεί αποτελεσματικά να προβλέψει την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* στα στρείδια σε θερμοκρασίες 15-30°C.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης η οποία προσδιορίστηκε ίση με 78.9 kJ/mol για $T_{\text{ref}}=15^\circ\text{C}$.

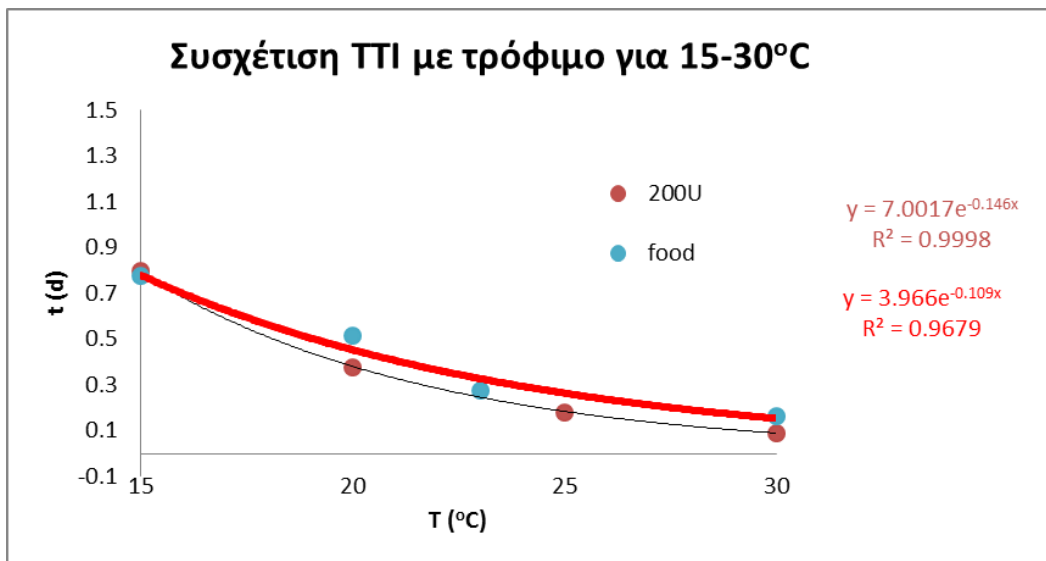
Επιλογή κατάλληλου χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας στρειδιών

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη όχι μόνο αλλοιογόνων αλλά και παθογόνων μικροοργανισμών και επιτυχής συσχέτιση της ανάπτυξής τους με τη κινητική απόκρισης επιλεγμένων ΤΤΙ. Για τη συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ και της εναπομένουσας διάρκειας ζωής των στρειδιών, συγκρίθηκαν οι Ενέργειες Ενεργοποίησης του ρυθμού μικροβιακής

ανάπτυξης και οι χρόνοι ζωής του τροφίμου με τις κινητικές παραμέτρους της απόκρισης των ΤΤΙ.



Σχήμα 7.3 Συσχέτιση χρόνου ζωής του μελετούμενου ΤΤΙ LP_200U με το χρόνο ζωής στρειδιών σε χαμηλές θερμοκρασίες 0-15°C



Σχήμα 7.6 Συσχέτιση χρόνου ζωής του μελετούμενου ΤΤΙ LP_200U με απαιτούμενο χρόνο 3*χρόνο διπλασιασμού του *V.parahaemolyticus* σε στρείδια σε υψηλές θερμοκρασίες 15-30°C

Διαπιστώθηκε ότι ο δείκτης με την καλύτερη συσχέτιση για την ανάπτυξη αλλοιογόνων αλλά και παθογόνων μικροοργανισμού ήταν ο LP_200U, ο οποίος δρα συντηρητικά προστατεύοντας τον καταναλωτή από πιθανή κατανάλωση μη αποδεκτής ποιότητας και ασφάλειας προϊόντος. Στο κρίσιμο θερμοκρασιακό εύρος ($T \geq 5^\circ\text{C}$) το ΤΤΙ εμφανίζεται να λήγει ελάχιστα γρηγορότερα προστατεύοντας τον καταναλωτή από πιθανή κατανάλωση μη αποδεκτής ποιότητας προϊόντος, ενώ σε

χαμηλότερες θερμοκρασίες (0-5°C) ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία είναι τα ακόλουθα:

- Από την κινητική μελέτη των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) αποδείχθηκε ότι για τους ενζυμικούς δείκτες τύπου LP, με αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου (Units), μειώθηκε η διάρκεια ζωής του δείκτη.
- Για τους δείκτες LP ίδιας συγκέντρωσης ενζύμου (Units) με αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης διαπιστώθηκε μείωση της διάρκειας ζωής του δείκτη.
- Για κάθε ένα από τα μελετηθέντα ΤΤΙ τύπου LP πραγματοποιήθηκαν 5 πειραματικές επαναλήψεις (μελέτη 5 ετικετών ανά τύπο ΤΤΙ για κάθε θερμοκρασιακή συνθήκη) και παρατηρήθηκε πολύ καλή επαναληψιμότητα. Επομένως, επιβεβαιώθηκε ότι ο αριθμός των 5 πειραματικών επαναλήψεων είναι ικανοποιητικός για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.
- Εκτιμήθηκε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών τιμών των χρόνων απόκρισης των ΤΤΙ με τις αντίστοιχες θεωρητικές τιμές που προέκυψαν από τα μαθηματικά μοντέλα απόκρισης.
- Παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή προεκβολής για τον υπολογισμό του χρόνου απόκρισης δημιούργησε τις μόνες αποκλίσεις που εμφάνισαν οι δείκτες LP από το θεωρητικό μοντέλο.
- Σε $T=30^{\circ}\text{C}$, οι δείκτες LP με χαμηλή συγκέντρωση ενζύμου (5-20 Units) παρουσίασαν μερική απενεργοποίηση του περιεχόμενου ενζύμου και παρεμπόδισαν τη χρωματική εξέλιξη του δείκτη.
- Για την εύρεση του κατάλληλου χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη για τη διαχείριση ασφάλειας και ποιότητας κάθε τροφίμου επιβεβαιώθηκε ότι τα κινητικά χαρακτηριστικά των παραγόντων αλλοίωσής του πρέπει να σχετίζονται με τα αντίστοιχα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη.

- Σε περίπτωση απόκλισης μεταξύ των ενεργειών ενεργοποίησης του παράγοντα αλλοίωσης του τροφίμου και του δείκτη, για την καλύτερη συσχέτιση πάντα πρέπει να επιλέγεται η πιο συντηρητική επιλογή προστατεύοντας τον καταναλωτή από πιθανή έκθεση σε κίνδυνο.
- Η απόκλιση της θερμοκρασίας του τροφίμου από τα επιτρεπτά όρια μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή.
- Στα μελετηθέντα στρεΐδια (*Crassosterea gigas*) παρατηρήθηκε ότι κυρίαρχο είδος αλλοιογόνων μικροοργανισμών αποτελούν οι ψευδομονάδες, που με αύξηση του πληθυσμού τους οδηγούν σε αύξηση του pH του τροφίμου.
- Μελετήθηκε η ανάπτυξη του *Vibrio parahaemolyticus* σε θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C, επαληθεύοντας θεωρητικό μαθηματικό μοντέλο.
- Η απόκριση των κατάλληλων ΤΠΙ εξέφρασε το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό των μελετούμενων προϊόντων. Συγκεκριμένα η απόκριση του δείκτη LP_200U παρατηρήθηκε να συσχετίζεται ικανοποιητικά με τη εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου σε εύρος 0-15°C αλλά και να ακολουθεί επαρκώς το μοντέλο ανάπτυξης του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σε θερμοκρασιακό εύρος 15-30°C.
- Κατάλληλα ΤΠΙ μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για την παρακολούθηση της διάρκειας ζωής του τροφίμου κατά τη ψύξη, διανομή και αποθήκευση των στρεΐδιών, συσχετίζοντας την ανάπτυξη όχι μόνο αλλοιογόνων αλλά και παθογόνων μικροοργανισμών με την ποιότητα και ασφάλεια του τροφίμου.

Για τη συνέχιση της παρούσας έρευνας προτείνονται τα ακόλουθα:

- Η συνέχιση των πειραμάτων που δεν ολοκληρώθηκαν και η ενσωμάτωση των δεδομένων στο κινητικό μοντέλο απόκρισης των ΤΠΙ για τον προσδιορισμό των κινητικών χαρακτηριστικών και του χρόνου λήξης τους.
- Η διερεύνηση της καταλληλότητας διαφόρων τύπων ΤΠΙ με διαφορετικά κινητικά χαρακτηριστικά, για τη συσχέτισή του με το τρόφιμο στο

θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C, με μικρότερη απόκλιση μεταξύ Ενεργειών Ενεργοποίησης.

- Η διεξοδική μελέτη για συσχέτιση της κινητικής απόκρισης χρονοθερμοκρασικών δεικτών ΤΠΙ με την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών και σε άλλα ευαλλοίωτα τρόφιμα, που εκτίθεται καθημερινά ο καταναλωτής, και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Baert K., Francois K., Meulenaer B. and Devlieghere F., 2009. Risk assessment: a quantitative approach, p. 19-26. In R. Costa and K. Kristbergsson (ed.), Predictive modeling and risk assessment, Springer, New York.
2. Baker-Austin C., Stockley L., Rangdale R. and Martinez-Utraza J., 2010. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective.
3. Bengtsson N., Liljemark A., Olsson P., Nilsson B., 1972. An attempt to Systemize Time-Temperature Tolerance Data as a Basis for the Development of Time-Temperature Indicators. Intl. Inst. Refrig. Bull. Suppl. 2: 303-311.
4. Buzin F., Baudon V., Cardinal M., Barille L. and Haure J., 2011. Cold storage of Pacific oysters out of water: biometry, inter valval water and sensory assessment. Innovate Food Science and Emergency Technologies 46, 1775–1782.
5. Byrne C.H., 1976. Temperature Indicators - the state of the art. Food Technol. 30(6), 66-68.
6. Cao R., Liu Q., Yin B.Z. and Zhu L.L., 2010. Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Innovate Food Science and Emergency Technologies 11, 108–112.
7. Cao R., Xue C.-H. and Liu Q., 2009. Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. International Journal of Food Microbiology 131, 272-276.
8. Cao R., Xue C.-H., Liu Q. and Xue Y., 2009. Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. Czech Journal of Food Science 27, 102- 108.
9. CDC, 2013. Increase in *Vibrio parahaemolyticus* illnesses associated with consumption of shellfish from several Atlantic coast harvest areas, United States, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

10. CDC, 2015. Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2014, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
11. Chen H., Liu Z., Wang M., Chen S. and Chena T., 2013. Characterisation of the spoilage bacterial microbiota in oyster gills during storage at different temperatures.
12. Chen J.H. and Zall R.R., 1987a. Packaged milk, cream and cottage cheese can be monitored for freshness using polymer indicator labels. *Dairy Food Sanitation*, 7 (8) 402-5.
13. Chen J.H. and Zall R.R., 1987b. Refrigerated Orange Juice can be monitored for freshness using a polymer indicator label. *Dairy Food Sanitation*, 7 280-3.
14. Cook R., 1990. Marketing food safety: A double - edged sword. *Perishable Handling (Univ. of California - Davis)*, 69.
15. Costa C., Conte A. and Del Nobile M. A., 2014. Effective preservation techniques to prolong the shelf life of ready-to-eat oysters.
16. Dalgaard P., Mejlholm O. and Huss H.H, 1997. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 38, 169-179.
17. DePaola A., Jones J. L., Woods J., Burkhardt W.III, Calci K. R., Krantz J. A., Bowers J. C., Kasturi K., Byars R. H., Jacobs E., Williams-Hill D. and Nabe K., 2010. Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2754-2768.
18. DePaola A., Presnell N. and Motes M.L., 1983. Non O1 *Vibrio cholerae* in shellfish, sediment and waters of U.S. Gulf Coast. *Journal of Food Protection* 46, 802–805.
19. Dolan K.D., Singh R.P. and Wells J.H., 1985. Evaluation of time-temperature related quality changes in ice cream during storage. *J. Food Proc. Preserv.*, (9) 253-71.
20. Ellouze M. and Austin J-C, 2010. Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. *International Journal of Food Microbiology* 138, 119-129.

21. FAO, 2007b. Future prospects for fish and fishery products. 4. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030. Part 1. European overview, FAO Fisheries Circular No. 972/4, Part 1, Food and Aquaculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
22. FDA, 2009. Backgrounder on measures to eliminate risk caused by *Vibrio vulnificus* infection from consumption of raw molluscan shellfish, Food and Drug Administration, Washington, DC .
23. Fernandez-Piquer J., Bowman P.J., Ross T., Estrada-Flores S. and Tamplin L. M., 2013. Preliminary Stochastic Model for Managing *Vibrio parahaemolyticus* and Total Viable Bacterial Counts in a Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Supply Chain. Journal of Food Protection, Vol. 76, No. 7, p. 1168-1178.
24. Fields S.C. and Prusik T., 1986. Shelf life estimation of beverage and food products using bar coded time - temperature indicator labels. In: The Shelf Life of Foods and Beverages. G.Charalambous (ed). Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 23.
25. Fu B. and Labuza T.P., 1992. Considerations for the Application of Time-Temperature Integrators in Food Distribution. Journal of Food Distribution Research, pp 9- 18.
26. Galagan Y. and Su W.-F, 2008. Fadable ink for time-temperature control of food freshness: Novel new time-temperature indicator. Food Research International 41 (2008) 653-657.
27. Gelli D.S., Mastro N.D., Moraes I.R.D. and Jakabi M., 2001. Study on the radiation sensitivity of *pathogenic vibriaceae* and *enterobacteriaceae* in vitro and after inoculation into oysters (*cassostrea brasiliiana*). In Irradiation Control of Vibrio Infection from Consumption of Raw Seafood and Fresh Produce. IAEA-TECDOC 1213. I. pp. 13-22.
28. Giannakourou M. and Taoukis P.S., 2003a. Application of a TTI-based distribution management system for quality optimisation of frozen vegetables at the consumer end. J.Food Sci. 68(1), 201-209.

29. Giannakourou M. and Taoukis P.S., 2003b. Kinetic modelling of Vitamin C loss in frozen green vegetables at variable storage conditions. *Food Chemistry*, 83, 33-4.
30. Giannakourou M., Koutsoumanis K., Nychas G-J and Taoukis P.S., 2001. Development and assessment of an intelligent shelf life decision system for quality optimization of the food chill chain. *J Food Protection* 64(7), 1051-1057.
31. Giannoglou M. N., Loukianou M., Tsatsaragou K., Tsironi T. and Taoukis P.S. 2011. Optimization of shelf life distribution of frozen fish products based on modeling and TTI monitoring, iCEF 2011 Athens.
32. Giannoglou, M., Touli, A., Platakou, E., Tsironi, T. and Taoukis, P.S., 2014. Predictive modeling and selection of TTI smart labels for monitoring the quality and shelf life of frozen seafood, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 294-301.
33. Gooch, J. A. Depaola, A., Bowers, J. and Marshall, D.L, 2002. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*, 65(6), 970–974.
34. Gougouli M., Angelidis A.S. and Koutsoumanis K., 2008. A study on the kinetic behavior of *Listeria monocytogenes* in ice cream stored under static and dynamic chilling and freezing conditions. *Journal of Dairy Science* 97, 523-530.
35. Grisius R., Wells J. H, Barret E. L. and Singh R. P., 1897. Correlation of timetemperature response with microbial growth in pasteurized milk. *J. Food Proc. Preserv.*, 11, 309-324.
36. Guadagni D.G., 1963. Time-Temperature Indicator: a laboratory evaluation, *Frosted Food Field* 36(4), 42-44.
37. Hayakawa Kan-Ichi and Yeong F. Wong, 1974. ASHRAE (American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers) Journal, p/823-827.
38. Henkel J., 1998. Irradiation: a safe measure for safer food, FDA Consumer, Publication No. (FDA) 98–2320.
39. Hills, C.G. Jr., Grieger-Block, R.A., 1980. Kinetic Data: generation, interpretation and use. *Food Technology* 34, 56-66

40. Hoi L., Larsen J.L., Dalsgaard I. and Dalsgaard A., 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Applied Environmental Microbiology* 64, 7–13.
41. Huibin C., Meiyong W., Shaojun C., Lijiao Cand Yong C., 2008. Effects of different atmospheres on qualities of oyster during frozen storage. *Trans Chinese Society of Agricultural Engineering* 24, 263–267.
42. Huss H. H., 1994. Assurance of seafood quality, FAO Fisheries technical paper 334, Food and Agriculture Organization, Rome.
43. Katz E.E. and Labuza T.P., 1981. Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. *Journal of Food Science* 46, p. 403–409.
44. Kaysner C., Abeyta C., Wekell M.M. Jr, DePaola A., Stott R.F. and Leitch J.M., 1987. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. *Applied Environmental Microbiology* 53, 1349–1351.
45. Kennedy J., Jackson V., Blair S., McDowell D. A., Cowan C. and Bolton D. J., 2005. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *Journal of Food Protection* 68, 1421-1430.
46. Kerry J. and Butler P., 2008, *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*, Edited by Joseph Kerry and Paul Butler, John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-028025.
47. Kim Y.-M., Paik H.-D. and Lee D.-S., 2002. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin- coated plastic packaging film. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 998-1002.
48. Koutsoumanis K. and Gougouli M., 2015. Use of Time Temperature Integrators in food safety management. *Food Science & Technology* 43 (2015) 236-244.
49. Koutsoumanis, K., Taoukis P.S. and Nychas G.J.E, 2004b. Development of Safety Monitoring and Assurance System for chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*, (in press).
50. Krammer A. and Farquhar J.W., 1976. Testing of Time-Temperature Indicating and Defrost Devices, *Food Technol.*, 32(2): 50, 53, 56.

51. Labuza T.P. and Contreras-Medellin R., 1981. Prediction of Moisture Protection Requirements for Foods, *Cereal Foods World* 26: 335-34.
52. Labuza T.P. and Kamman J., 1983. Reaction Kinetics and Accelerated Tests Simulation as a Function of Temperature, In: *Applications of Computers in Food Research*. Saguy, I., (Ed). Marcel Dekker, New York, chap.4.
53. Labuza T.P. and Riboh D., 1982. Theory and Application of Arrhenius Kinetics to the Prediction of Nutrient Losses in Food, *Food Technol.* 36, 66-74.
54. Labusa T.P. and Szybist L., 1999. Current practices and regulations regarding open dating of food products. The Retail Food Industry Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, Working Paper 99-01.
55. Labuza T.P., 1980. The effect of water activity on reactions kinetics of food deterioration. *Food Technol.* 34 (4), 36-41.
56. Labuza T.P., 1982. *Shelf Life Dating of Foods*, Food & Nutrition Press, Westport, CT.
57. Lenz M.K. and Lund D.B., 1980. Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components. *Food Technology*, 34, p. 51-55.
58. Ma L. and Su Y.C., 2010. Validation of high pressure processing for inactivating *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Food Microbiology* 144, 469-474.
59. Maier W., 2005. European Union food regulations and private standards, paper presented at Workshop at the US Department of Agriculture.
60. Madigan L.T., Bott J.N., Torok A.V., Percy J.N., Carragher F.J., Lopes A.M and Kiermeier A., 2014. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Food Microbiology* 38, 219-227.
61. Madigan T. L., 2008. A critical evaluation of supply-chain temperature profiles to optimise food safety and quality of Australian oysters, Fisheries Research and Development Corporation project 2007/700. Australian Seafood Cooperative Research Centre and South Australian Research and Development Institute, Bedford Park, SA, Australia.
62. Mahmoud B.S.M. and Burrage D.D., 2008. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in pure culture, whole live and half shell oysters

- (*Crassostrea virginica*) by X-ray, Experimental Seafood Processing Laboratory, Coastal Research & Extension Center, Mississippi State University, Pascagoula, MS, USA.
63. McMeekin T., 2007. Predictive microbiology: past, present and future, p. 7-19. In S. Brul, S. van Gerwen, and M. Zwietering (ed.), Modelling microorganisms in food. CRC Press, Boca Raton, FL.
64. Mistry V.V and Kosikowski F.V., 1983. Use of time – temperature indicators as quality control devices for market milk. *J. Food Protection*, 46 (1) 52-57.
65. National Academy of Sciences, 1991. Microbiological and parasitic exposure and health effects, Ch. 3. In Committee on Evaluation of the Safety of Fishery Products ed. Ahmed, F.E. pp. 30–86 Washington, DC: National Academy Press.
66. Oliver J.D., 2005. *Vibrio vulnificus*, In Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment ed. Belkin, S. and Colwell, R.R. pp. 253–276. New York: Springer Science Business Media, Inc.
67. Parkhaev P.Y., 1998. Siphonoconcha — a new class of Early Cambrian bivalved organisms. *Paleontological Journal* 32(1), 1–15.
68. Parveen, S., DaSilva, L., DePaola, A., Bowers, J., White, C., Munasinghe, K.A., Brohawn, K., Mudoh, M. and Tamplin, M. 2013. Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio parahaemolyticus* in post-harvest shellstock oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 1-6.
69. Pennanen K., Focas C., Kumpusalo-Sanna V., Keskitalo-Vuokko K., Matullat I., Ellouze M., Pentikäinen S., Smolander M., Korhonen V. and Ollila M., 2014, European Consumers’ Perceptions of Time–Temperature Indicators in Food Packaging, *Packag. Technol. Sci.* DOI:10.1002/pts.
70. Pouillot, R., M. B. Lubran, S. C. Cates, and S. Dennis, 2010. Estimating parametric distributions of storage time and temperature of ready-to-eat foods for U.S. households *Journal of Food Protection* 73, 312-321.
71. Prapaiwong N., Wallace R.K. and Arias C.R., 2009. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. *International Journal of Food Microbiology* 131, 145–150.

72. Renier J.J. and Morin W.T., 1962. Time-Temperature Indicators, Intl. Inst. Refrig. Bull. Annex, 1: 425-435.
73. Rodriguez and Zaritzki, 1983. Development of time temperature integrator for frozen beef, J. Food Sci. 48 (1983). p. 1526–1531.
74. Ross T., 2008. Microbial ecology in food safety risk assessment, p. 51-97, In D. W. Schaffner (ed.), Microbial risk analysis of foods, ASM Press, Washington, DC.
75. Runnegar B. and Pojeta J. J., 1985. Origin and diversification of the Mollusca, p. 1-57 in The Mollusca, E. R. Trueman and M. R. Clarke, eds. Academic Press, New York.
76. Schoen H.M. and Byrne C.H., 1972. Defrost indicators: many designs have been patented yet there is no ideal indicator. Food Technol. 26(10): 46-50.
77. Shellammer T.H and Singh R.P., 1991. Monitoring chemical and microbial changes of cottage cheese using a full history time – temperature indicator. J. Food Sci., 56 402-405.
78. Sherlock , M., Fu B., Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1991. A systematic evaluation of Time Temperature Indicators for use as consumer tags. Journal of Food Protection, 54(11), 885-889.
79. Sherlock M. and Labuza T.P., 1992. Consumers’ perceptions of consumer type time-temperature indicators for use on refrigerated dairy foods. J. Food Distrib. Res.
80. Singh R.P. and Wells J.H., 1985. Use of time-temperature indicators to monitor quality of frozen hamburger. Food Technology, 39 (12) 42-5.
81. Taoukis P.S, 1989. Time - Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products, Ph.D. Thesis, University of Minnesota, p.227.
82. Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1989a. Applicability of Time Temperature Indicators as shelf-life monitors of food products. J. Food Sci., 54(4) 737-8.
83. Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1989b. Reliability of Time-Temperature Indicators as Food Quality Monitors Under Non Isothermal Conditions, Journal of Food Science. 54(4), 789-792.
84. Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1999. Chemical Time-Temperature Integrators as Quality Monitors in the Chill Chain. Predictive Microbiology Applied to

- Chilled Food Preservation (Proc. of the International Symposium, Quimper, France. June 16-18, 1997). C.M. Bourgeois and T.A. Roberts. (eds). Refrigeration Science and Technology Proceedings Series, International Institute of Refrigeration (IIR). Paris, France, 291-300.
85. Taoukis P.S. and Labuza T.P., 2003. Time-Temperature Indicators (TTIs). In: Novel Food Packaging Techniques. R. Ahvenainen, editor. Woodhead Publishing Limited, UK. Ch 6. p. 103-126.
86. Taoukis P.S., 2001. Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In: Food Process Modelling. Tijkskens LMM, Hertog MLATM, Nicolai BM, editors. Washington DC: CRC Press. Ch 19. p. 401-431.
87. Taoukis P.S., Bili M., Gianakourou M., 1998. Application of shelf life modelling of chilled salad products to a TTI based distribution and stock rotation system. *Acta Horticulturae* 476, International Society for Horticultural Science (ISHS), Leiden, Netherlands, p. 131-140.
88. Taoukis P.S., El Meskine A., Labuza T.P., 1988. Moisture Transfer and Shelf Life of Packaged Foods, in *Food and Packaging Interactions*, Hotchkiss, J.H., Ed., ACS Symposium Series, No.365, 243-261.
89. Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G.J.E., 1999a. Use of time temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions, *International Journal of Food Microbiology* 53 (1999), p. 21–31.
90. Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G.J.E., 1999b. Applicability of Time-Temperature Indicators as quality monitors of MAP chilled fish stored in variable conditions, presented at the Institute Food Technologists (IFT) 59 Annual Meeting, Chicago, IL.
91. Thorsdottir I., Ramel A, 2008. Fish consumption and the health of children and young adults, in: T. Børresen (Ed.), *Improving seafood products for the consumer*, Woodhead Publishing Ltd., pp. 136-164.
92. Tinker J.H., Slavin J.W., Learson R.J., Empola V.G., 1985. Evaluation of automated time-temperature monitoring system in measuring for freshness of chilled fish. IIF-IIR Commissions C2, D3 4 286-90.

93. Tsironi T., Dermesonlouoglou E., Giannakourou M., Taoukis P. 2009. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 664–671.
94. Tsironi T., Gogou E., Velliou E., Taoukis P.S. 2008. Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) on shelf life optimization of vacuum packed chilled tuna. *International Journal of Food Microbiology* 128(1), 108-115.
95. Tsironi T., Ronnow P., Giannoglou M., Taoukis P.S. , 2016. Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements: The case of *Vibrio* spp. growth during transportation of oysters. *J. Food Control*, (2016) 1-6.
96. Tsironi T., Stamatiou A., Giannoglou M., Velliou E., Taoukis P.S., 2011. Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets *LWT - Food Science and Technology* 44 (2011), 1156-1163.
97. U.S. Food and Drug Administration, 2005. Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.
98. U.S. Food and Drug Administration, 2007. Bacteriological examination of shellfish shipments decision tree, sect. IV, chap. U. In National Shellfish Sanitation Program guide for the control of molluscan shellfish. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.
99. Vaikousi Hariklia, Biliaderis Costas G. and Koutsoumanis K., 2009. Applicability of a microbial Time Temperature Indicator (TTI) for monitoring spoilage of modified atmosphere packed minced meat. *International Journal of Food Microbiology* 133 (2009), 272–278.
100. Waller T.R., 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major group. Pp. 1-45 in P.A. Johnston and J.W. Haggart (eds.), *An Eon of Evolution; Paleobiological Studies Honoring Norman D. Newell*. University of Calgary Press.

101. Wells J.H and Singh R.P., 1988. Application of time-temperature indicators in monitoring changes in quality attributes of perishable and semi- perishable foods. *J. Food Sci.*, 53 148-152.
102. Wells J.H., Singh R.P. and Nobel A.C., 1987. A graphical interpretation of Time-Temperature related quality changes in frozen foods, *J. Food Sci*, 52, 436.
103. Wendin K, Broberg A. and Borch E., 2005. Consumer attitudes on the use of TTI for monitoring fresh meat. Swedish Institute for Food and Biotechnology.
104. Wright A., Hill R.T., Johnson J.A., Roghmen M., Colwell R.R. and Morris J.G., 1986. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Applied Environmental Microbiol* 62, 717–724.
105. Xi D., Liu C. and Su Y.C., 2012. Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats, *Food Control* p. 368-373.
106. Zarei M., Eskandari M.H. and Keshtkaran S., 2013. Survival of Normal and Chlorine-Stressed Pathogenic and Non-Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* under adverse conditions. *Jundishapur Journal of Microbiol*, 2014 March, 7(3), e9313.
107. Zwietering, M. H., and M. J. Nauta, 2007. Predictive models in microbiological risk assessment, p. 110-125. In S. Brul, S. van Gerwen, and M. Zwietering (ed.), *Modelling microorganisms in food*. CRC Press, Boca Raton, FL.
108. Ταούκης Π.Σ., 2005. Έλεγχος και διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας με χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες-SMAS. Ημερίδα: 'Η Ιχνηλασιμότητα στα τρόφιμα'.
109. Ταούκης Π.Σ., Τσιρώνη Θ., Γιαννόγλου Μ., Πλατάκου Ε., 2012, ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟ-ΜΕΣΑΙΕΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ: Μεθοδολογία προσδιορισμού διατηρησιμότητας κατεψυγμένων τροφίμων - Εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών για τον έλεγχο της ποιότητας τροφίμων, Αθήνα
110. Ταούκης Π.Σ., Ωραιπούλου Β., 2006. Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία Χημεία και Μηχανική Διεργασιών των τροφίμων, Επιστήμη και Μηχανική Βιολογικών Συστημάτων και Προϊόντων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π.. Αθήνα.σελ. 66-80.

111. Τζιά Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., 2007. Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Αθήνα. σελ.9, 185 – 188.
112. Τζιά Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., 2009. Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Αθήνα. σελ.9, 185 – 188.
113. Τζιά Κ., Ωραιοπούλου Β., 2010. Σχεδιασμός Βιομηχανιών Τροφίμων – Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Αθήνα: Εκδόσεις Ε.Μ.Π., 2008.σελ. 213-221.
114. Τσιρώνη Ν. Θεοφανία, (2010), Μελέτη μη θερμικών προκατεργασιών για την βελτίωση της διατηρησιμότητας ιχθυρών, διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Δικτυακοί τόποι

115. <http://www.usda.gov>
116. <http://www.fao.org>
117. <http://www.fda.gov>
118. <http://www.freshckcek.com>
119. <http://www.iq-freshlabel.eu>
120. <http://www.noaa.gov>
121. <http://www.smas.chemeng.ntua.gr>
122. <http://www.vitsab.com>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου για ωμά στρείδια

Όνοματεπώνυμο:.....

Ημερομηνία:.....

Όσμή προϊόντος (αρέσκεια , 1=χαμηλότερη , 9=υψηλότερη)

Δείγμα: 0°C 5°C 10°C 15°C var

Παρατηρήσεις :

Εμφάνιση προϊόντος (αρέσκεια , 1=χαμηλότερη , 9=υψηλότερη)

Δείγμα: 0°C 5°C 10°C 15°C var

Παρατηρήσεις :

Γενική Εντύπωση (ποιότητα , 1= χαμηλότερη, 9=υψηλότερη)

Δείγμα: 0°C 5°C 10°C 15°C var

Παρατηρήσεις :