



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

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

**Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών και μικροβιακών
χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών ΤΠΙ και της
διατηρησιμότητας προϊόντων καπνιστής πέστροφας με
εφαρμογή στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Άννα-Μαρία Ευαγγελοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής: Πέτρος Σ. Ταούκης

Αθήνα 2017

Αφιερωμένη στην οικογένειά μου

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας με θέμα "Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών και μικροβιακών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών ΤΤΙ και της διατηρησιμότητας προϊόντων καπνιστής πέστροφας με εφαρμογή στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας" πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του καθηγητή ΕΜΠ Πέτρου Ταούκη.

Η συνεισφορά πολλών ανθρώπων υπήρξε καταλυτική για την επιτυχή περάτωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας και θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου.

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της παρούσας εργασίας, για την ανεκτίμητη ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ομάδα του και για τη συνεχή καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε τόσο κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Πολυτεχνείο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τις διδάκτορες Μαριάννα Γιαννόγλου και Θεοφανία Τσιρώνη για τη συνεχή καθοδήγησή τους, τις χρήσιμες συμβουλές τους, τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν, την εξαιρετική συνεργασία και την άμεση υποστήριξή τους σε κάθε επίπεδο καθ'όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας. Η αστείρευτη υπομονή και προθυμία τους συνέβαλλαν σημαντικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Φυσικά δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Ελένη Πλατάκου για την πολύτιμη βοήθεια και τις καίριες επισημάνσεις της κατά τα πρώτα στάδια διεξαγωγής των πειραμάτων. 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 παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για τη συμπαράσταση, την αγάπη και την ηθική υποστήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, και στους φίλους μου που έκαναν όλα τα φοιτητικά μου χρόνια μια μοναδική εμπειρία.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2017

Άννα-Μαρία Ευαγγελοπούλου

Περίληψη

Η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων χαρακτηρίζεται από μεγάλες απώλειες ποιότητας λόγω σημαντικών αποκλίσεων από τις προδιαγραφές της θερμοκρασίας. Με τη θερμοκρασία να αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο που επιδρά στο ρυθμό της ποιοτικής αλλοίωσης των τροφίμων, η σωστή διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας κρίνεται αναγκαία για τη διασφάλιση της ποιότητας ευαλλοίωτων προϊόντων, όπως οι ιχθύες, που πρέπει να διακινηθούν και να συντηρηθούν υπό ψύξη (δηλαδή ιδανικά στους 0°C έως 4°C). Ωστόσο, η αλληλουχία των θερμοκρασιακών συνθηκών στις οποίες εκτίθεται ένα τρόφιμο κατά τη διακίνησή του είναι δύσκολο να καταγραφούν, να παρακολουθηθούν και να ποσοτικοποιηθούν. Τη λύση στο πρόβλημα αυτό έρχονται να δώσουν οι Χρονοθερμοκρασιακοί Δείκτες ή Ολοκληρωτές (TTI: Time Temperature Indicators or Integrators). Οι TTI έχουν τη μορφή μίας χαμηλού κόστους αυτοκόλλητης ετικέτας πάνω στη συσκευασία του τροφίμου, η οποία με μια εύκολα μετρήσιμη οπτική απόκριση (π.χ. μεταβολή χρώματος) εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, δείχνει το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό και την ποιοτική κατάσταση του τροφίμου που συνοδεύει. Πρόκειται για ένα έξυπνο σύστημα επισήμανσης των τροφίμων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί επικουρικά της αμετάβλητης αναγραφόμενης ημερομηνίας ανάλωσης, ως μια «ζωντανή» ημερομηνία λήξης, που παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου ενδεχόμενης θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης του προϊόντος και κατ'επέκταση εντοπισμού και βελτίωσης των προβληματικών σημείων της ψυκτικής αλυσίδας.

Σκοπό της συγκεκριμένης εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών και μικροβιακών τύπων TTI, η μέλετη της διατηρησιμότητας συσκευασμένων υπό κενό καπνιστών φιλέτων πέστροφας και η επιλογή και αντιστοίχιση κατάλληλου χρονοθερμοκρασιακού ολοκληρωτή για τη βελτίωση της διαχείρισης της ποιότητας του τροφίμου στην ψυκτική αλυσίδα.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη διαφόρων ενζυμικών και μικροβιακών TTI σε θερμοκρασίες ψύξης (0-15°C) από όπου προσδιορίστηκαν οι συναρτήσεις απόκρισης και τα κινητικά τους χαρακτηριστικά, και ακολούθως ελέγχθηκε η αξιοπιστία τους σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας. Η λειτουργία των ενζυμικών TTI στηρίζεται σε μια ελεγχόμενη ενζυμική υδρόλυση υποστρώματος λιπιδίων. Στους ενζυμικούς δείκτες τύπου LP που μελετήθηκαν, το ένζυμο παγκρεατική λιπάση αντιδρούσε με υπόστρωμα τριλαουρίνης-τριπαλμιτίνης. Τα προϊόντα της αντίδρασης μείωναν το pH του διαλύματος στο δείκτη και η μείωση αυτή παρατηρούταν οπτικά ως αλλαγή χρώματος. Το αρχικό πράσινο χρώμα κατά την ενεργοποίηση του TTI άλλαζε σταδιακά σε κίτρινο/πορτοκαλί και τελικά σε κόκκινο χρώμα κατά τη λήξη του TTI. Το μικροβιακό

ΤΤΙ στηρίζει την αρχή λειτουργίας του στην ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα ενός στελέχους του γαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus sakei* σε υπόστρωμα γλυκόζης. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον μικροοργανισμό προκαλούσε πτώση του pH και κατά συνέπεια μια εμφανή χρωματική μεταβολή ενός χημικού δείκτη, που επίσης περιλαμβανόταν στο σύστημα, από τον αρχικό ιώδη στον τελικό κίτρινο χρωματισμό.

Μετά την κινητική μελέτη των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών, προσδιορίστηκαν τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα απόκρισης των ενζυμικών και μικροβιακών ΤΤΙ. Το μαθηματικό μοντέλο των ενζυμικών ΤΤΙ περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισής τους από τη θερμοκρασία συντήρησης, το χρόνο και τη συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΤΙ, ενώ το μαθηματικό μοντέλο των μικροβιακών ΤΤΙ περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης αυτών από το χρόνο, τη θερμοκρασία και το αρχικό επίπεδο εμβολίου του *Lactobacillus sakei* στο σύστημα του ΤΤΙ. Με βάση τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα, η ενέργεια ενεργοποίησης E_A εκτιμήθηκε για τα ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP σε 131.4 kJ/mol ενώ για τα μικροβιακά ΤΤΙ σε 105.5 kJ/mol.

Στο δεύτερο μέρος της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των παραμέτρων ποιοτικής υποβάθμισης των καπνιστών φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) συσκευασμένων υπό κενό, τόσο σε ισοθερμοκρασιακές (0, 5 και 10°C) όσο και σε εναλλασσόμενες συνθήκες ψύξης. Στόχος ήταν η ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης της ποιοτικής τους υποβάθμισης, προκειμένου να αξιολογηθεί η εφαρμοσιμότητα των μοντέλων στην ψυκτική αλυσίδα. Ταυτόχρονα, για τον έλεγχο της αξιοπιστίας του ενζυμικού δείκτη τύπου LP για την παρακολούθηση της ψυκτικής αλυσίδας των καπνιστών φιλέτων πέστροφας πραγματοποιήθηκε επικόλληση ενζυμικών δεικτών διαφορετικών συγκεντρώσεων στη συσκευασία του τροφίμου. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα διεξάγονταν μικροβιακή ανάλυση των δειγμάτων, προσδιορισμός pH, μέτρηση χρώματος, ανάλυση υφής, οργανοληπτική αξιολόγησή τους και μέτρηση τους χρώματος των επικολλημένων δεικτών. Ως δείκτες της ποιοτικής αλλοίωσης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό, ορίστηκαν η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων (αλλοιογόνος μικροοργανισμός) και η υποβάθμιση της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης. Για τους δύο αυτούς δείκτες ποιότητας εφαρμόστηκε το μοντέλο Arrhenius από όπου προσδιορίστηκαν τα κινητικά τους χαρακτηριστικά. Η ενέργεια ενεργοποίησης E_A για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε ίση με 91 kJ/mol ενώ για την υποβάθμιση της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης βρέθηκε ίση με 105.5 kJ/mol.

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε μελέτη για την εύρεση του κατάλληλου ενζυμικού και μικροβιακού ΤΤΙ που θα παρακολουθεί και θα καταγράφει την κατάσταση ποιότητας των καπνιστών

συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα. Απαραίτητη προϋπόθεση για να γίνει η συσχέτιση της απόκρισης των ΤΠΙ με την ποιοτική αλλοίωση των καπνιστών φιλέτων πέστροφας (με βάση τη συνολική οργανοληπτική εντύπωση) είναι οι ενέργειες ενεργοποίησής τους και οι χρόνοι ζωής τους να έχουν παραπλήσιες τιμές. Ικανοποιώντας την απαίτηση για παραπλήσιες τιμές E_A , οι χρόνοι ζωής των δύο τύπων ΤΠΙ υπολογίστηκαν βάσει των αναπτυγμένων συνολικών μαθηματικών μοντέλων και συσχετίστηκαν με τους αντίστοιχους χρόνους ζωής του υπό εξέταση τροφίμου. Οι μικροβιακοί δείκτες κρίθηκαν ακατάλληλοι, διότι είχαν πολύ μικρότερη διάρκεια ζωής από τα καπνιστά φιλέτα. Καταλληλότερος ενζυμικός δείκτης για τα καπνιστά συσκευασμένα υπό κενό φιλέτα πέστροφας ήταν ο LP_17U, όπως επαληθεύτηκε και από τα πειράματα σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης με ΤΠΙ κατά τη διάρκεια των οποίων ήταν κολλημένα πάνω στις συσκευασίες των καπνιστών προϊόντων.

Abstract

Kinetic study of the response of enzymatic and microbial Time Temperature Integrators (TTI) and of the shelf life of smoked trout products for application in the management of the cold chain

The food cold chain is characterized by great quality losses due to significant deviations from temperature standards. Since temperature is the main post-processing parameter that affects the rate of spoilage on foods, the proper management of cold chain is essential for the quality assurance of perishable products, such as fish, which have to be transferred and stored at refrigeration temperatures (ideally from 0°C to 4°C). However, the succession of temperature conditions, in which a food product is exposed during its handling, is quite difficult to be recorded, monitored and quantified. A practical solution to this problem is the usage of Time Temperature Indicators or Integrators (TTI). TTIs are defined as simple and cost-effective labels which can show an easily measurable time- and temperature-dependent change (e.g. color change) that reflects the time-temperature history and the quality status of the food products to which they are attached. It is about a smart food labeling system than can be used in conjunction with the stated expiration date, as an active expiration date, which can provide information on product's possible temperature misuse and as a result lead to a realistic control and a more efficient management of the cold chain.

The objectives of the present study were the kinetic modeling of enzymatic and microbial TTI response, the kinetic study of quality deterioration of vacuum packed smoked trout fillets and the selection of the optimum TTIs which can effectively monitor the quality status of smoked trout fillets in the cold chain.

In the first part of the project, kinetic study of several enzymatic and microbial TTIs was conducted at refrigerated conditions (0, 5 and 10°C) so as the response functions and the kinetic parameters of the TTIs to be determined. Subsequently, in order to assess the reliability of the TTIs at the temperature fluctuations that prevail in the real chill chain, experiments at non-isothermal conditions were performed. The enzymatic TTIs are based on a color change caused by a pH decrease which is the result of a controlled enzymatic hydrolysis of a lipid substrate. In the examined LP-type enzymatic TTI a pancreatic lipase was reacted with a trilaurin-tripalmitin substrate. Hydrolysis of the substrate provoked acid release and the corresponding pH drop induced a color change of a pH indicator. Hence, the initially green colored TTI, gradually turned into yellow/orange and finally red. The microbial TTIs are based on the growth and the metabolic activity of a *Lactobacillus sakei* strain in a glucose substrate. In the designed system, the lactic acid production from the microorganism

provoked a pH decline and progressively an irreversible color change of a chemical chromatic indicator from violet to yellow color.

Once the kinetic study of the examined TTI labels was completed, composite models for their response were determined. The composite model of the enzymatic TTIs allows the calculation of their response at a selected time-temperature scenario and at any enzyme concentration while the composite model of the microbial TTIs describes the dependence of their response from the temperature storage, the time and the inoculum level of the bacterial strain. Based on the developed composite models, the activation energy E_A for the enzymatic and the microbial TTIs was estimated at 131.4 kJ/mol and 105.5 kJ/mol, respectively.

In the second part of the thesis, kinetic study of the vacuum packed smoked trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets' quality indices was conducted at isothermal (0, 5 and 10°C) and dynamic refrigerated conditions. The objective was the development of mathematical models that predict their quality deterioration and the assessment of the applicability of these models in the cold chain. Simultaneously, in order to check the credibility of the examined LP-type enzymatic TTI for monitoring the cold chain of the smoked trout fillets, enzymatic TTIs of different enzyme's concentrations were attached on the products' packaging. Samples were taken in appropriate time intervals for microbiological analysis, pH measurement, color measurement, texture and sensory analysis, as well as for color measurement of the attached TTIs. The lactic acid bacteria (LAB) growth and the degradation of the sensory overall impression were considered as the quality indices for the vacuum packed smoked trout fillets. For these specific quality indices the Arrhenius model was used in order to define the respective kinetic parameters. The activation energy E_A for the LAB growth was calculated at 91 kJ/mol while for the degradation of the overall sensory impression was calculated at 105.5 kJ/mol.

Lastly, a study was conducted in order for the suitable enzymatic and microbial TTI, which can monitor and record the quality status of the vacuum packed smoked trout fillets in the cold chain, to be found. Prerequisite for the correlation of the TTIs response with the quality deterioration of the smoked trout fillets (based on overall sensory impression) is their activation energy and their shelf-life values to be similar. Satisfying the requirement for similar activation energy values, the response times of both enzymatic and microbial TTIs were calculated by the developed composite models and were correlated with the respective shelf-life of the smoked fillets. The microbial TTI labels were unsuitable because they had shorter shelf-life from the smoked trout fillets. LP_17U was found to be the optimum enzymatic TTI for the vacuum packed smoked trout fillets, as also verified from experiments with TTIs at non-isothermal temperature conditions during which the indicators were attached on the packaging of the smoked products.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1	1
Ποιοτική υποβάθμιση τροφίμων	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Ποιότητα τροφίμων-Συντελεστές ποιότητας	2
1.3 Διατηρησιμότητα (διάρκεια ζωής) τροφίμου	3
1.4 Μαθηματική μοντελοποίηση της υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων	5
1.5 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων.....	9
1.5.1 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	9
1.5.1.1 Μοντέλο Arrhenius.....	10
1.5.1.2 Δραστική θερμοκρασία (T_{eff}).....	11
Κεφάλαιο 2	13
Κάπνιση ιχθύων	13
2.1 Εισαγωγή	13
2.2 Χημική σύσταση της σάρκας ιχθύων	14
2.3 Αίτια ποιοτικής αλλοίωσης ιχθύων	16
2.4 Μέθοδοι συντήρησης ιχθύων	19
2.5 Κάπνιση	19
2.5.1 Παραγωγή, χημική σύσταση και ιδιότητες καπνού	19
2.5.2 Μέθοδοι κάπνισης	21
2.6 Φυσικοχημικές μεταβολές κατά την κάπνιση των ιχθύων	22
2.7 Αλλοίωση καπνιστών ιχθύων κατά τη συντήρηση	23
2.8 Ιριδίζουσα πέστροφα	25
2.9 Διαχείριση και έλεγχος της ψυκτικής αλυσίδας ιχθύων	28
Κεφάλαιο 3	31
Χρονο-θερμοκρασιακοί ολοκληρωτές (ΤΤΙ)	31
3.1 Εισαγωγή	31
3.2 Ορισμός και αρχή λειτουργίας των ΤΤΙ	31
3.2.1 Ορισμός ΤΤΙ	31
3.2.2 Αρχή λειτουργίας των ΤΤΙ.....	32
3.3 Κατηγοριοποίηση των ΤΤΙ	32
3.4 Χαρακτηριστικά ενός ιδανικού ΤΤΙ.....	33
3.5 Εμπορικά διαθέσιμα και πρότυπα συστήματα ΤΤΙ.....	34
3.5.1 Ενζυμικοί δείκτες.....	41

3.5.1.1 Αρχή λειτουργίας ενζυμικών δεικτών	41
3.5.1.2 Πρότυπα ενζυμικά συστήματα ΤΤΙ.....	45
3.5.2 Μικροβιακοί δείκτες	45
3.5.2.1 Εμπορικά διαθέσιμοι μικροβιακοί δείκτες	46
3.5.2.2 Πρότυπα μικροβιακά συστήματα ΤΤΙ	48
3.6 Κινητική απόκρισης των ΤΤΙ	51
3.7 Αντιστοίχιση της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιότητα των τροφίμων.....	52
3.8 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστηκής θερμοκρασίας T_{eff}	54
3.9 Καταγραφή της ποιοτικής κατάστασης των τροφίμων στην αλυσίδα διακίνησης με τη χρήση των ΤΤΙ.....	55
3.10 Εφαρμογές των ΤΤΙ.....	55
3.11 Περιορισμοί στη χρήση και εφαρμογή των ΤΤΙ	58
3.12 Ανάπτυξη και εφαρμογή συστήματος SMAS (Safety Monitoring and Assurance System).....	60
3.13 Μελλοντικές τάσεις για τη χρήση ΤΤΙ	62
3.14 Σκοπός της εργασίας	64
Κεφάλαιο 4	65
Πειραματική διαδικασία-Υλικά και μέθοδοι	65
4.1 Εισαγωγή-Σκοπός	65
4.2 Μελέτη ενζυμικών και μικροβιακών χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών(ΤΤΙ)	65
4.2.1 Πειραματική διαδικασία	66
4.2.2 Συσκευές πειραματικής διαδικασίας.....	70
4.3 Μελέτη των παραγόντων αλλοίωσης καπνιστής πέστροφας συσκευασμένης υπό κενό - Εφαρμογή των ΤΤΙ για την πρόβλεψη της εναπομένουσας διάρκειας ζωής	71
4.3.1 Πειραματική διαδικασία	72
4.3.1.1 Μέτρηση της απόκρισης των προσκολλημένων στα δείγματα ΤΤΙ	73
4.3.1.2 Μέτρηση μικροβιακού φορτίου.....	73
4.3.1.3 Μέτρηση pH	76
4.3.1.4 Μέτρηση χρώματος.....	77
4.3.1.5 Ανάλυση υφής.....	78
4.3.1.6 Οργανοληπτικός έλεγχος	79
Κεφάλαιο 5	81
Μελέτη απόκρισης των ΤΤΙ	81
5.1 Βήματα επεξεργασίας της απόκρισης των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών.....	81
5.1.1 Καθορισμός της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ των ενζυμικών ΤΤΙ	81

5.1.2 Καθορισμός της συνάρτησης απόκρισης των μικροβιακών ΤΤΙ	81
5.1.3 Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών k_i και E_A των ΤΤΙ.....	82
5.1.4 Έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων	83
5.2 Κινητική μελέτη απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ	84
5.2.1 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_5U	84
5.2.2 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_10U	87
5.2.3 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_20U	90
5.2.4 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_50U	93
5.2.5 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_100U	96
5.2.6 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_200U	99
5.2.7 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_400U	102
5.2.8 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_600U	105
5.2.9 Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των μελετηθέντων ενζυμικών ΤΤΙ (Συγκεντρωτικά)	108
5.2.10 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ για τον δείκτη LP_20U - Έλεγχος αξιοπιστίας μαθηματικού μοντέλου	109
5.3 Κινητική μελέτη απόκρισης μικροβιακών ΤΤΙ	112
5.3.1 Κινητική μελέτη μικροβιακών ΤΤΙ τύπου log1	113
5.3.2 Κινητική μελέτη μικροβιακών ΤΤΙ τύπου log2	116
5.3.3 Κινητική μελέτη μικροβιακών ΤΤΙ τύπου log5	120
5.3.4 Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των μελετηθέντων μικροβιακών ΤΤΙ (Συγκεντρωτικά)	124
5.3.5 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ για τον δείκτη log1- Έλεγχος αξιοπιστίας μαθηματικού μοντέλου	125
5.4 Διάρκεια ζωής ή χρόνος απόκρισης (Response Time) των ΤΤΙ	127
5.5 Προσδιορισμός συνολικών μαθηματικών μοντέλων της απόκρισης των ΤΤΙ	130
5.5.1 Προσδιορισμός συνολικού μαθηματικού μοντέλου των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP	130
5.5.2 Προσδιορισμός συνολικού μαθηματικού μοντέλου των μικροβιακών ΤΤΙ.....	132
5.6 Μελέτη αξιοπιστίας των συνολικών μαθηματικών μοντέλων - Στατιστική επεξεργασία	135
5.6.1 Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP.....	135
5.6.2 Μικροβιακά ΤΤΙ	137
Κεφάλαιο 6	139
Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό.....	139

6.1 Εισαγωγή	139
6.2 Χημική σύσταση φιλέτων καπνιστής πέστροφας	139
6.3 Κινητική μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης σε συσκευασμένα υπό κενό φιλέτα καπνιστής πέστροφας	140
6.3.1 Κινητική μελέτη ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας	142
6.3.2 Κινητική μελέτη ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων	144
6.4 Μέτρηση pH	146
6.5 Μέτρηση χρώματος.....	147
6.6 Ανάλυση υφής.....	149
6.7 Κινητική μελέτη της μεταβολής των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών	151
6.8 Προσδιορισμός της διατηρησιμότητας.....	159
6.9 Επαλήθευση μοντέλου πρόβλεψης της αλλοίωσης συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας σε δυναμικές συνθήκες	161
Κεφάλαιο 7	165
Συσχέτιση της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιοτική αλλοίωση καπνιστών φιλέτων πέστροφας για τη βελτίωση της διαχείρισης ποιότητας στην ψυκτική αλυσίδα .	165
7.1 Εισαγωγή	165
7.2 Συσχέτιση της διάρκειας ζωής καπνιστών φιλέτων πέστροφας με το χρόνο απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP.....	165
7.3 Συσχέτιση της διάρκειας ζωής καπνιστών φιλέτων πέστροφας με το χρόνο απόκρισης των μικροβιακών ΤΤΙ	168
7.4 Εφαρμογή και έλεγχος αξιοπιστίας του ενζυμικού δείκτη τύπου LP για την παρακολούθηση της ποιότητας των φιλέτων καπνιστής πέστροφας στη ψυκτική αλυσίδα	169
Κεφάλαιο 8	173
Συνοπτική Παρουσίαση Αποτελεσμάτων-Συμπεράσματα- Προτάσεις	173
8.1 Συνοπτική Παρουσίαση Αποτελεσμάτων	173
8.2 Συμπεράσματα	184
8.3 Προτάσεις.....	185
Βιβλιογραφία	187
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	197

Κεφάλαιο 1

Ποιοτική υποβάθμιση τροφίμων

1.1 Εισαγωγή

Στη σημερινή εποχή, η ποιότητα αντιπροσωπεύει τη σημαντικότερη ίσως παράμετρο του σχεδιασμού, της παραγωγής και της κατανάλωσης ενός τροφίμου. Ο καταναλωτής είναι ο πιο σημαντικός κριτής της ποιότητας ενός προϊόντος τροφίμου, δεδομένου ότι καθορίζει την εμπορική του επιτυχία και τη μελλοντική του πορεία στην αγορά.

Τα τρόφιμα είναι εκ φύσεως φθαρτά προϊόντα, τα οποία από τη στιγμή της παραγωγής τους μέχρι το τελικό σημείο κατανάλωσης υφίστανται χημικές, βιοχημικές, μικροβιολογικές και φυσικές μεταβολές, με αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση και αλλοίωσή τους.

Οι κυριότεροι τύποι διεργασιών που συντελούν στην απώλεια ποιότητας των τροφίμων και ενδεικτικά τους παραδείγματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.1- Κυριότερες αιτίες ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων

Τύπος μεταβολής	Παραδείγματα
Χημική	<ul style="list-style-type: none"> Μη ενζυμικό μαύρισμα(αντιδράσεις Mallaird) Αυτοοξειδωτικός ταγγισμός Υδρόλυση
Βιοχημική	<ul style="list-style-type: none"> Ενζυμικό μαύρισμα Λιπόλυση(λιπάσες) Πρωτεόλυση(πρωτεάσες) Ενζυμική οξείδωση λιπαρών(λιποξυγενάσες)
Μικροβιολογική	<ul style="list-style-type: none"> Ανάπτυξη αλλοιογόνων ή/και παθογόνων μικροοργανισμών
Φυσική	<ul style="list-style-type: none"> Μηχανική καταπόνηση Διαχωρισμός

Η ποσοτική έκφραση της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων περιγράφεται συνήθως με την υιοθέτηση κάποιου μετρήσιμου δείκτη ποιότητας, που σχετίζεται με τη μικροβιακή σταθερότητα, τις φυσικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου ή τις χημικές μεταβολές που είναι δυνατό να συμβούν στο προϊόν. Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι πλέον εύκολη η παρακολούθηση του δείκτη αυτού στην πορεία του χρόνου, και η περιγραφή των μεταβολών του με όρους κινητικής (Γιαννακούρου, 2003). Έτσι, τα κινητικά μοντέλα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο

για την ποσοτικοποίηση και την πρόβλεψη της ποιοτικής υποβάθμισης και διατηρησιμότητας των τροφίμων.

1.2 Ποιότητα τροφίμων-Συντελεστές ποιότητας

Η ποιότητα του τροφίμου μπορεί να οριστεί ως το σύνολο εκείνων των χαρακτηριστικών, τα οποία στοχεύουν στην ικανοποίηση των εκφρασμένων ή εννοούμενων αναγκών του καταναλωτή, και που τελικά καθορίζουν το βαθμό αποδοχής του προϊόντος από αυτόν (Τζιά, 2010).

Η ποιότητα ενός τροφίμου μπορεί να θεωρηθεί ως το άθροισμα επί μέρους ποιοτήτων που αντιστοιχούν στους συντελεστές ποιότητας που την επηρεάζουν. Οι συντελεστές ποιότητας εξαρτώνται από την ποιότητα των πρώτων υλών και την ποιότητα της εφαρμοζόμενης τεχνολογίας επεξεργασίας (Τζιά, 2009).

$$Q_{\text{τροφίμου}} = Q_1 + Q_2 + \dots + Q_i \quad (1.1)$$

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" ή "κρυμμένα χαρακτηριστικά", τα οποία δεν μπορούν να εκτιμηθούν με τις αισθήσεις αλλά παίζουν ρόλο στην υγεία ή έχουν οικονομική σημασία.

Πίνακας 1.2-Ταξινόμηση χαρακτηριστικών ή συντελεστών ποιότητας τροφίμου (Τζιά,2009)

<u>ΕΜΦΑΝΗ / ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ</u>	<u>ΜΗ ΕΜΦΑΝΗ</u>
Όραση-Εμφάνιση:	Αβλαβής νοθεία
Χρώμα	Θρεπτική αξία
Ιξώδες	Τοξικότητα
Στιλπνότητα	Διατηρησιμότητα
Μέγεθος και σχήμα	(χρόνος ζωής)
Ελαττώματα	
Αφή- Κιναισθητική (υφή):	
Αίσθηση στο χέρι ή τα δάχτυλα	
Στοματική αίσθηση	
Όσφρηση και γεύση-Άρωμα:	
Οσμή	
Γεύση	
Ακοή:	
Κοπή και μάσημα	

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

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

1.3 Διατηρησιμότητα (διάρκεια ζωής) τροφίμου

Η ποιότητα του τροφίμου είναι μια δυναμική κατάσταση που κινείται προς φθίνουσα κατεύθυνση, με αποτέλεσμα τα τρόφιμα να έχουν πεπερασμένη **διατηρησιμότητα ή διάρκεια ζωής (shelf life)** (Ταούκης, 2009).

Η διατηρησιμότητα ή διάρκεια ζωής αναφέρεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ της παραγωγής ενός προϊόντος τροφίμου και του σημείου όπου δεν τηρεί πλέον τις προδιαγραφές σχεδιασμού του για την ποιότητα και την ασφάλεια, εξαιτίας της εμφάνισης ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών σε μη αποδεκτά επίπεδα (Brown, 2011). Είναι δηλαδή ο χρόνος κατά τον οποίο το τρόφιμο παραμένει ασφαλές, διατηρεί τα επιθυμητά αισθητήρια, χημικά, φυσικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά, ενώ ταυτόχρονα ανταποκρίνεται στα διατροφικά χαρακτηριστικά της ετικέτας του.

Ωστόσο, βιομηχανία και καταναλωτές καθορίζουν τη διάρκεια ζωής ενός τροφίμου με βάση διαφορετικά κριτήρια. Από την πλευρά της, η βιομηχανία, καθορίζει το τέλος του χρόνου ζωής ενός προϊόντος που παράγει, βάσει της έκτασης που μπορεί να λάβει η απώλεια ενός ποιοτικού χαρακτηριστικού και που η ίδια επιτρέπει να συμβεί, πριν την κατανάλωση του προϊόντος. Ο καταναλωτής από τη δική του σκοπιά, ορίζει ως τέλος της διάρκειας ζωής το χρόνο κατά τον οποίο το τρόφιμο είναι μη αποδεκτό ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Fu and Labuza 1993; Βαϊκούση, 2009). Συνεπώς, η διάρκεια ζωής του τροφίμου μπορεί να είναι διαφορετική για διαφορετικές παραμέτρους ποιότητας, με αποτέλεσμα να είναι στην πραγματικότητα αδύνατη η υιοθέτηση και η εφαρμογή ενός και μόνο ορισμού της διατηρησιμότητας των τροφίμων. Έτσι, ο καθορισμός της διάρκειας ζωής και των κριτηρίων που οριοθετούν το τέλος της εξαρτώνται από το εκάστοτε προϊόν και από τη χρήση για την οποία προορίζεται.

Διάφοροι διεθνείς οργανισμοί καθορίζουν διαφορετικά πρότυπα διατηρησιμότητας ανά κατηγορία τροφίμου. Για παράδειγμα, 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 (PSL: Practical Shelf Life)**. Είναι ο χρόνος αποθήκευσης μετά την παραγωγή, προϊόντος υψηλής αρχικής ποιότητας, στον οποίο το τρόφιμο είναι οργανοληπτικά κατάλληλο για χρήση ή κατανάλωση. Ο

χρόνος πρακτικής διατήρησης είναι συνήθως δύο ή τρεις φορές μεγαλύτερος από το χρόνο υψηλής ποιότητας (HQL) (Ταούκης, 2009).

Η Ευρωπαϊκή κοινότητα εισήγαγε για την επισήμανση των τροφίμων:

1. Την **ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας**(minimum durability): είναι η ημερομηνία, μέχρι την οποία το τρόφιμο διατηρεί τα προδιαγεγραμμένα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά σε κατάλληλες συνθήκες διατηρήσεως. Περιγράφεται στην επισήμανση με την ένδειξη: "Ανάλωση κατά προτίμηση πριν από " (best before) ή "Ανάλωση κατά προτίμηση πριν από το τέλος ..." (best before end). Πέραν της ημερομηνίας αυτής, το τρόφιμο θα έχει υποβαθμιστεί ποιοτικά αλλά θα μπορεί να θεωρηθεί ασφαλές προς κατανάλωση για κάποιο χρονικό διάστημα. Είδη τροφίμων που έχουν τέτοιου είδους ημερομηνίες περιλαμβάνουν τα κονσερβοποιημένα, τα αποξηραμένα και τα κατεψυγμένα τρόφιμα (http://www.eufic.org/article/el/artid/Food_shelf_life_and_its_importance_for_consumers).

2. Την **ημερομηνία ανάλωσης**: χρησιμοποιείται στην περίπτωση των τροφίμων που είναι ευαλλοιώτα και ενδέχεται ύστερα από σύντομο χρονικό διάστημα, να αποτελέσουν άμεσο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Αναγράφεται στην επισήμανση με τη φράση "Ανάλωση μέχρι" (use by). Συνεπώς, τα τρόφιμα αυτά ενδέχεται να παρουσιάζουν κίνδυνο για τροφική δηλητηρίαση, εάν καταναλωθούν μετά το πέρας της ημερομηνίας αυτής. Είδη τροφίμων που έχουν ημερομηνίες «Ανάλωση μέχρι» περιλαμβάνουν τα κρύα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα μαγειρεμένα κρέατα και τις έτοιμες σαλάτες (http://www.eufic.org/article/el/artid/Food_shelf_life_and_its_importance_for_consumers).

Πάντως, 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, 2009).

Η διατηρησιμότητα ενός τροφίμου εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης, τη μέθοδο και τις συνθήκες επεξεργασίας και τέλος τις συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης (Τζιά, 2009).

Οι δύο κύριες μέθοδοι εκτίμησης της διάρκειας ζωής είναι α) η άμεση και β) η έμμεση μέθοδος. Στην άμεση μέθοδο ένα προϊόν αποθηκεύεται στις προβλεπόμενες συνθήκες και παρακολουθείται διαρκώς. Στην έμμεση μέθοδο ένα προϊόν αποθηκεύεται σε μη ιδανικές (επιταχυνόμενες) συνθήκες ή για την εκτίμηση της διάρκειας ζωής χρησιμοποιούνται άλλες προσεγγίσεις (π.χ. προρρητική μικροβιολογία).

Πίνακας 1.3-Μέθοδοι εκτίμησης της διάρκειας ζωής(διατηρησιμότητας) ενός τροφίμου

Άμεση μέθοδος	Έμμεση μέθοδος
1.Εκτίμηση των παραγόντων που επηρεάζουν το τρόφιμο	1.Επιταχυνόμενες μέθοδοι εκτίμησης της διάρκειας ζωής(π.χ. Accelerated shelf life testing, ASLT)
2.Επιλογή των κατάλληλων αναλύσεων(π.χ. φυσικοχημικές, μικροβιολογικές, οργανοληπτικές)	
3.Εκπόνηση της ανάλυσης	2.Προρρητική μικροβιολογία-Μαθηματική μοντελοποίηση της
4.Εκτίμηση του χρόνου ζωής	κινητικής ανάπτυξης των
5.Συνέχιση της παρακολούθησης ακόμα και όταν το προϊόν είναι στο ράφι	μικροοργανισμών

1.4 Μαθηματική μοντελοποίηση της υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων

Εφαρμόζοντας τις βασικές αρχές της χημικής κινητικής, ο ρυθμός υποβάθμισης της ποιότητας ενός τροφίμου μπορεί γενικά να εκφραστεί ως μία συνάρτηση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων.

$$\frac{dQ}{dt} = F(C_i, E_j) \quad (1.2)$$

όπου:

C_i : παράμετροι σύστασης (αντιδρώντα συστατικά, ανόργανοι καταλύτες, ένζυμα, παρεμποδιστές, ενεργότητα νερού, μικροβιακή χλωρίδα)

E_j : παράμετροι περιβάλλοντος (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ολική πίεση, μερική πίεση περιβαλλόντων αερίων π.χ. CO_2 , N_2 , O_2 , φως, μηχανικές καταπονήσεις)

Η κινητική ανάλυση που ακολουθεί βασίζεται στη θεμελιώδη παραδοχή ότι οι περιβαλλοντικές παράμετροι παραμένουν σταθερές ή παίζουν αμελητέο ρόλο.

Πολλές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα τρόφιμα είναι στην πραγματικότητα αμφίδρομες και έχουν τη μορφή:



Ο ρυθμός της αντίδρασης δίνεται από τη σχέση:

$$r = -\frac{1}{\alpha} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{\beta} \frac{d[B]}{dt} = +\frac{1}{\gamma} \frac{d[C]}{dt} = +\frac{1}{\delta} \frac{d[D]}{dt} = k_f [A]^\alpha [B]^\beta - k_b [C]^\gamma [D]^\delta \quad (1.4)$$

Στις περισσότερες δράσεις που συμβαίνουν στα τρόφιμα, η k_b είναι αμελητέα συγκρινόμενη με την k_f ή για το χρονικό διάστημα που υπάρχει πρακτικό ενδιαφέρον οι σταθερές απέχουν από την ισορροπία, δηλαδή οι συγκεντρώσεις των C, D είναι πολύ μικρές, οπότε η αντίδραση μπορεί να θεωρηθεί ως μονόδρομη. Συνήθως, ένα περιοριστικό αντιδρών επηρεάζει περισσότερο την ποιότητα του τροφίμου, ενώ τα άλλα συστατικά βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια ώστε η

μεταβολή της συγκέντρωσής τους με το χρόνο να θεωρείται αμελητέα (Labuza, 1984).

Έτσι, η εξίσωση της απώλειας ποιότητας μπορεί να εκφραστεί ως συνάρτηση συγκεκριμένων αντιδρώντων, π.χ. του A:

$$r = -\frac{d[A]}{dt} = k'_f [A]^a \quad (1.5)$$

όπου:

α: μια φαινόμενη ή ψευδό - τάξη της αντίδρασης του συστατικού A και

k'_f : η φαινόμενη σταθερά ρυθμού αντίδρασης

Με βάση την παραπάνω ανάλυση, για την ποσοτικοποίηση της ποιοτικής υποβάθμισης και απώλειας διατηρησιμότητας ενός τροφίμου παρακολουθούνται δείκτες ποιότητας, A ή B, οι οποίοι είτε περιγράφουν την απώλεια ενός επιθυμητού χαρακτηριστικού (λ.χ. θρεπτικά συστατικά, χαρακτηριστικό άρωμα κλπ) είτε το σχηματισμό ενός ανεπιθύμητου χαρακτηριστικού (λ.χ. ανεπιθύμητο άρωμα, ανάπτυξη μικροβιακού φορτίου, αλλαγή χρώματος).

Οι ρυθμοί απώλειας του A και σχηματισμού του B περιγράφονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

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

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

Οι δείκτες ποιότητας A και B είναι συνήθως μετρήσιμες χημικές, φυσικές, μικροβιολογικές ή οργανοληπτικές παράμετροι, χαρακτηριστικές για κάθε τρόφιμο. Τα k και k' (φαινόμενες σταθερές ρυθμού αντίδρασης) και τα m και m' (φαινόμενες τάξεις των αντιδράσεων) προσδιορίζονται πειραματικά με τους δύο παρακάτω τρόπους:

α) Διαφορικές μέθοδοι

β) Μέθοδοι με ολοκλήρωση (Hills and GriegerBlock, 1980).

➤ 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 καμπύλων που προκύπτουν από τα παραπάνω δεδομένα (π.χ. γραμμική ή πολυωνυμική προσαρμογή) είναι δυνατόν να υπολογιστούν γραφικά ή αναλυτικά οι ρυθμοί των αντιδράσεων.

Με λογαρίθμηση των εξισώσεων (1.5) και (1.6) 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 , m' .

➤ **Μέθοδοι ολοκλήρωσης**

Στις μεθόδους ολοκλήρωσης, διαχωρίζονται οι μεταβλητές των εξισώσεων (1.6) και (1.7) και ακολουθεί ολοκλήρωση. Για παράδειγμα, η εξίσωση (1.6) γίνεται:

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

Η παραπάνω σχέση είναι της μορφής:

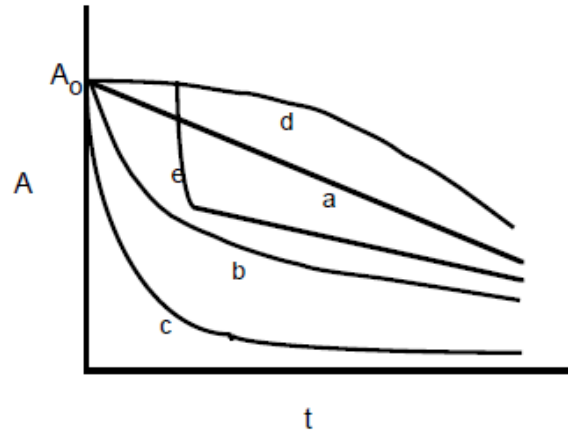
$$Q(A) = kt \quad (1.11)$$

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, m -οστή.

Πίνακας 1.4- Συναρτήσεις ποιότητας και χρόνοι ημιζωής για διαφορετικές φαινόμενες τάξεις αντιδράσεων

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



Σχήμα 1.1- Απώλεια της ποιότητας του τροφίμου συναρτήσει του χρόνου: a) γραμμική(αντίδραση μηδενικής τάξης b) εκθετική(αντίδραση πρώτης τάξης) c) υπερβολική d) τετραγωνική e) σύνθετη

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

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

Πίνακας 1.5-Σημαντικές αντιδράσεις αλλοίωσης που ακολουθούν κινητική μηδενικής ή πρώτης φαινόμενης τάξης (Taoukis,2009)

ΜΗΔΕΝΙΚΗΣ ΤΑΞΗΣ

- Αλλοίωση κατεψυγμένων τροφίμων
- Μη ενζυμικό μαύρισμα (αντιδράσεις Maillard)

ΠΡΩΤΗΣ ΤΑΞΗΣ

- Απώλεια βιταμινών
 - Μικροβιακή μείωση ή ανάπτυξη
 - Οξειδωτική απώλεια χρώματος
 - Απώλεια υφής κατά τη θερμική κατεργασία
-

Σημειώνεται ότι συνήθως η κινητική μελέτη δεν αναφέρεται συχνά 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. Για το λόγο αυτό η αναγωγή των αποτελεσμάτων σε σύστημα διαφορετικής σύστασης πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή.

Για αυτό είναι σκόπιμο, σε ορισμένα συστήματα τροφίμων να μελετάται σε βάθος ο αληθινός 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 τοξολογικής σημασίας παρά σε πραγματικά τρόφιμα (Ταούκης, 2009).

1.5 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων

Κατά την προηγούμενη κινητική προσέγγιση θεωρήθηκε ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες E_j (π.χ. θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ενεργότητα νερού, πίεση και μερική πίεση περιβαλλόντων αερίων) παραμένουν σταθεροί.

Στην πραγματικότητα, όμως, ένα μοντέλο διατηρησιμότητας δεν εξαρτάται μόνο από το ίδιο το τρόφιμο, αλλά επηρεάζεται άμεσα και από εξωγενείς παράγοντες, οι οποίοι επιδρούν ισχυρά στους ρυθμούς των αντιδράσεων ποιοτικής αλλοίωσης και κατά συνέπεια θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό του.

Γι' αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η γενίκευση των μοντέλων, ώστε να περιλαμβάνουν ως μεταβλητές και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν ισχυρά στο ρυθμό αντίδρασης. Η επίδραση των παραμέτρων αυτών μπορεί να ενσωματωθεί στα παραπάνω μοντέλα αν η σταθερά ρυθμού αντίδρασης της συνάρτησης ποιότητας εκφραστεί σαν συνάρτηση των παραμέτρων αυτών, δηλαδή:

$$k = k(E_j) \quad (1.12)$$

Από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι η θερμοκρασία, η επίδραση της οποίας στην ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων εξετάστηκε στην παρούσα εργασία.

1.5.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Από όλες τις περιβαλλοντικές παραμέτρους, η θερμοκρασία είναι εκείνη η οποία ελέγχεται λιγότερο από τη συσκευασία και καθορίζεται αποκλειστικά από τις συνθήκες αποθήκευσης. Η αύξησή της έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση στο ρυθμό των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα τρόφιμα. Αρκετά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για να περιγράψουν την επίδραση της θερμοκρασίας, τα επικρατέστερα από τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.

1.5.1.1 Μοντέλο Arrhenius

Η εξίσωση Arrhenius είναι η πιο διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη σχέση που περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της αντίδρασης και έχει την μορφή:

$$k = k_A \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad (1.13)$$

Λογαριθμίζοντας τη σχέση (1.12) προκύπτει:

$$\ln k = \ln k_A - \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (1.14)$$

όπου:

k: σταθερά ρυθμού αντίδρασης

k_A: συντελεστής Arrhenius ή σταθερά Arrhenius

E_A: ενέργεια ενεργοποίησης σε cal/mol ή J/mol

R: παγκόσμια σταθερά των αερίων (1,9872 cal/(mol*K) ή 8,314 J/(mol*K))

T: απόλυτη θερμοκρασία σε K

Εναλλακτικά των εξισώσεων (1.13) και (1.14), συχνά προτείνεται στη βιβλιογραφία και χρησιμοποιείται στην πράξη η χρήση μιας θερμοκρασίας αναφοράς, που θα είναι χαρακτηριστική του θερμοκρασιακού εύρους της μελετώμενης διεργασίας. Οι τροποποιημένες εξισώσεις έχουν τη μορφή:

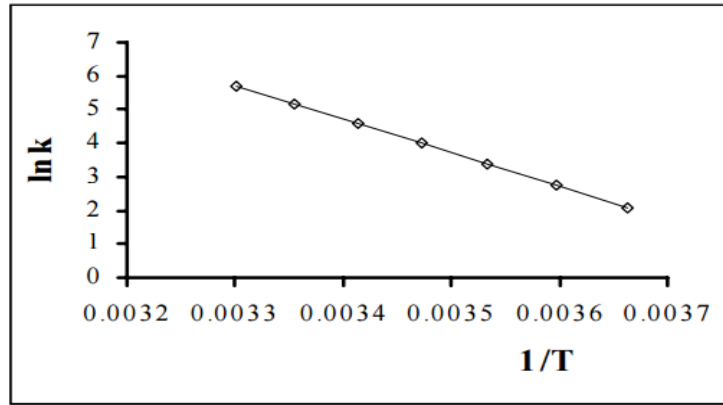
$$k = k_{ref} \exp\left(-\frac{E_A}{R} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right]\right) \quad (1.15)$$

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) \quad (1.16)$$

όπου:

k_{ref}: σταθερά ρυθμού αντίδρασης στη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}

Οι παράμετροι της εξίσωσης Arrhenius k_A (ή k_{ref}), E_A προσδιορίζονται με τη βοήθεια διαγράμματος lnk-1/T (ή lnk-(1/T-1/T_{ref})) και γραμμική παλινδρόμηση (Σχήμα 1.2), η οποία άλλωστε είναι απαραίτητη και για τον προσδιορισμό των ορίων των παραμέτρων αυτών για 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Προκειμένου τα όρια αυτά να είναι μικρά, ώστε να ληφθούν αξιόπιστες εκτιμήσεις των E_A και k_A (ή k_{ref}), χρειάζεται η κινητική μελέτη να περιλαμβάνει ικανοποιητικό αριθμό θερμοκρασιών. Ο ελάχιστος αριθμός πειραμάτων που δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα είναι 3 θερμοκρασίες ενώ ο βέλτιστος εκτιμάται σε 5 ή 6 θερμοκρασίες (Lenz and Lund, 1980; Taoukis et al., 1997).



Σχήμα 1.2- Τυπικό διάγραμμα Arrhenius απεικόνισης του lnk συναρτήσει του 1/T

1.5.1.2 Δραστική θερμοκρασία (T_{eff})

Η μεθοδολογία για τον αξιόπιστο προσδιορισμό των παραμέτρων Arrhenius που έγινε στην ενότητα §1.5.1.1 απαιτεί την διεξαγωγή τουλάχιστον τριών ισοθερμοκρασιακών πειραμάτων. Εναλλακτικά, ένα μόνο μη ισοθερμοκρασιακό πείραμα μπορεί να διεξαχθεί.

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:

$$f(A)_t = \int_0^t k dt = k_A \int_0^t \exp\left(-\frac{E_A}{RT(t)}\right) dt \quad (1.17)$$

Ένας άλλος τρόπος έκφρασης της τιμής του $f(A)_t$ είναι συναρτήσει της δραστικής θερμοκρασίας. Ως δραστική θερμοκρασία T_{eff} , ορίζεται 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 σχέση (1.16) γίνεται:

$$f(A)_t = \int_0^t k dt = k_A \exp\left(-\frac{E_A}{RT_{eff}}\right) t \quad (1.18)$$

Η δραστική θερμοκρασία είναι μία πολύ σημαντική έννοια η οποία πρακτικά αντικαθιστά μία κατανομή θερμοκρασίας $T(t)$ με μία μόνο τιμή. Η χρησιμότητά της γίνεται περισσότερο αντιληπτή στις επόμενες ενότητες. Πρέπει να τονιστεί ότι η T_{eff} δεν είναι ίση με τη μέση θερμοκρασία T_m , όπου :

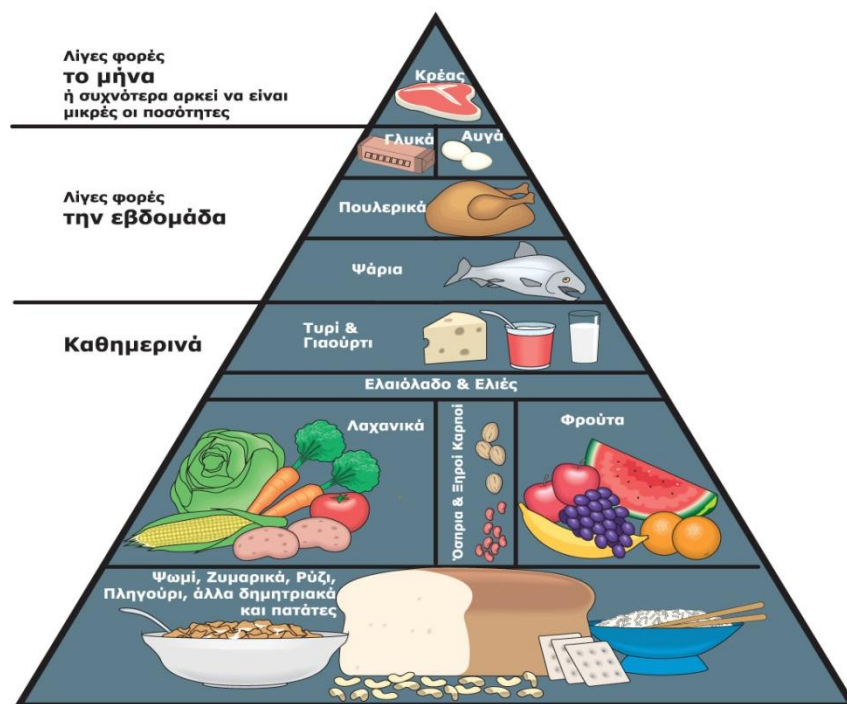
$$T_m = \frac{1}{t} \int_0^t T(t) dt \quad (1.19)$$

Κεφάλαιο 2

Κάπνιση ιχθύων

2.1 Εισαγωγή

Τα αλιεύματα αποτελούν τροφή μεγάλης διατροφικής αξίας λόγω της υψηλής βιολογικής αξίας των πρωτεϊνών τους, της πληθώρας των ιχνοστοιχείων τους και του υψηλού ποσοστού πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα της σειράς ω-3, που περιέχονται στη σάρκα τους. Η συχνή κατανάλωση ιχθύων συμβάλλει στη μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων και φλεγμονωδών νοσημάτων ενώ ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα, την όραση και την εγκεφαλική λειτουργία. Επίσης, η κατανάλωση ιχθυηρών έχει συσχετιστεί με τον περιορισμό της παχυσαρκίας (Τσιρώνη, 2010). Συνίσταται η ενσωμάτωσή τους εντός του διαιτολογίου 1-2 φορές εβδομαδιαίως.



Εικόνα 2.1-Πυραμίδα μεσογειακής διατροφής

Ωστόσο λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά, τα προϊόντα ιχθύων παρουσιάζουν ταχύτατη μικροβιολογική ανάπτυξη ενώ λαμβάνουν χώρα χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την αλλοίωσή τους και τη μείωση της διατηρησιμότητά τους.

Μία από τις αρχαιότερες μεθόδους διατήρησης των ψαριών ήταν η κάπνιση. Πολύ πριν υπάρξουν τα ψυγεία και οι καταψύκτες χρησιμοποιούνταν ένας συνδυασμός αλατιού και καπνού προκειμένου να διατηρηθούν τα ψάρια για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Σήμερα το κάπνισμα δεν είναι αναγκαίο, αλλά παραμένει

ιδιαίτερα δημοφιλές, εξαιτίας του αρώματος και της γεύσης που δίνει σε ψάρια όπως ο σολομός και η πέστροφα χωρίς να υποβαθμίζει την θρεπτική τους αξία.

2.2 Χημική σύσταση της σάρκας ιχθύων

Η σάρκα των αλιευμάτων αποτελείται από τους μυς του σώματος, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται ο συνδετικός και ο λιπώδης ιστός, το αίμα, τα λεμφικά αγγεία και τα ενδομυϊκά οστά (Zaitsev et al., 1978). Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του σώματός τους και το θρεπτικότερο τμήμα (Βαρελτζής, 2000). Αποτελείται από πρωτεΐνες, λίπος, ανόργανα άλατα, βιταμίνες, ένζυμα, μικρές ποσότητες γλυκογόνου και πλήθος ιχνοστοιχείων (μαγγάνιο, μολυβδαίνιο, ιώδιο, ψευδάργυρος, χαλκός, κοβάλτιο).

Η χημική σύσταση της σάρκας των ιχθύων επηρεάζεται από την ηλικία, το φύλο, το φυσικό περιβάλλον, στο οποίο ζουν, και από την εποχή της αλιεύσεώς τους. Ιδιαίτερα το φύλο επιδρά πολύ έντονα στη χημική σύσταση της σάρκας τους, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας στην τεχνολογία (διακύμανση πρωτεϊνών, λίπους νερού- συντήρηση). Η χημική σύσταση της σάρκας των ιχθύων, στην πράξη, προσδιορίζεται από την περιεκτικότητα της σε νερό, λίπος, αζωτούχες ουσίες και ανόργανα στοιχεία (Βαρελτζής, 2000).

Ο μυϊκός ιστός των ιχθύων περιέχει μεγάλο αριθμό αζωτούχων ενώσεων, οι οποίες διακρίνονται στις πρωτεΐνες και σε άλλα μόρια που περιέχουν άζωτο.

Οι μυϊκές **πρωτεΐνες** διακρίνονται σε τρεις βασικές ομάδες: τις σαρκοπλασμικές, τις μυοϊνικές ή συστολικές και τις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού (κολλαγόνο και ελαστίνη) (Haard, 1995). Οι **πρωτεΐνες** της σάρκας των ιχθύων είναι υψηλής βιολογικής αξίας, διότι περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα σε αξιοσημείωτη ποσότητα και ισορροπημένη αναλογία (Mengoli, 1994). Επίσης, συγκρινόμενοι με τα εδώδιμα μωσυστήματα χερσαίων ζώων, οι μυς των τελεόστεων ιχθύων περιέχουν μικρότερο ποσοστό πρωτεϊνών συνδετικού ιστού (2-3% έναντι του ποσοστού 16-28%), με αποτέλεσμα η σάρκα τους να είναι ιδιαίτερα ευμάσητη και πιο εύπεπτη (Haard, 1995).

Εκτός από τις πρωτεΐνες, στη σάρκα των ιχθύων, βρίσκονται και μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται συνολικά με την ονομασία «**μη πρωτεϊνικό άζωτο**» (Non protein nitrogen, NPN). Τα κύρια συστατικά είναι πτητικές βάσεις όπως η αμμωνία και το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), κρεατίνη, ελεύθερα αμινοξέα, νουκλεοτίδια (ATP, ADP, AMP, IMP, CP) και πουρινικές βάσεις (υποξανθίνη, ξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη) και στην περίπτωση των χονδριχθύων, η ουρία. Η σύσταση του κλάσματος των αζωτούχων μη πρωτεϊνικών ουσιών είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος και εξαρτάται από την ηλικία-μέγεθος του ψαριού, την εποχή και την προέλευσή του (Γιόγιος, 2015). Επισημαίνεται, ότι το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους θαλάσσιους ιχθύες και έχει ωσμωρυθμιστική δράση, ενώ απουσιάζει παντελώς ή βρίσκεται σε

πολύ μικρές συγκεντρώσεις στους ιχθείς του γλυκού νερού (Παπαναστασίου, 1976; Βαρελτζής, 1999).

Τα **λιπίδια** αποτελούν συνήθως το δεύτερο σε αφθονία μακροσυστατικό των ιχθύων μετά τις πρωτεΐνες. Η περιεκτικότητα των ιχθύων σε λίπη παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις, ανάλογα με το είδος, την ηλικία και την εποχή του έτους. Οι λιπαρές ουσίες στη σάρκα των θαλάσσιων τελεόστων ιχθύων ανέρχονται σε ποσοστό 0,1-25%. Τα λίπη των ιχθύων αποτελούνται από εστέρες λιπαρών οξέων (γλυκερίδια), εστέρες της στερόλης και από ένα ασαπωνοποιητό τμήμα, αποτελούμενο από ανώτερες αλκοόλες, στερόλες, αιθέρες και υδρογονάνθρακες. Στη σύνθεση των λιπών των ιχθύων, απαντάται ένας μεγάλος αριθμός λιπαρών οξέων (Παπαναστασίου, 1990). Τα λιπίδια της σάρκας των ιχθύων περιέχουν σχετικά μικρό ποσοστό κεκορεσμένων λιπαρών οξέων, ενώ έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ακόρεστα και κυρίως **πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs ή ΠΑΛΟ)**. Τα ΠΑΛΟ της ομάδας ω-3, με σημαντικότερους εκπροσώπους το εικοσιπενταενοϊκό (EPA:20:5) και το εικοσιδυο-εξαενοϊκό οξύ (DHA: 22:6), βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στα λιπίδια των ιχθύων από εκείνα της ομάδας ω-6, όπως είναι π.χ. το λινολεϊκό οξύ (18: 2n-6) (Kinsella, 1986; Ågren and Hänninen, 1993).

Οι ιχθύες και τα οστρακοειδή αποτελούν τη μοναδική φυσική πηγή από την οποία μπορεί να προμηθευθεί ο ανθρώπινος οργανισμός τα EPA και DHA ω-3 λιπαρά οξέα (Steiner-Asiedu et al., 1991; Ågren and Hänninen, 1993). Με βάση τη λιποπεριεκτικότητα του κρέατός τους διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες : άπαχα, ημιλιπαρά, λιπαρά (Βαρελτζής, 2000).

Πίνακας 2.1-Διάκριση αλιευμάτων με βάση την περιεκτικότητά τους σε λίπος και πρωτεΐνη (Palmer and Boulers, 1972)

Κατηγορία	Λίπος	Πρωτεΐνη	Αντιπροσωπευτικό είδος
Άπαχα	Χαμηλή <5% Χαμηλή <5% Χαμηλή <5%	Χαμηλή <15% Υψηλή 15-20% Πολύ υψηλή >20%	Οστρακοειδή Μπακαλιάρος Τόνος, Ψήσσα(halibut)
Ημιλιπαρά	Μέση 5-15%	Υψηλή 15-20%	Σολωμός, Σκουμπρί, Ρέγγα
Λιπαρά	Υψηλή >15%	Χαμηλή <15%	Πέστροφα(trout), Χέλι

Τα θαλασσινά ψάρια έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών από τα ψάρια του γλυκού νερού.

Οι ιχθύες έχουν πολύ μικρή περιεκτικότητα σε **υδατάνθρακες** (0,04-1,69%), δεδομένου ότι ο οργανισμός τους επενδύει ενεργειακά κυρίως στα λίπη και κατά δεύτερο λόγο στις πρωτεΐνες. Ο κυριότερος υδατάνθρακας που απαντάται στους ιχθύες είναι το γλυκογόνο (Παπαναστασίου, 1990).

Παράλληλα, τα ψάρια και θαλασσινά είναι πολύ καλή **βιταμινών** και **ανόργανων συστατικών**. Οι ιχθύες περιέχουν αρκετές ποσότητες βιταμινών, κυρίως

λιποδιαλυτών. Το λίπος των ιχθύων αποτελεί σημαντική πηγή των λιποδιαλυτών βιταμινών Α και D. Σε σημαντικές περιεκτικότητες απαντώνται εξάλλου και οι βιταμίνες Ε (τοκοφερόλη) και Κ καθώς επίσης και οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες (Belitz et al., 2009). Όσον αφορά τα ανόργανα συστατικά, το κρέας των ιχθύων θεωρείται πολύτιμη πηγή ασβεστίου και φωσφόρου αλλά και σιδήρου, χαλκού και σεληνίου. Τα θαλάσσια είδη περιέχουν επίσης σημαντικές ποσότητες ιωδίου, το οποίο είναι σημαντικό για τη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος. Σημειώνεται, ότι οι ιχθείς της θάλασσας περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα ανόργανων αλάτων απ' ότι οι ιχθείς του γλυκού νερού. Μάλιστα στη σάρκα των ψαριών του γλυκού νερού δεν υπάρχει ιώδιο ή βρώμιο (Βαρελτζής, 2000).

Το νερό στο μυϊκό ιστό βρίσκεται δεσμευμένο ή ελεύθερο. Ως δεσμευμένο νερό θεωρείται η ποσότητα του νερού, η οποία κατά την κίνηση των μορίων των πρωτεϊνών σ' ένα διάλυμα μεταφέρεται με την μονάδα βάρους της πρωτεΐνης. Η υπόλοιπη ποσότητα νερού, που περιέχει η σάρκα των ιχθύων, βρίσκεται μέσα στο μυϊκό ιστό ελεύθερη. Αν η σάρκα υποστεί μια οποιαδήποτε επεξεργασία (κατάψυξη, θέρμανση, ξήρανση κτλ.), τότε η αναλογία μεταξύ των δύο ειδών νερού (δεσμευμένο-ελεύθερο) μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεταβολές στην υφή της (Βαρελτζής, 2000).

2.3 Αίτια ποιοτικής αλλοίωσης ιχθύων

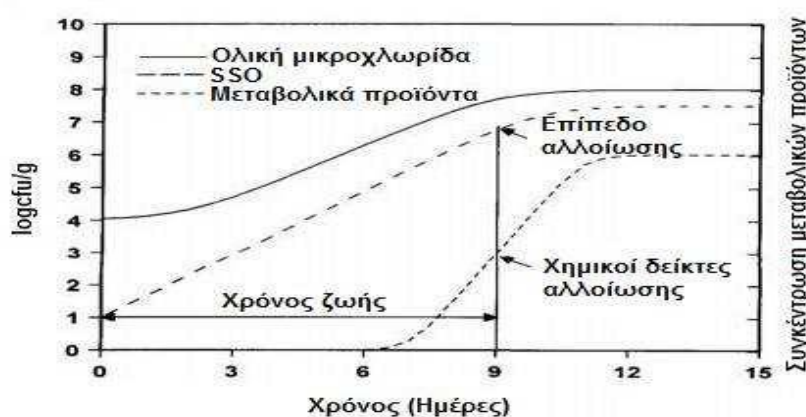
Η ποιοτική υποβάθμιση της σάρκας των ιχθύων αρχίζει από τη στιγμή της σύλληψής τους. Αιτίες αλλοίωσης των ψαριών είναι ενζυμικές και οξειδωτικές αντιδράσεις και η ανάπτυξη βακτηρίων. Συνέπεια των διαδικασιών αυτών είναι η μεταβολή των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών.

Στη σάρκα των ιχθύων υπάρχουν ενδογενή ένζυμα, τα οποία μετά το θάνατό τους εξακολουθούν να είναι ενεργά με αποτέλεσμα την πτώση του pH της σάρκας τους από 7,0 στο 6,5 έως 6,0 (Liston, 1982). Η δράση των ενζύμων προκαλεί μεταβολές στο άρωμα και στη γεύση των ιχθύων. Πρωτεολυτικά ένζυμα της σάρκας νωπών ιχθύων διασπούν τις πρωτεΐνες σε αμινοξέα και προσδίδουν στα ψάρια ευχάριστο άρωμα. Η συνεχόμενη όμως δράση των ενζύμων αυτών και το διάστημα της συντήρησης των ιχθύων έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών, οι οποίες καθιστούν το προϊόν μη καταναλώσιμο (Βαρελτζής, 1999).

Η οξειδωτική τάγγιση των λιπών είναι μία από τις κυριότερες αιτίες απώλειας ποιότητας των ιχθύων, εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) και των υψηλών συγκεντρώσεων καταλυτών όπως ιόντων σιδήρου και αιμοσφαιρίνης (Γιόγιος, 2015). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να οξειδωθούν με *αυτοοξείδωση* (αντίδραση με οξυγόνο) ή με τη δράση *ενζύμων* (λιποξυγενάσες), σχηματίζοντας αρχικά υπεροξειδία που είναι άοσμες ουσίες και ελεύθερες ρίζες (Davis, 1995; Lindsay, 1996; Nawar, 1996). Τα επόμενα ενδιάμεσα και τα τελικά προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων που περιλαμβάνουν μεταξύ των άλλων αλκοόλες, αλδεΐδες και κετόνες, αρχικά συνεισφέρουν στο χαρακτηριστικό

άρωμα και τη γεύση των νωπών ιχθύων, στη συνέχεια όμως προσδίδουν στη σάρκα τους έντονες και δυσάρεστες οσμές και γεύσεις (Ackman και Gunnlaugsdottir, 1992; Lindsay, 1996). Η οξειδωση των PUFA's ακόμα και σε μικρές ποσότητες προκαλεί το σχηματισμό οσμηρών προϊόντων. Η αυτοοξειδωση επιταχύνεται όταν υπάρχει περίσσεια οξυγόνου, φωτός, υγρασίας, αυξημένη θερμοκρασία και ουσίες με προοξειδωτική-καταλυτική δράση όπως ιόντα μετάλλων. Ιδιαίτερα στα λιπαρά ψάρια η αυτοοξειδωση μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση της ποιότητας ακόμα και κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασίες υπό το μηδέν (Huss, 1995).

Ο σημαντικότερος λόγος ποιοτικής υποβάθμισης των ιχθύων είναι η μικροβιακή ανάπτυξη. Στην εξωτερική επιφάνεια των ζωντανών ιχθύων, στα βράγχια και στο πεπτικό τους σύστημα ανευρίσκονται διάφοροι μικροοργανισμοί, η είσοδος των οποίων στη σάρκα αποτρέπεται από τη φυσική άμυνα του οργανισμού τους. Μετά το θάνατο τους, οι μικροοργανισμοί αυτοί εισέρχονται και διαχέονται στη σάρκα, όπου αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται αρχικά με αργούς και στη συνέχεια με έντονους ρυθμούς. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε ανεπιθύμητες αλλαγές της οσμής, της γεύσης και της εμφάνισης των υπό ψύξη ιχθύων, με συνέπεια την αλλοίωση και την περιορισμένη διατηρησιμότητα (Βασιλειάδου, 2002). Ωστόσο, από το σύνολο των μικροοργανισμών, που αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα των νωπών ιχθύων, μόνο ένα μέρος μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλους πληθυσμούς ικανούς να συμβάλλουν στην αλλοίωση. Ο όρος «ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί» (specific spoilage organisms-SSO) χαρακτηρίζει το κλάσμα της συνολικής μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση του κάθε είδους ιχθύος (Τσιρώνη, 2010).



Εικόνα 2.2- Γενική περιγραφή της αλλοίωσης ιχθυηρών (Τσιρώνη, 2010)

Η ποικιλόθερμη φύση των ιχθύων επιτρέπει την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών. Η ενδογενής χλωρίδα των ιχθυηρών στα εύκρατα κλίματα αποτελείται κυρίως από Gram-αρνητικούς βακίλους, που ανήκουν κατά κύριο λόγο στα γένη *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella putrefaciens*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio* και *Aeromonas*. Ωστόσο Gram-θετικοί οργανισμοί όπως οι *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Corynebacterium* μπορούν να

ανιχνευθούν σε διάφορες αναλογίες (Gram et al., 1996). Η μικροχλωρίδα στους ιχθύες τροπικών υδάτων εμφανίζει συχνά μεγαλύτερο αριθμό Gram-θετικών οργανισμών και εντεροβακτηρίων, αλλά σε γενικές γραμμές είναι όμοια με την αντίστοιχη των ιχθύων που αναπτύσσονται σε εύκρατα κλίματα (Liston, 1982). Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί(SSO) που έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση των ιχθυηρών κατά τη συντήρηση παρουσία αέρα, υπό κενό και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.

Πίνακας 2.2-Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί ιχθύων σε θερμοκρασίες ψύξης

Ατμόσφαιρα	Εύκρατη ζώνη	Τροπική ζώνη
Αέρας	<i>Shewanella putrefaciens</i> ¹ <i>Pseudomonas sp.</i> ²	<i>Shewanella putrefaciens</i> ¹⁰ <i>Pseudomonas sp.</i> ^{10,11}
Κενό	<i>Shewanella putrefaciens</i> ³ <i>Photobacterium phosphoreum</i> ⁴ Γαλακτικά βακτήρια ^{5,6} <i>Brochothrix thermosphacta</i> ^{5,7} Άλλοι Gram-θετικοί ⁸	Άλλοι Gram-θετικοί ¹²
CO ₂	<i>Photobacterium phosphoreum</i> ⁹ Γαλακτικά βακτήρια ⁵ <i>Brochothrix thermosphacta</i> ⁵	Γαλακτικά βακτήρια ¹³ Άλλοι Gram-θετικοί TMAO-αναγωγικά βακτήρια ¹⁴

¹ Levin (1968), Herbert et al. (1971), Jorgensen et al. (1989), ² Koutsoumanis et al. (1999a,b, 2000), ³ Dalgaard et al. (1993), Jorgensen et al. (1988), ⁴ Dalgaard et al. (1993), ⁵ Koutsoumanis et al. (1998), ⁶ Tsironi et al. (2008), ⁷ Drosinos et al., 1996, ⁸ Hussain et al. (1976), ⁹ Dalgaard et al. (1993, 1995), ¹⁰ Gillespie et al. (1975), Gram (1992), ¹¹ Gram et al. (1990), ¹² Pedersen et al. (1995), ¹³ Banks et al. (1980), ¹⁴ Reddy et al. (1995)

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στους ιχθείς παράγουν ουσίες που συνεισφέρουν στην οργανοληπτική και όχι μόνο αλλοίωση του ψαριού. Τέτοιες ουσίες είναι η υδροξυλαμίνη, βιογενείς αμίνες, κετόνες, αλδεΐδες, αλκοόλες και οργανικά οξέα ενώ κυριότερος αντιπρόσωπος όλων είναι η τριμεθυλαμίνη(TMA), η οποία προέρχεται από το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (trimethylamine oxide, TMAO) που περιέχεται στα θαλάσσια ψάρια (Kulawik et al., 2013). Στα ψάρια και θαλασσινά, η παραγωγή τριμεθυλαμίνης προκαλεί την χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή τους. Η παραγωγή πτητικών ουσιών από μικροβιολογική αλλοίωση συνυπάρχει συνήθως με τα πτητικά προϊόντα της οξείδωσης των λιπών. Έτσι, η παρουσία της τριμεθυλαμίνης με την έντονη οσμή «ψαρίλας» από τη δράση μικροοργανισμών, συνοδεύεται από την παρουσία της 2,4,7-δεκατριενάλης από την οξείδωση των λιπών, δεδομένου ότι οσμή «ψαρίλας» αναπτύσσεται επίσης κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων. Ο συνδυασμός τους προσδίδει τη δυσάρεστη οσμή άρα και την μειωμένη αποδοχή από τους καταναλωτές (Lindsay, 1990).

2.4 Μέθοδοι συντήρησης ιχθύων

Για την ανάσχεση της ποιοτικής υποβάθμισης των ιχθυηρών χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι συντήρησης, οι επικρατέστερες των οποίων είναι:

- Ψύξη
- Κατάψυξη
- Χρήση συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας(MAP)
- Συσκευασία υπό κενό
- Αλάτιση
- **Κάπνιση**
- Αποστείρωση-Κονσερβοποίηση

2.5 Κάπνιση

Ο κύριος σκοπός της κάπνισης σήμερα είναι η παραγωγή προϊόντων με ευχάριστη οσμή και γεύση. Οι καπνιστοί ιχθείς συντηρούνται περισσότερο χρόνο από ότι τα νωπά. Αυτό οφείλεται τόσο στην επίδραση του καπνού όσο και της αλάτισης. Με την κάπνιση επιτυγχάνεται σημαντικός περιορισμός του βακτηριακού φορτίου των ιχθύων, μείωση του ποσοστού υγρασίας, μείωση της δραστηριότητας των ενζυμικών συστημάτων των βακτηρίων και του τροφίμου και εμπλουτισμός της σάρκας τους με ουσίες που προέρχονται από τον καπνό, ορισμένες από τις οποίες έχουν βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση.

Βασική προϋπόθεση για την παραγωγή καπνιστών προϊόντων υψηλής ποιότητας είναι η άριστη ποιότητα της πρώτης ύλης. Η προετοιμασία των ιχθύων πριν την κάπνισή τους περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Επιμελές πλύσιμο σε τρεχούμενο πόσιμο νερό
- Καθαρισμός(αποκεφαλισμός, εκσπλαχνισμός, κοπή πτερυγίων, αφαίρεση βραγχίων κ.λ.π.)
- Τεμαχισμός σε φιλέτα ή φέτες(σε ορισμένες περιπτώσεις)
- Αλάτιση
- Μερική αποξήρανση

Η σύνθεση του καπνού και οι συνθήκες επεξεργασίας της πρώτης ύλης επηρεάζουν την οργανοληπτική ποιότητα, τη διάρκεια ζωής και την θρεπτική αξία του προϊόντος (Stolyhwo and Sikorski, 2005).

2.5.1 Παραγωγή, χημική σύσταση και ιδιότητες καπνού

Ο καπνός που χρησιμοποιείται για το κάπνισμα προϊόντων παράγεται με ατελή καύση ξύλου. Επειδή από κάθε είδος ξύλου παράγεται καπνός διαφορετικής χημικής σύνθεσης, για το λόγο αυτό στην κάπνιση χρησιμοποιούνται συνήθως μείγματα από πολλά είδη ξύλων. Για την κάπνιση των ιχθύων χρησιμοποιούνται τα ξύλα της οξιάς, της βελανιδιάς της καστανιάς, της λεύκας, της σημύδας, κ.α,

συνήθως σε μορφή πριονιδιών. Ως αρωματικά μέσα χρησιμοποιούνται φύλλα δάφνης, δενδρολίβανο, θυμάρι κ.ά. Ξύλα από κωνοφόρα ρητινούχα δέντρα αποκλείονται, διότι ορισμένα από αυτά είναι τοξικά ενώ άλλα δίνουν στο τρόφιμο γεύση πετρελαίου (Πανέτσος, 1978; Γεωργάκης et al., 2000). Τα ξύλα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την κάπνιση των ιχθύων ως έχουν ή με τη μορφή πριονιδιών πρέπει να είναι ξηρά και απαλλαγμένα από συντηρητικές ουσίες. Υγρά ξύλα ή πριονίδια περιέχουν μύκητες που μπορεί να μεταδώσουν τη δυσάρεστη οσμή μούχλας στα τελικά προϊόντα, ενώ οι συντηρητικές ουσίες μπορεί να καταστήσουν τα καπνιστά προϊόντα επικίνδυνα για κατανάλωση (Horner, 1992).

Κατά την κάπνιση, τα διάφορα συστατικά του καπνού απορροφούνται από τα κενά που σχηματίζονται μεταξύ των κυττάρων των επιφανειακών στιβάδων των ιχθύων στο στάδιο της αποξήρανσης τους. Μερικά συστατικά εισχωρούν και διαχέονται στο εσωτερικό της σάρκας (Βασιλειάδου, 2002). Ο καπνός είναι ένα μίγμα αέρα, υδρατμών, CO₂, CO και εκατοντάδων οργανικών ενώσεων. Ορισμένες από τις παραπάνω ενώσεις είναι επιθυμητές, γιατί συμβάλουν σε επιθυμητά αποτελέσματα όπως το άρωμα, το χρώμα, την ικανότητα συντήρησης νερού έχοντας παράλληλα αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες, ενώ κάποιες άλλες έχουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως την επιβάρυνση του τροφίμου με τοξικές ουσίες και την καταστροφή κάποιων βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών (Hamm, 1977).

Στο χαρακτηριστικό άρωμα και στη γεύση των καπνιστών προϊόντων συμβάλλουν κατά κύριο λόγο οι φαινολικές ουσίες ενώ οι καρβονυλικές ενώσεις και τα οξέα πιθανά συμμετέχουν ελάχιστα στην διαμόρφωση του αρώματος. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του καπνού προέρχονται από την παρουσία συγκεκριμένων φαινολών. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του καπνού οφείλονται κατά κύριο λόγο στη δράση καρβονυλικών ενώσεων (π.χ. φορμαλδεΐδη), οξέων και φαινολικών ενώσεων. Διάφοροι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ζύμες) μπορούν να θανατωθούν από τη δράση του καπνού ή να αναστείλουν την ανάπτυξή τους (Γεωργάκης, 1986; Sikorski et al., 1995). Η συντηρητική δράση του καπνού αφορά κυρίως τα επιφανειακά στρώματα της σάρκας των υπό κάπνιση ιχθύων. Το χαρακτηριστικό χρυσό-καφέ χρώμα είναι αποτέλεσμα των καρβονυλικών ενώσεων οι οποίες αντιδρούν με ελεύθερες αμινικές ομάδες των πρωτεϊνών στα επιφανειακά στρώματα της σάρκας των ιχθύων με αντιδράσεις μη ενζυμικού μαυρίσματος τύπου Maillard (Horner, 1992). Τα οξέα επίσης συμμετέχουν στο χρωματισμό προκαλώντας υδρόλυση των πρωτεϊνών της επιφάνειας και δημιουργώντας μαύρα πηγάματα τα οποία, όταν παράγονται σε μεγάλη έκταση εμποδίζουν τη διείσδυση στο εσωτερικό της σάρκας των συστατικών του καπνού. Ο καπνός όμως περιέχει και κάποια τοξικά συστατικά, κυρίως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), όπως το βενζο[α]πυρένιο το οποίο έχει καρκινογόνες ιδιότητες (Ζώτος, 2003). Η συγκέντρωση των πολυκυκλικών υδρογονανθράκων στον καπνό εξαρτάται από τον τρόπο παραγωγής του καπνού και μπορεί να περιοριστεί σε μεγάλο βαθμό με τη χρήση κατάλληλων διεργασιών, π.χ με εξωτερική παραγωγή

καπνού και καθαρισμό του καπνού με ψυχρές παγίδες, ψεκασμό ή φίλτρα (Belitz et al., 2009).

Πίνακας 2.3- Κυριότερες ομάδες οργανικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στον παραγόμενο καπνό από την ατελή καύση ξύλων

Είδος ενώσεων
Καρβοξυλικά οξέα
Εστέρες
Αλκοόλες
Αλδεύδες
Κετόνες
Αιθέρες
Φουράνες
Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες
Αζωτούχες ενώσεις

(Πηγή:Doe et al., 1998)

2.5.2 Μέθοδοι κάπνισης

Θερμή κάπνιση: Κατά τη θερμή κάπνιση χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες 65-120°C. Στην περίπτωση των ψαριών χρησιμοποιούνται γενικά θερμοκρασίες 65-90°C και χρόνοι 30-40 min. Η κάπνιση γίνεται μέσα σε ειδικούς θαλάμους, τα καπνιστήρια. Πριν από τη συσκευασία η θερμοκρασία του προϊόντος πρέπει να κατέβει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, κατά προτίμηση με φυσική έκθεση (Iliadis, 2004). Τα καπνιστά προϊόντα παρουσιάζουν λιγότερους κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή δεδομένου ότι η θερμική επεξεργασία μειώνει το βακτηριακό πληθυσμό στο προϊόν (σε διαφορετική έκταση ανάλογα με τη θερμοκρασία παστερίωσης) και αδρανοποιεί τα ένζυμα (Siskos, 2004). Τα ψάρια που επεξεργάστηκαν με θερμή κάπνιση δεν χρειάζονται περαιτέρω μαγείρεμα πριν την κατανάλωση (<http://www.fao.org>).

Ψυχρή κάπνιση: Είναι μια σχετικά μακρά διεργασία κατά την οποία το τρόφιμο δεν θερμαίνεται αλλά μάλλον ξηραίνεται. Η θερμοκρασία στο εσωτερικό του θαλάμου κάπνισης κυμαίνεται, ανάλογα με την περίπτωση, από 18 - 33°C. Στη θερμοκρασία αυτή αποφεύγεται η μετουσίωση των πρωτεϊνών των αλιευμάτων (Arvanitoyannis and Koutsanopoulos, 2012). Το κάπνισμα διαρκεί από μερικές ώρες μέχρι αρκετές εβδομάδες, ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, π.χ. κάπνισμα λιπαρών αλιευμάτων όπως η ρέγγα και το σκουμπρί, η θερμοκρασία μπορεί να φθάσει έως τους 40°C, έτσι ώστε το λίπος των παραπάνω αλιευμάτων να κατανεμηθεί ομοιόμορφα στην επιφάνεια προσδίδοντας καλύτερη εμφάνιση (Dillon

et al., 1994). Καθώς η θερμοκρασία του καπνού δεν ξεπερνάει τους 33°C, το καπνιστό αλίευμα δεν έχει καθόλου μαγειρευτεί. Το καπνιστό προϊόν συνήθως μαγειρεύεται πριν την κατανάλωση του, με εξαίρεση τον καπνιστό σολομό (Dillon et al., 1994).

Ηλεκτροστατική κάπνιση: Αποτελεί μέθοδο θερμής κάπνισης. Στην επεξεργασία αυτή ο καπνός διέρχεται από ηλεκτρικό πεδίο με υψηλό δυναμικό (20-60 kV). Τα σωματίδια του καπνού διερχόμενα του ηλεκτρικού πεδίου φορτίζονται θετικά και προσανατολίζονται, ώστε να επικαθίσουν στην αρνητικά φορτισμένη σάρκα των αλιευμάτων. Η ξήρανση των αλιευμάτων που πρόκειται να καπνιστούν με τη μέθοδο του ηλεκτροστατικού καπνίσματος γίνεται με υπέρυθρη ακτινοβολία. Είναι φανερό ότι η διαδικασία του ηλεκτροστατικού καπνίσματος αλλάζει τη σύσταση των πτητικών συστατικών του καπνού, με αποτέλεσμα οι οργανοληπτικές ιδιότητες των καπνιστών αλιευμάτων να διαφέρουν από τις αντίστοιχες των αλιευμάτων που καπνίζονται με παραδοσιακές μεθόδους (Maga, 1988). Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μείωση του χρόνου κάπνισης στο 1/8 – 1/10 του χρόνου που απαιτείται στις άλλες μεθόδους (Βαρελτζής, 2000).

Υγρή κάπνιση: Είναι σχετικά νέα μέθοδος στη οποία ο υγρός καπνός αποτελεί προϊόν συμπύκνωσης και κλασματικής απόσταξης του καπνού που προέρχεται από την ατελή καύση των ξύλων. Πρόκειται δηλαδή για διάλυμα συμπυκνωμένου καπνού σε νερό ή λάδι, ή εκχύλισμα καπνού σε οργανικούς διαλύτες. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο κάπνισης οι ιχθύες ψεκάζονται με διαλύματα υγρού καπνού ή εμβυθίζονται σε διαλύματα αυτού ορισμένης πυκνότητας. Η σύνθεση του υγρού καπνού διαφέρει ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής του. Στο εμπόριο κυκλοφορούν και διάφορα συμπυκνώματα καπνού σε στερεή μορφή (π.χ. σε σκόνη), δεδομένου ότι ο υγρός καπνός μπορεί να προσροφηθεί από καρυκεύματα, σάκχαρα, διάφορους τύπους αμύλου, κ.ά.. Η χρησιμοποίηση του υγρού καπνού παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των προαναφερόμενων μεθόδων κάπνισης, όπως απουσία ή υπερβολικά χαμηλές συγκεντρώσεις ουσιών με καρκινογόνες ιδιότητες (π.χ. PAHs), ελάχιστες απώλειες σε διατροφικά συστατικά και μικρότερη περιβαλλοντική επιβάρυνση σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους κάπνισης (Δημητριάδου, 2010).

2.6 Φυσικοχημικές μεταβολές κατά την κάπνιση των ιχθύων

Η συνολική διαδικασία κάπνισης των ιχθύων (αλάτιση, αποξήρανση, κάπνιση) μεταβάλλει το pH, την ενεργότητα νερού, τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και τη χημική σύσταση της σάρκας τους.

Τα μη επεξεργασμένα αλιεύματα έχουν pH ελαφρώς χαμηλότερο του 7,0 (Love, 1997). Κατά τη διαδικασία του καπνίσματος το pH στους ιστούς των αλιευμάτων μειώνεται συνήθως κοντά στο 6,5. Για την καπνιστή πέστροφα το pH κυμαίνεται μεταξύ 5,4-6,1, για το καπνιστό σκουμπρί 6,4-6,7, για την καπνιστή ρέγγα 6,4-6,5, και για τον καπνιστό σολομό 6,7-6,9 (Doe et al., 1998). Επίσης, με τις διεργασίες της

αλάτισης, της ξήρανσης και της κάπνισης μειώνεται η ενεργότητα νερού. Η μείωση τόσο του pH όσο και της ενεργότητας νερού παρεμποδίζουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και αυξάνουν το χρόνο συντήρησης των καπνιστών προϊόντων.

Έχουν ήδη αναφερθεί στην υποενότητα 2.5.1 πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξη του αρώματος, της γεύσης και του χρώματος των καπνιστών ιχθύων ως αποτέλεσμα της συνολικής διαδικασίας κάπνισης και των αντιδράσεων συστατικών της σάρκας τους με τα συστατικά του καπνού. Η επίδραση της διαδικασίας κάπνισης στην υφή των τελικών προϊόντων εξαρτάται από ένα πλήθος παραγόντων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο τρόπος και ο χρόνος αλάτισης, ο βαθμός αποξήρανσης, η θερμοκρασία, η υγρασία και η ταχύτητα κίνησης του καπνού και των δομικών ουσιών της σάρκας των ιχθύων (πρωτεΐνες, λίπη, κ.α.) (Horner, 1992; Βαρελτζής, 1999).

Η διαδικασία της κάπνισης επηρεάζει τη θρεπτική αξία της σάρκας των ιχθύων κυρίως με τη σχετική μείωση της βιολογικής διαθεσιμότητας των πρωτεϊνών. Το αλάτισμα των αλιευμάτων που προηγείται του καπνίσματος προκαλεί απώλεια πρωτεϊνών η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση της άλμης και από το χρόνο αλατίσματος. Κατά το διάστημα ιδιαίτερα της θερμής κάπνισης παρατηρείται μείωση της διαλυτότητας των σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών και εκείνων των μυϊκών ινιδίων, γεγονός που οφείλεται στην επίδραση της θερμότητας, του χρόνου καπνίσματος και των συστατικών του καπνού (Γεωργάκης et al., 2000). Πολύ υψηλές θερμοκρασίες κάπνισης, έχουν ως αποτέλεσμα την αντίδραση καρβονυλικών και φαινολικών ενώσεων του καπνού με τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα των επιφανειακών στρωμάτων της σάρκας των ιχθύων με αντιδράσεις Maillard, με αποτέλεσμα την μείωση της διαθεσιμότητας απαραίτητων αμινοξέων όπως η λυσίνη, η μεθειονίνη και η τρυπτοφάνη. Ωστόσο, ακόμα και αυτές οι απώλειες είναι σχετικά μικρές (Hall, 1997). Επειδή τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν άριστο υπόστρωμα οξειδωσης, η οποιαδήποτε θρεπτική τους αξία μπορεί να υποβαθμιστεί κατά τη διάρκεια της ξήρανσης και του καπνίσματος. Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη σημαντικής οξειδωτικής δράσης ως αποτέλεσμα των παραπάνω επεξεργασιών και δεν διαπιστώθηκε σημαντική μείωση των ευεργετικών λιπαρών οξέων των αλιευμάτων (Bhuiyan et al., 1986). Οι βιταμίνες και τα ανόργανα συστατικά γενικά κατά την κάπνιση παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα.

2.7 Αλλοίωση καπνιστών ιχθύων κατά τη συντήρηση

Τα καπνιστά προϊόντα ιχθύων έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τους νωπούς ιχθύς από τους οποίους προέρχονται, κυρίως λόγω της συνεργιστικής δράσης της αλάτισης και της αφυδάτωσης που έχουν ως συνέπεια τη μείωση της τιμής της ενεργότητας του νερού, του καπνού και, ενδεχόμενα, της συσκευασίας τους, όταν γίνεται σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου (Reduced Oxygen Packaging: ROP).

Η συσκευασία σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου περιλαμβάνει μια πλειάδα εφαρμογών (σε κενό, σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες – MAP: Modified Atmosphere Packaging, σε ελεγχόμενες ατμόσφαιρες – CAP: Controlled Atmosphere Packaging κ.ά.) και συνεισφέρει στη μακρόχρονη συντήρηση των καπνιστών ιχθύων, δεδομένου ότι:

- δημιουργεί αναερόβιο περιβάλλον που αναχαιτίζει την ανάπτυξη των αερόβιων σηψιγόνων οργανισμών, όπως είναι τα Gram- βακτήρια (π.χ. *Pseudomonas*) και των αερόβιων ζυμών και μυκήτων, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών, γλοιώδους επιστρώματος και αλλαγών στην υφή – σύσταση των προϊόντων
- περιορίζει σημαντικά τις οξειδωτικές διαδικασίες των λιπιδίων (Davis, 2000)
- αποτρέπει την απώλεια υγρασίας που έχει ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του προϊόντος

Η αντιοξειδωτική δράση της καπνού σε συνδυασμό με την εμβάπτιση των ιχθύων σε άλμη-ιδιαίτερα όταν σε αυτή έχουν προστεθεί νιτρώδη άλατα-και τη συσκευασία σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου έχουν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση των οξειδωτικών διεργασιών των λιπιδίων. Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας διαπιστώθηκε ότι η οξείδωσή τους σε συνθήκες συντήρησης δεν ήταν εκτεταμένη (Δημητριάδου, 2010). Μικρή αλλά όχι σημαντική αύξηση στην οξείδωση των λιπιδίων παρατηρήθηκε και σε καπνιστά φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα υπό κενό (Βασιλειάδου, 2002).

Έτσι, η κύρια αιτία αλλοίωσης των καπνιστών ιχθύων είναι η μικροβιακή ανάπτυξη. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζεται από τη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, τη θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία, την πυκνότητα του καπνού και τη συσκευασία (Kolodziejaska et al., 2002). Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε χαμηλές θερμοκρασίες συσκευασμένων σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου καπνιστών αλιευμάτων είναι κατά κύριο λόγο ψυχρότροφα Gram+ γαλακτικά βακτήρια (LAB). Τα γαλακτικά βακτήρια που αναπτύσσονται και αποτελούν τους ειδικούς μικροοργανισμούς αλλοίωσης (SSO) στα καπνιστά ψάρια ανήκουν στα γένη *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* and *Streptococcus* (Lyhs, 2002; Besharati, 2004). Ο πολλαπλασιασμός των LAB έχει ως συνέπεια την πτώση του pH της σάρκας των καπνιστών ιχθύων, μέχρις ότου η πρωτεόλυση συνεισφέρει στην εκ νέου αύξησή του (Civera et al., 1995). Ανάλογα με τη μέθοδο καπνίσματος ο πληθυσμός των LAB μπορεί να διαφέρει. Σε ψυχρά καπνισμένες πέστροφες ο πληθυσμός των LAB ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από τις θερμά καπνισμένες λόγω της διαφορετικής θερμοκρασίας κάπνισης (Besharati, 2004).

Ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης μπορεί να αναπτυχθεί το παθογόνο *Listeria monocytogenes*. Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο Gram+ βακτήριο και έχει βρεθεί σε μη επεξεργασμένα και επεξεργασμένα αλιεύματα συμπεριλαμβανομένων και των καπνιστών (Seeling and Jones, 1986). Το συγκεκριμένο παθογόνο αποτελεί έναν από τους πιο ανθεκτικούς μικροοργανισμούς και εάν υπάρχει στο αρχικό νωπό αλιεύμα, η επεξεργασία του καπνίσματος δεν θα τον αδρανοποιήσει όπως συμβαίνει με πολλά βακτήρια (Espe et al., 2004; Arvanitoyannis and Kotsanopoulos, 2011). Η *L. monocytogenes* επιβιώνει τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, μεταξύ 1°C και 45°C (Arvanitoyannis and Kotsanopoulos, 2011). Επίσης η συσκευασία των αλιευμάτων υπό αναερόβιες συνθήκες δεν παρεμποδίζει την ανάπτυξη της. Η παρουσία της *L. monocytogenes* σε καπνιστά αλιεύματα που καταναλώνονται ως έχουν χωρίς επιπλέον θερμική επεξεργασία προκαλεί λιστερίωση και συνεπώς αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών (Espe et al., 2004). Η επικινδυνότητά της εντοπίζεται κυρίως στους ιχθείς που υποβλήθηκαν σε ψυχρή κάπνιση. Οι Kolodziejaska et al., (2002) ανακοίνωσαν συχνότητα εμφάνισης *L. monocytogenes* σε ψυχρά καπνισμένα αλιεύματα της τάξης του 11-60% ενώ σε θερμά καπνισμένα 4-12%. Σύμφωνα με τους Rorvik et al., (1995) ο υγρός καπνός έχει ανασταλτική δράση στο συγκεκριμένο βακτήριο. Ως εκ τούτου, συνίσταται ιδιαίτερη προσοχή στους χειρισμούς και την τήρηση των απαραίτητων συνθηκών υγιεινής κατά την παραγωγή των καπνιστών ιχθύων, γιατί η διάρκεια συντήρησής τους επηρεάζεται από το είδος και τον πληθυσμό της χλωρίδας επιμόλυνσης.

Ο χρόνος συντήρησης (διάρκεια ζωής) των καπνιστών ιχθύων εξαρτάται από το είδος των ιχθύων και την ποιότητά τους, τη μορφή επεξεργασίας τους (π.χ. ολόκληροι ή σε φιλέτα), την ένταση της αλάτισης και της αποξήρανσης, τη μέθοδο της κάπνισης που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή τους και τις συνθήκες συσκευασίας και συντήρησής τους. Καπνιστά προϊόντα που παρασκευάζονται από λευκόσαρκους ιχθύς συντηρούνται γενικά καλύτερα από εκείνα που παρασκευάζονται από ιχθύς με υψηλή λιποπεριεκτικότητα, λόγω του μικρότερου βαθμού των οξειδωτικών διεργασιών των λιπιδίων που συμβαίνουν στη σάρκα τους. Επίσης, ιχθείς που έχουν υποστεί έντονη επεξεργασία κατά τη διάρκεια της κάπνισής τους (ισχυρή αλάτιση, έντονη αποξήρανση και κάπνιση) διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Βασιλειάδου, 2002).

2.8 Ιριδίζουσα πέστροφα

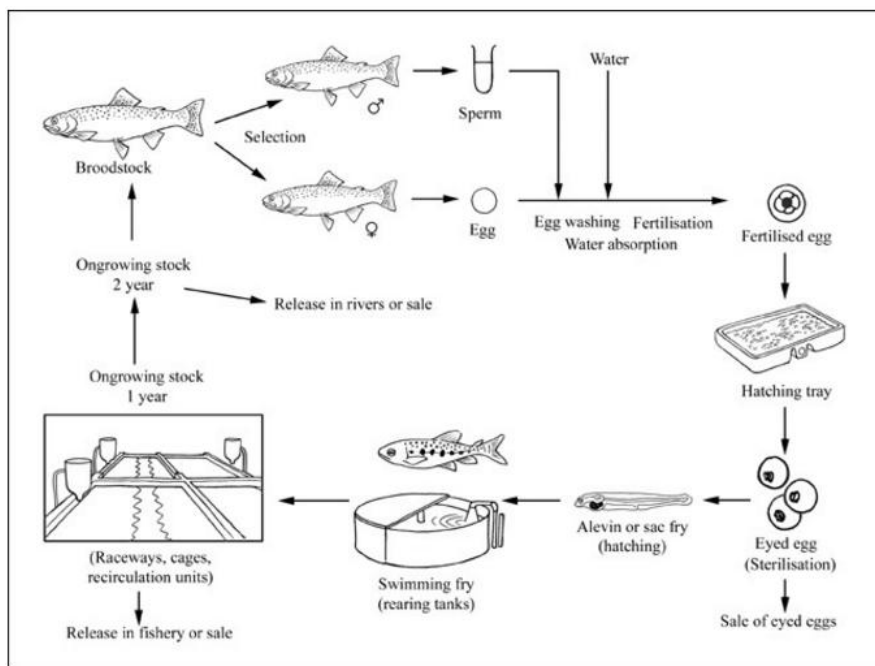
Η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), η οποία έχει ονομαστεί έτσι λόγω των πολλών ιριδίζουσών κηλίδων στο δέρμα της, είναι ένα από τα κύρια είδη που εκτρέφονται σε γλυκό νερό. Ψάρι ενδημικό των αμερικανικών ακτών του Ειρηνικού,

μεταφέρθηκε στην Ευρώπη στα τέλη του 19^{ου} αιώνα και σήμερα εκτρέφεται σχεδόν σε όλες τις ευρωπαϊκές χώρες (<http://ec.europa.eu/fisheries>).



Εικόνα 2.2- Ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*)

Η ιριδίζουσα πέστροφα είναι ανθεκτικό ψάρι. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλόντων και τρόπων διαχείρισης. Δύναται να καταλαμβάνει πολλά διαφορετικά ενδιαίτηματα, μετακινούμενη από το γλυκό νερό στο αλμυρό και ξανά πίσω ή μένοντας μόνιμα σε λίμνες. Η βέλτιστη θερμοκρασία νερού για την εκτροφή της είναι θερμοκρασία κατώτερη των 21°C. Η ανάπτυξη και η ωρίμανσή της επηρεάζονται από τη θερμοκρασία του νερού και την τροφή. Υπό κανονικές συνθήκες, η πέστροφα συνήθως ωριμάζει σε 3-4 έτη. Είναι σαρκοφάγο και χρειάζεται διατροφή πλούσια σε πρωτεΐνες (<http://ec.europa.eu/fisheries>).

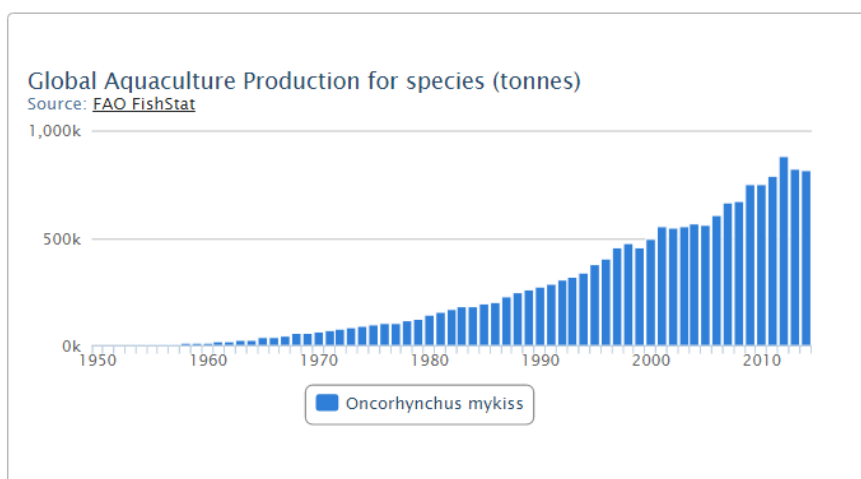


Εικόνα 2.3-Κύκλος παραγωγής πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Πηγή: www.fao.org)

Η παραγωγή της ιριδίζουσας πέστροφας έχει αυξηθεί εκθετικά από τη δεκαετία του 1950, ειδικά στην Ευρώπη και πιο πρόσφατα στη Χιλή. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στην αύξηση των ιχθυοκαλλιεργειών σε εσωτερικά νερά (ποτάμια και λίμνες) σε χώρες όπως η Γαλλία, η Ιταλία, η Δανία, η Γερμανία και η Ισπανία για την προμήθεια των τοπικών αγορών και στις θαλασσοκαλλιέργειες σε χώρες όπως η Νορβηγία και η Χιλή για εξαγωγές. Η Χιλή είναι μέχρι πρότινος ο μεγαλύτερος παραγωγός. Ακολουθούν η Νορβηγία, η Γαλλία, η Ιταλία, η Ισπανία, η Δανία, οι ΗΠΑ, η Γερμανία, το Ιράν και το Ηνωμένο Βασίλειο (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en).



Εικόνα 2.4-Κυριότερες χώρες παραγωγής πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (FAO Fishery Statistics, 2006)



Εικόνα 2.5- Παγκόσμια παραγωγή ιριδίζουσας πέστροφας από υδατοκαλλιέργεια(σε τόνους) (Πηγή: www.fao.org)

Η ιριδίζουσα πέστροφα είναι διαθέσιμη στις ευρωπαϊκές αγορές κατά τη διάρκεια του έτους. Τα αλιεύματα βάρους έως 400 g είναι διαθέσιμα με λευκή ή ροζ σάρκα, ολόκληρα ή σε φιλέτο, νωπά ή καπνιστά. Εάν εκτρέφονται για μεγαλύτερο διάστημα και φτάνουν σε βάρος το 1,5 kg, οι ιριδίζουσες πέστροφες πωλούνται, όπως και ο σολομός, νωπές (φιλεταρισμένες ή ως ψαροκροκέτες) ή καπνιστές (σε φέτες). Στη δεύτερη περίπτωση, τα ψάρια υποβάλλονται σε ψυχρή ή θερμή κάπνιση, ιδίως στην περίπτωση της πέστροφας του γλυκού νερού σε μέγεθος

μερίδας. Τα αλατισμένα αυγά πέστροφας καταναλώνονται επίσης, ιδίως στη Βόρεια Ευρώπη (<http://ec.europa.eu/fisheries>).



Εικόνα 2.6-Παραγωγή ιριδίσουσας πέστροφας από υδατοκαλλιέργεια στην ΕΕ (Eurostat, 2009)

2.9 Διαχείριση και έλεγχος της ψυκτικής αλυσίδας ιχθύων

Η σύγχρονη προσέγγιση της διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας των ιχθυερών αλλά και των τροφίμων γενικότερα στηρίζεται στην πρόληψη και όχι στη λογική του ελέγχου και αποδοχής του τελικού προϊόντος, με βάση χρονοβόρες και υψηλούς κόστους δοκιμές. Παραγωγοί και ελέγχουσες αρχές βασίζονται στην ανάπτυξη και εφαρμογή συστημάτων διαχείρισης με τον καθορισμό, καταγραφή και έλεγχο των κρισίμων παραμέτρων των τροφίμων σε όλο το κύκλο ζωής τους από την παραγωγή ως τη τελική χρήση τους. Η ορθή εφαρμογή τέτοιων συστημάτων (π.χ. πρότυπο ISO 9001:2000, σύστημα HACCP) 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 όπως η συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) προσφέρουν νέες δυνατότητες βελτίωσης και επιμήκυνσης της διάρκειας ζωής.

Η ψυκτική αλυσίδα περιλαμβάνει τα διάφορα στάδια μεταφοράς και αποθήκευσης των προϊόντων σε ενδιάμεσα σημεία διανομής, στις αποθήκες, στα ψυγεία πώλησης των σουπερ μάρκετ και τέλος, στα ψυγεία των καταναλωτών (Ταούκης και συν., 2012).



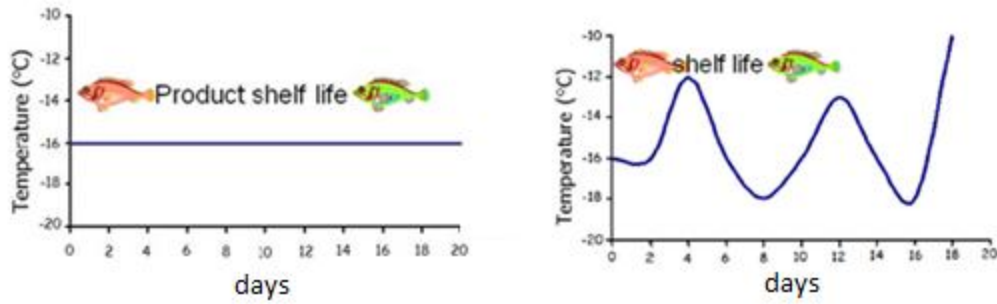
Εικόνα 2.8-Ψυκτική αλυσίδα τροφίμων

Η ποιότητα και η ασφάλεια των ψυγμένων ιχθύων εξαρτάται από τη διατήρησή τους σε αρκούντως χαμηλή θερμοκρασία προκειμένου να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και να ελαχιστοποιηθεί η ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Επιπροσθέτως, η ψύξη συντελεί στην ελαχιστοποίηση της μεταφοράς υγρασίας και στη διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (άρωμα, χρώμα, υφή) (Evans, 2011). Συνεπώς, η σωστή διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας είναι αναγκαία για τη διασφάλιση της ασφάλειας, της οργανοληπτικής ποιότητας, του διατροφικού περιεχομένου, της αυξημένης διατηρησιμότητας και της εμπορικής αξίας των ιχθύων.

Ωστόσο, παρά τη βελτιωμένη πολιτική διασφάλισης της ποιότητας, είναι γενικά αποδεκτό από την Ευρωπαϊκή βιομηχανία, το λιανεμπόριο, τις ελεγκτικές αρχές αλλά και από τους καταναλωτές ότι η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων χαρακτηρίζεται από μεγάλες απώλειες ποιότητας (Ταουκίς, 2013).

Η κύρια αιτία ποιοτικής αλλοίωσης ευαλλοιώτων τροφίμων, όπως οι ιχθείς, στη ψυκτική αλυσίδα είναι οι σημαντικές αποκλίσεις από τις προδιαγραφές θερμοκρασίας, όπως έχει επιβεβαιωθεί και από θερμοκρασιακά δεδομένα πρόσφατης ερευνητικής μελέτης (Source: European Cold Chain Database-FRISBEE project, <http://www.frisbeeproject.eu/coldchaindb.html>). Ενδεικτικά, επισημαίνεται ότι το Διεθνές Ινστιτούτο Ψύξης (International Institute of Refrigeration, IIR) αναφέρει πως 300 εκατομμύρια τόνοι προϊόντων απορρίπτονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, εξαιτίας της ανεπαρκούς ψύξης. Το πρόβλημα δεν εντοπίζεται μόνο στις αναπτυσσόμενες χώρες, αφού στις Η.Π.Α. οι απώλειες των αλλοιωμένων προϊόντων για τη βιομηχανία τροφίμων ανέρχονται ετησίως σε 35 δισεκατομμύρια δολάρια, ενώ κάθε οικογένεια απορρίπτει κατά προσέγγιση τραυματισμένα φρούτα, αλλοιωμένο κρέας και άλλα ευπαθή τρόφιμα αξίας 380 δολαρίων, κατά μέσο όρο (IIR, 2008).

Είναι, λοιπόν, φανερό ότι για τα προϊόντα που πρέπει να διακινηθούν και να συντηρηθούν υπό ψύξη ή κατάψυξη όπως είναι τα προϊόντα ψαριών, η θερμοκρασία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό υποβάθμισης της ποιότητά τους και αποτελεί έτσι την σημαντικότερη κρίσιμη παράμετρο. Ωστόσο, η αλληλουχία των θερμοκρασιακών συνθηκών, στις οποίες εκτίθενται τα προϊόντα από τη στιγμή που εγκαταλείψουν τη μονάδα παραγωγής, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί.



Εικόνα 2.9- Επίδραση θερμοκρασιακών διακυμάνσεων(κατά τη διακίνηση, συντήρηση και οικιακή αποθήκευση) στην ποιότητα και τη διατηρησιμότητα ιχθύων

Πρακτική λύση για τη συνεχή καταγραφή και έλεγχο των θερμοκρασιακών συνθηκών διακίνησης, θα αποτελούσε η **έξυπνη συσκευασία** (intelligent or smart packaging) που παρέχει πληροφορίες για το θερμοκρασιακό προφίλ στο οποίο εκτίθεται ένα προϊόν στα διάφορα στάδια από την παραγωγή μέχρι την τελική του κατανάλωση. Η έξυπνη συσκευασία φέρει ενσωματωμένους δείκτες ποιότητας, οι οποίοι μπορεί να είναι είτε άμεσοι, όπως οι δείκτες φρεσκότητας (freshness indicators), είτε έμμεσοι, όπως οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες (time temperature indicators).

Κεφάλαιο 3

Χρονο-θερμοκρασιακοί ολοκληρωτές (TTI)

3.1 Εισαγωγή

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες (TTI) αποτελούν μία απλή "έξυπνη" αυτοκόλλητη ετικέτα πάνω στη συσκευασία του τροφίμου, η οποία λειτουργεί επικουρικά της αναγραφόμενης ημερομηνίας λήξης. Δρουν ως μία "ζωντανή" ημερομηνία λήξης, η οποία επηρεάζεται από τις πραγματικές συνθήκες διακίνησης του προϊόντος, με αποτέλεσμα η απόκριση του δείκτη να αποτελεί μία ένδειξη της συνολικής μεταχείρισης του τροφίμου.

Ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας με βάση τα TTI θα οδηγούσε στον αποτελεσματικότερο έλεγχο της ποιότητας και στην αξιόπιστη εκτίμηση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής των προϊόντων στα διαφορετικά στάδια της ψυκτικής αλυσίδας, στη βελτιστοποίηση διαχείρισης των αποθεμάτων καθώς και στη μείωση των σπαταλών (Tsironi et al., 2015). Φυσικό επακόλουθο θα ήταν η αύξηση των κερδών μιας εταιρείας ή βιομηχανίας και της εμπιστοσύνης των καταναλωτών.

Προϋπόθεση για την εφαρμογή των TTI είναι η συστηματική κινητική μελέτη εξάρτησης της διάρκειας ζωής του τροφίμου και του χρόνου απόκρισης του TTI από τη θερμοκρασία. Χρησιμοποιώντας αξιόπιστα μοντέλα του χρόνου ζωής και της κινητικής τόσο του τροφίμου όσο και της απόκρισης του TTI, η επίδραση της θερμοκρασίας μπορεί να παρακολουθηθεί, να ποσοτικοποιηθεί και να μεταφραστεί σε ποιότητα τροφίμου, από το σημείο παραγωγής μέχρι το σημείο τελικής κατανάλωσης (Giannoglou et al., 2014).

Ένα καινοτόμο σύστημα διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας, το οποίο βασίζεται στις πληροφορίες από την απόκριση των TTI τοποθετημένων σε προκαθορισμένα σημεία της ψυκτικής αλυσίδας, είναι το SMAS. Το SMAS αναπτύχθηκε από τους Koutsoumanis, Taoukis και Nychas (2005) και είναι εναλλακτικό της συμβατικής μεθόδου διανομής των ψυγμένων/κατεψυγμένων τροφίμων FIFO (First In First Out).

3.2 Ορισμός και αρχή λειτουργίας των TTI

3.2.1 Ορισμός TTI

Ως **χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης ή ολοκληρωτής TTI (Time – Temperature Indicator or Integrator)** ορίζεται μια απλή, χαμηλού κόστους συσκευή, η οποία μπορεί να δείξει εύκολα μια μετρήσιμη μεταβολή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία και η οποία αντικατοπτρίζει το πλήρες ή μερικό θερμοκρασιακό προφίλ του τροφίμου, στο οποίο είναι προσαρμοσμένη (Taoukis and Labuza, 1989a, 1989b).

3.2.2 Αρχή λειτουργίας των ΤΤΙ

Η αρχή λειτουργίας των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών βασίζεται σε μια μηχανική, χημική, φωτοχημική, ενζυμική ή μικροβιολογική, μη αντιστρεπτή μεταβολή, η οποία εκδηλώνεται σαν μια εύκολα μετρήσιμη οπτική απόκριση των ΤΤΙ. Η ορατή απόκριση μπορεί να είναι μία αλλαγή χρώματος, κάποια παρατηρούμενη μηχανική παραμόρφωση ή η μετακίνηση κάποιας χρωματικής ένδειξης.

Ο κυριότερος εξωγενής παράγοντας που επιδρά στο ρυθμό της αναντίστρεπτης μεταβολής είναι η θερμοκρασία. Πιο αναλυτικά, ο ρυθμός της μη αντιστρεπτής μεταβολής αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Έτσι, η απόκριση εκφράζει αθροιστικά τις θερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης που έχει υποστεί ο δείκτης και μπορεί να συσχετιστεί με την ποιοτική κατάσταση και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου που συνοδεύει.

3.3 Κατηγοριοποίηση των ΤΤΙ

Η έκταση στην οποία η παρατηρούμενη απόκριση του δείκτη αντιστοιχεί σε ένα πραγματικό χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό εξαρτάται από τον τύπο του δείκτη και τις φυσικοχημικές αρχές λειτουργίας του. Συνεπώς, οι δείκτες μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τις πληροφορίες που καταγράφουν και παρέχουν ή την αρχή λειτουργίας τους (Koutsoumanis, 2015).

Διαφορετικές κατηγοριοποιήσεις και ορολογίες έχουν προταθεί κατά καιρούς, αντικατοπτρίζοντας εν μέρει την εξέλιξη των δεικτών (Byrne, 1976; Koutsoumanis and Taoukis, 2005; Schoen and Byrne, 1972; Singh and Wells, 1985; Taoukis, 2001; Taoukis, Fu and Labuza, 1991).

Από όλες τις ταξινομήσεις που έχουν γίνει, ευρύτερα αποδεκτή είναι αυτή που προτάθηκε από τους Taoukis and Labuza (1991), οι οποίοι ταξινόμησαν τους δείκτες στις τρεις ακόλουθες κατηγορίες:

1. **Δείκτες Κρίσιμης Θερμοκρασίας (Critical Temperature Indicators, CTI):** Οι συγκεκριμένοι δείκτες καταγράφουν την έκθεση πάνω ή κάτω από μία θερμοκρασία αναφοράς.
2. **Ολοκληρωτές Κρίσιμης Θερμοκρασίας/Χρόνου (Critical Temperature/Time Integrators, CTTI):** Οι δείκτες αυτοί συνοδεύονται από κάποια απόκριση που αντικατοπτρίζει τη συνολική χρόνο-θερμοκρασιακή έκθεση του προϊόντος πάνω από μία κρίσιμη θερμοκρασία αναφοράς. Η απόκρισή τους μπορεί επίσης να μεταφραστεί σε ισοδύναμο χρόνο έκθεσης αποκλειστικά στην κρίσιμη θερμοκρασία.
3. **Χρόνο-θερμοκρασιακοί Ολοκληρωτές ή Δείκτες (ΤΤΙ):** Οι δείκτες ΤΤΙ δίνουν μία συνεχή, θερμοκρασιακά εξαρτώμενη απόκριση καθ' όλη τη διάρκεια του ιστορικού του προϊόντος. Ολοκληρώνουν σε μια μόνο μέτρηση το συνολικό χρόνο-θερμοκρασιακό ιστορικό και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της μέσης θερμοκρασίας που επικρατεί κατά τη διακίνηση. Είναι πιθανό να

συσχετιστούν με συνεχείς θερμοκρασιακά εξαρτώμενες αντιδράσεις απώλειας της ποιότητας των τροφίμων.

Λαμβάνοντας ως κριτήριο για την ταξινόμησή τους την αρχή στην οποία στηρίζεται η λειτουργία τους, οι ΤΤΙ μπορούν να διακριθούν σε: (i) Μηχανικούς δείκτες, (ii) Χημικούς δείκτες, (iii) Πολυμερικούς δείκτες, (iv) Ηλεκτροχημικούς δείκτες, (v) Φωτοχημικούς δείκτες, (vi) **Ενζυμικούς δείκτες**, (vii) **Μικροβιακούς δείκτες**, (viii) Δείκτες διάχυσης.

3.4 Χαρακτηριστικά ενός ιδανικού ΤΤΙ

Οι απαιτήσεις για ένα αποτελεσματικό ΤΤΙ είναι να δείχνει μία μη αντιστρεπτή αλλαγή, ο ρυθμός της οποίας αυξάνεται με τη θερμοκρασία (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς and Labuza, 2003). Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από επιπλέον επιθυμητά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας επιτυχημένος δείκτης. Αναλυτικότερα, ένας ιδανικός ΤΤΙ πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς and Labuza, 2003):

1. Να εμφανίζει μια συνεχή, χρονο-θερμοκρασιακά εξαρτώμενη αλλαγή.
2. Η αλλαγή να εκφράζεται ως μία απόκριση εύκολα μετρήσιμη και μη αντιστρεπτή.
3. Η αλλαγή αυτή να μιμείται ή να μπορεί να συσχετιστεί με το βαθμό ποιοτικής αλλοίωσης του τροφίμου και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του.
4. Να είναι αξιόπιστος και να δίνει σταθερές αποκρίσεις όταν εκτίθεται στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες.
5. Να έχει χαμηλό κόστος.
6. Να είναι ευέλικτος, έτσι ώστε οι 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.
7. Να είναι μικρός, εύκολα προσαρμόσιμος ως τμήμα της συσκευασίας του τροφίμου και συμβατός με μια διεργασία συσκευασίας υψηλής ταχύτητας.
8. Να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής πριν την ενεργοποίηση και να ενεργοποιείται εύκολα.
9. Να μην επηρεάζεται από τις υπόλοιπες περιβαλλοντικές συνθήκες πέραν της θερμοκρασίας, όπως το φως, ρυπαντές του αέρα και σχετική υγρασία (RH).
10. Να είναι ανθεκτικός σε φυσιολογικές μηχανικές καταπονήσεις χωρίς να επηρεάζεται η απόκρισή του.
11. Να είναι μη τοξικός και στην απίθανη περίπτωση επαφής του με το τρόφιμο να μην περικλείει κινδύνους.
12. Να είναι σε θέση να μεταφέρει με απλό και ξεκάθαρο τρόπο το μήνυμα στον καταναλωτή ή σε οποιοδήποτε άλλον ενδιαφερόμενο.
13. Η απόκρισή του να είναι οπτικά κατανοητή και να 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, με τη συνεχή εξέλιξη και την ανάπτυξη νέων τύπων δεικτών, το μοντέλο του ιδανικού ΤΤΙ μπορεί να προσεγγιστεί αρκετά ικανοποιητικά.

3.5 Εμπορικά διαθέσιμα και πρότυπα συστήματα ΤΤΙ

Τα τελευταία είκοσι χρόνια ποικίλα συστήματα ΤΤΙ, βασιζόμενα σε διαφορετικές αρχές λειτουργίας, έχουν αναπτυχθεί τόσο για εμπορικές εφαρμογές όσο και για εργαστηριακές δοκιμές .


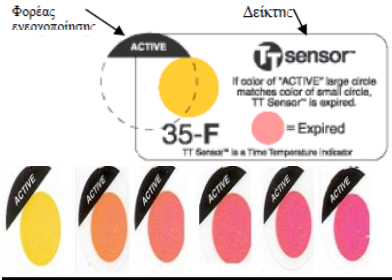
Οι επί του παρόντος εμπορικά διαθέσιμοι δείκτες ΤΤΙ περιλαμβάνουν έναν αριθμό από:

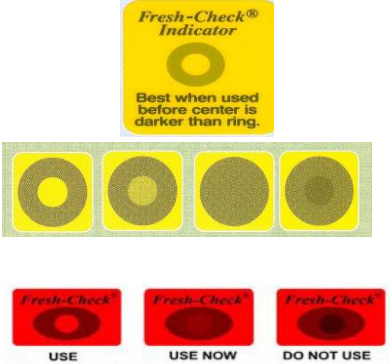

- συστήματα βασιζόμενα στις αρχές διάχυσης (δείκτης 3 M Monitor Mark[®] από την εταιρεία 3 M Co., St Paul, MN, USA και δείκτης TT Sensor[™] από την εταιρεία Avery Dennison Corp., Strongsville, OH, USA)
- πολυμερικά συστήματα (δείκτες Fresh-Check[®] και Freshness Monitor[®] από την εταιρεία Temptime Corp., Morris Plains, NJ, USA (πρώην Lifelines))
- χημικά συστήματα (δείκτης CoolVu[™] από την εταιρεία Freshpoint, La Chaux de Fonds, Switzerland και δείκτης Keep-it[®] από την εταιρεία Keep-it Technologies AS, Oslo, Norway)
- φωτοευαίσθητα χημικά συστήματα (δείκτης OnVu[™] από τις εταιρείες Ciba Specialty Chemicals και Freshpoint, Switzerland)
- ενζυμικά συστήματα (δείκτες Check-Point[®] και Shellstock[®] από την εταιρεία VITSAB Co., Malmö, Sweden)
- μικροβιακά συστήματα (δείκτες eO[®], TRACEO[®], TRACEO RESTAURATION[®] και Torcrgo[®] από την εταιρεία CRYOLOG S.A., Gentilly, France)
- συστήματα με barcodes (δείκτες FreshCode[™] από την εταιρεία Varcodes, Ltd., Israel και Temprix[®] από την εταιρεία Temprix AB, Sweden)

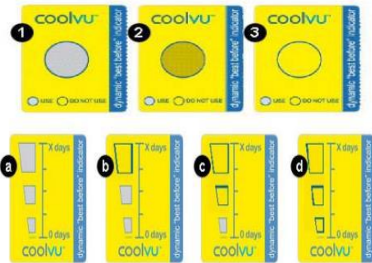

Όλοι οι παραπάνω τύποι ΤΤΙ ισχυρίζονται ότι ικανοποιούν τις απαιτήσεις ενός “αποτελεσματικού” ΤΤΙ και έχουν εξελιχθεί στους κυριότερους εμπορικούς δείκτες στην αγορά (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς and Labuza, 2003).




Στον παρακάτω πίνακα δίνονται βασικές πληροφορίες για τα επικρατέστερα εμπορικά διαθέσιμα ΤΤΙs.

Πίνακας 3.1-Οι πιο συνηθισμένοι εμπορικοί τύποι TTI και βασικές πληροφορίες για τον καθένα


Τύπος TTI	Παραδείγματα TTI	Αρχή λειτουργίας	Απόκριση
Μοριακής διάχυσης 3M Monitor Mark®		<p>Διάχυση μίας μπλε χημικής ουσίας με συγκεκριμένο σημείο τήξης σε μία πορώδη μήτρα.</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Αφαίρεση της λωρίδας ενεργοποίησης που διαχωρίζει τον περιέκτη της μπλε ουσίας από τη πορώδη μήτρα</p>	Σταδιακή μετακίνηση της μπλε χημικής ουσίας κατά μήκος της πορώδους μήτρας
TT Sensor™		<p>Διάχυση πολικής πολυμερικής ένωσης μεταξύ δύο πολυμερικών στοιβάδων, με αποτέλεσμα μεταβολή της συγκέντρωσής της</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Έναρξη της αντίδρασης με την προσκόλληση ετικετών, που διατίθενται από την εταιρεία, πάνω στον κίτρινο κύκλο</p>	Χρωματική μεταβολή φθορίζοντα δείκτη pH από κίτρινο σε έντονο φούξια
Πολυμερισμού			

Fresh-Check®	 <p>The image shows the packaging for the Fresh-Check Indicator, which is a yellow square with a circular window. Below the packaging are four circular indicators showing a color change from yellow to brown. At the bottom, three red rectangular indicators are shown with the text 'USE', 'USE NOW', and 'DO NOT USE' respectively, corresponding to different stages of the color change.</p>	<p>Δισ-υποκατεστημένοι κρυστάλλοι διακετυλενίου πολυμερίζονται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολυμερούς σκούρου χρώματος.</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Τη στιγμή της παραγωγής και στη συνέχεια αποθήκευση σε βαθιά κατάψυξη, όπου οι αλλαγές συμβαίνουν με πολύ αργό ρυθμό.</p>	<p>Σύγκριση του χρώματος του ενεργού κέντρου με το χρώμα αναφοράς ενός περιβάλλοντος δακτυλίου. Τα συνενωμένα φύλλα φέρουν κίτρινο ή κόκκινο χρώμα με αποτέλεσμα η μεταβολή της απόκρισης του δείκτη να εμφανίζεται ως μεταβολή από το διαφανές στο μαύρο</p>
Freshness Monitor®	 <p>The image shows two packages of the Freshness Monitor, each featuring a barcode and a red indicator window.</p>		<p>Μεταβολή του χρώματος από διαφανές σε μαύρο</p>
Χημικοί-Φυσικοί			

CoolVu™		<p>Διάλυση(χάραξη) του λεπτού στρώματος αλουμινίου της επιφάνειας του δείκτη από μια διαφανής μεμβράνη που φέρει το χαρακτηριστικό στο συγκολλητικό της τμήμα</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Τοποθέτηση της συγκολλητικής ετικέτας στην επιφάνεια του λεπτού στρώματος αλουμινίου.</p>	<p>Μεταβολή του χρώματος του ενεργού κέντρου από μεταλλικό καθρέφτη σε μαύρο και προς το τέλος ζωής του δείκτη σταδιακή αποκάλυψη του χρώματος του φόντου(έντονο κίτρινο)</p> <p>Διαίρεση του δραστικού σημείου σε τρεις τομείς και μεταβολή χρώματος</p>
Keep-it®		<p>Χημική αντίδραση ενός ακινητοποιημένου αντιδραστηρίου(π.χ Fe^{3+}) και ενός κινητού αντιδραστηρίου(π.χ σιδηροκιανιούχο)</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Ρήξη του φράγματος μεταξύ των δύο αντιδραστηρίων και ανάμιξη των δύο</p>	<p>Μετακίνηση χρωματικής ένδειξης</p>
Φωτοχημικοί			

<p>OnVu™</p>		<p>Αντίδραση μεταφοράς ριζών φωτοευαίσθητων ενώσεων που βρίσκονται στον πολυμερικό κρύσταλλο του δείκτη</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Έκθεση του δείκτη σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)</p>	<p>Μεταβολή του χρώματος από σκούρο μπλε σε ανοιχτό γκρι</p>
<p>Ενζυμικοί</p> <p>Check-Point®</p> <p>Shellstock®</p>		<p>Μείωση του pH ως αποτέλεσμα ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Ρήξη του φράγματος μεταξύ ενζύμου – υποστρώματος και ανάμιξη των δύο</p>	<p>Μεταβολή του χρώματος από πράσινο σε κίτρινο ή κόκκινο</p>
<p>Μικροβιακοί</p> <p>eO®</p>		<p>Μείωση του pH ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας γαλακτικών βακτηρίων</p>	<p>Μεταβολή του χρώματος "λουλουδιού" από πράσινο σε ερυθρό.</p>

TRACEO®		<p><u>Ενεργοποίηση:</u> Τη στιγμή της παραγωγής και στη συνέχεια αποθήκευση σε ψύξη ή κατάψυξη, όπου η μικροβιακή ανάπτυξη συμβαίνει με πολύ αργό ρυθμό</p>	<p>Αποχρωματισμός γραμμωτού κώδικα.</p>
Topcryo®			<p>Μεταβολή του χρώματος από πράσινο σε ερυθρό</p>
Με barcode			
FreshCode™		<p>Πατενταρισμένη φόρμουλα, βασισμένη σε κάποια χημική διεργασία, η οποία προκαλεί μία ορατή μεταβολή στο barcode</p> <p><u>Ενεργοποίηση:</u> Τράβηγμα της πράσινης διαχωριστικής ετικέτας.</p>	<p>Αλλαγή του barcode</p>

<p>Tempix®</p>		<p>Ο δείκτης αποτελείται από μία απορροφητική ετικέτα(θερμικό χαρτί) και μία ετικέτα που περιέχει τον ενεργοποιητή.</p>	<p>Αποχρωματισμός της γραμμής ελέγχου στο λευκό παράθυρο του δείκτη και ταυτόχρονη μεταβολή του barcode, σε περίπτωση θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης</p>
----------------	--	---	---

Από όλους τους παραπάνω τύπους χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών, οι **ενζυμικοί** και οι **μικροβιακοί** θα αναλυθούν λεπτομερέστερα, καθώς οι συγκεκριμένοι δείκτες μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

3.5.1 Ενζυμικοί δείκτες

3.5.1.1 Αρχή λειτουργίας ενζυμικών δεικτών

Η αρχή λειτουργίας του ενζυμικού δείκτη βασίζεται στην πτώση του pH, που είναι αποτέλεσμα της ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός υποστρώματος λιπιδίου (US patents 4,043,871 και 4,284,719). Παράδειγμα ενζυμικού δείκτη είναι ο δείκτης Check-Point® της εταιρείας Vitsab και είναι διάδοχος του I-Point Time Temperature Monitor (Vitsab A.B., Malmö, Sweden).

Πριν λάβει χώρα η ενεργοποίηση του δείκτη, το ένζυμο και το λιπαρό υπόστρωμα βρίσκονται σε δύο ξεχωριστούς μικροθαλάμους. Ο ένας μικροθάλαμος περιέχει υδατικό διάλυμα ενός λιπολυτικού ενζύμου, όπως είναι η παγκρεατική λιπάση, ενώ ο άλλος περιέχει υπόστρωμα λιπιδίου προσροφημένο σε κονιοποιημένο φορέα από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC). Το υπόστρωμα βρίσκεται σε διασπορά σε μίγμα κάποιας υδατικής και γλυκερολικής φάσης, ενώ στο ίδιο αιώρημα υπάρχει και ένας δείκτης pH (Ταουκίς, 2001).

Η ενεργοποίηση του δείκτη πραγματοποιείται σπάζοντας το φράγμα που χωρίζει τους δύο θαλάμους με επιβολή μηχανικής πίεσης. Με τη ρήξη του φράγματος προκύπτει ανάμειξη του ενζύμου με το υπόστρωμα και έτσι ξεκινά η αντίδραση της υδρόλυσης (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1- Απεικόνιση χρωμάτων ενζυμικού ΤΤΙ πριν την ενεργοποίηση, μετά και στη λήξη του

Η υδρόλυση του υποστρώματος οδηγεί σε απελευθέρωση οργανικού οξέος και συνεπώς πτώση του pH, η οποία γίνεται άμεσα αντιληπτή με χρωματική αλλαγή του δείκτη pH από σκούρο πράσινο σε φωτεινό κίτρινο ή κόκκινο. Προκειμένου οι αλλαγές να γίνονται εύκολα αντιληπτές από το χρήστη και να ερμηνεύεται άμεσα το χρώμα, ο δείκτης κατασκευάζεται ώστε τα χρώματα αναφοράς της εκκίνησης (αμέσως μετά την ενεργοποίηση) και λήξης να είναι τυπωμένα στο περίγραμμα του παραθύρου αντίδρασης, ενώ, παράλληλα η συνεχής χρωματική μεταβολή μπορεί να μετρηθεί και ενόργανα με χρήση κάποιου χρωματόμετρου.

Διαφορετικοί συνδυασμοί ενζύμου-υποστρώματος αλλά και συγκεντρώσεων αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να παραχθούν δείκτες με

διαφορετικούς χρόνους απόκρισης και θερμοκρασιακές εξαρτήσεις. Όσον αφορά στη συντήρηση των δεικτών αυτών πριν την ενεργοποίησή τους, έχουν μακρά διάρκεια ζωής, εφόσον αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες βαθιάς κατάψυξης, όπου η μεταβολή είναι πολύ αργή (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς and Labuza, 2003).

Η εταιρεία (VITSAB A.B., Malmö, Sweden) έχει κατασκευάσει πληθώρα ενζυμικών ΤΤΙ από τη δεκαετία του '80 έως σήμερα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ΤΤΙ της συγκεκριμένης εταιρείας είναι η ευρεία κλίμακα των ενεργειών ενεργοποίησης E_A , η οποία κυμαίνεται από 50-210 kJ/mol (ή 12-50 kcal/mol) . 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 μια διαφορετική ενέργεια ενεργοποίησης.

Οι δείκτες της Vitsab μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τα εξής κριτήρια:

- **Είδος ενζύμου και υποστρώματος.**
- **Συγκέντρωση και αναλογία ενζύμου υποστρώματος.**
- **Διακριτά στάδια χρωματικής αλλαγής.**

Έτσι για καθένα από τα παραπάνω κριτήρια προκύπτουν διαφορετικοί τύποι και ονομασίες δεικτών.

Ταξινόμηση με βάση το είδος του ενζύμου και του υποστρώματος

Αναλόγως του τύπου του υποστρώματος προκύπτουν διαφορετικοί τύποι ΤΤΙ με διαφορετικά χαρακτηριστικά απόκρισης και θερμοκρασιακή ευαισθησία (VITSAB A.B., Malmö, Sweden 2006), όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 - Διαφορετικοί τύποι Vitsab ΤΤΙ με βάση διαφορετικούς συνδυασμούς ενζύμου-υποστρώματος

Τύπος	Ένζυμο	Υπόστρωμα
L	παγκρεατική λιπάση	τριλαουρίνη
P	παγκρεατική λιπάση	τριπαλμιτίνη
B	παγκρεατική λιπάση	τριβουτυρίνη
C	παγκρεατική λιπάση	τρικαπροΐνη
M	παγκρεατική λιπάση	μυριστικός μεθυλεστέρας
LP	παγκρεατική λιπάση	συνδυασμός τριλαουρίνης,τριπαλμιτίνης
LM	παγκρεατική λιπάση	συνδυασμός τριλαουρίνης, μυριστικού μεθυλεστέρα
νέος τύπος LP	Λιπάση μικροβιακής προέλευσης (<i>Rhizopus Oryzae lipase</i>)	συνδυασμός τριλαουρίνης, τριπαλμιτίνης
νέος τύπος M	Λιπάση μικροβιακής προέλευσης (<i>Rhizopus Oryzae lipase</i>)	μυριστικός μεθυλεστέρας

Ταξινόμηση με βάση τη συγκέντρωση και την αναλογία ενζύμου υποστρώματος

Οι αναλογίες ενζύμου – υποστρώματος προσδιορίζουν διαφορετικές διάρκειες ζωής και σε διαφορετικά θερμοκρασιακά εύρη. Μερικά παραδείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3- 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 διακριτά στάδια χρωματικής αλλαγής τα ενζυμικά ΤΤΙ της VITSAB διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- **Δίχρωμοι** (Bicolor) ΤΤΙ: Στα ΤΤΙ αυτά πριν την ενεργοποίηση, το "παράθυρο ελέγχου" του δείκτη είναι λευκό ενώ κατά την ενεργοποίηση φέρει βαθύ πράσινο χρωματισμό, ο οποίος καταλήγει σε κίτρινο στο τέλος της αντίδρασης.



Εικόνα 3.2- Χρωματική κλίμακα του δίχρωμου Vitsab TTI μετά την ενεργοποίηση (πράσινο→κίτρινο)

- **Τρίχρωμοι** (Tricolor) ΤΤΙ: Και σε αυτά τα ΤΤΙ πριν την ενεργοποίηση το ένζυμο και το λιπαρό υπόστρωμα είναι διαχωρισμένα και το χρώμα του "παραθύρου ελέγχου" του δείκτη είναι λευκό, αλλά κατά την ενεργοποίηση φέρει βαθύ πράσινο χρωματισμό, ο οποίος στη μέση της αντίδρασης γίνεται κίτρινος και στο τέλος της αντίδρασης κόκκινος (VITSAB A.B., Malmö, Sweden 2005)

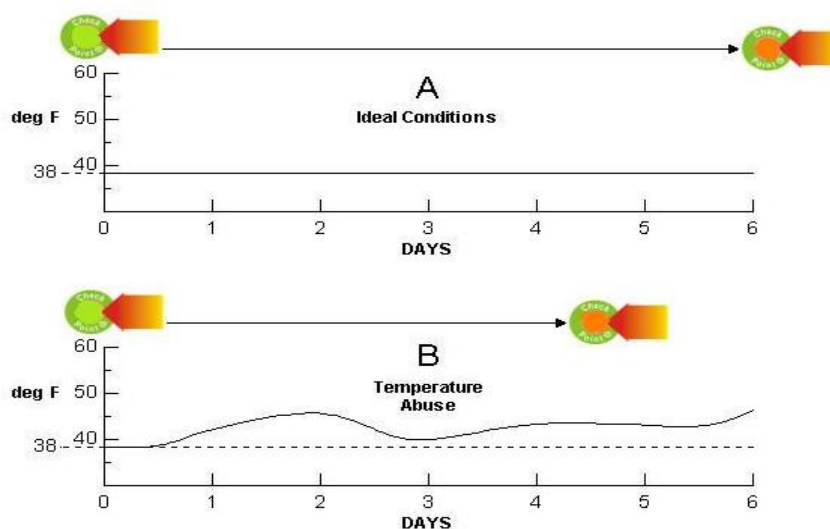


Εικόνα 3.3-Χρωματική κλίμακα τρίχρωμου Vitsab TTI μετά την ενεργοποίηση(πράσινο→ κίτρινο →πορτοκαλί)

Οι τρίχρωμοι ΤΤΙ εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς από αυτούς των δίχρωμων ΤΤΙ. Συγκεκριμένα, παρέχουν τη δυνατότητα ένδειξης της ενδιάμεσης κατάστασης του τροφίμου (κίτρινος χρωματισμός του δείκτη) και όχι μόνο των ακραίων καταστάσεων του φρέσκου (πράσινος χρωματισμός του δείκτη) και μη φρέσκου (πορτοκαλί χρωματισμός του δείκτη).

Αντίθετα τα δίχρωμα ΤΤΙ παρέχουν ενδείξεις για τις ακραίες καταστάσεις του φρέσκου (πράσινος χρωματισμός) και του μη φρέσκου (κίτρινος χρωματισμός) και επομένως βρίσκουν εφαρμογή σε περιπτώσεις όπου είναι αναγκαία μόνο η γνώση του αποδεκτού και του μη αποδεκτού και όχι του επιπέδου φρεσκότητας. Επίσης, οι δύο τύποι δεικτών απευθύνονται σε διαφορετικές ομάδες ατόμων.

Στο καταναλωτικό κοινό περισσότερο κατανοητοί είναι οι τρίχρωμοι δείκτες, αφού είναι ευκολότερη η παρακολούθηση των σταδίων χρωματικής μεταβολής, ενώ οι δίχρωμοι δείκτες είναι λιγότερο κατανοητοί εκτός και εάν συνοδεύονται από χρωματική κλίμακα. Παρόλα αυτά οι δίχρωμοι ΤΤΙ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως από τη βιομηχανία, αλλά και από άλλους εμπλεκόμενους φορείς στην αλυσίδα τροφίμων.



Εικόνα 3.4- Αντιστοίχιση θερμοκρασίας με υποθετικού χρόνου ζωής ενός τρίχρωμου ενζυμικού ΤΤΙ

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η χρωματική κλίμακα και η αντίστοιχη τιμή pH για τα ενζυμικά ΤΤΙ της Vitsab.

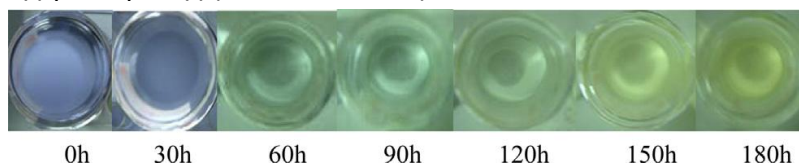
tricolor TTIs								
bicolor TTIs								
pH	8.9	8.5	8.0	7.5	7.0	6.8	6.5	6.0

Εικόνα 3.5- Χρωματική κλίμακα και τα αντίστοιχα pH για τα ΤΤΙ της Vitsab

3.5.1.2 Πρότυπα ενζυμικά συστήματα ΤΤΙ

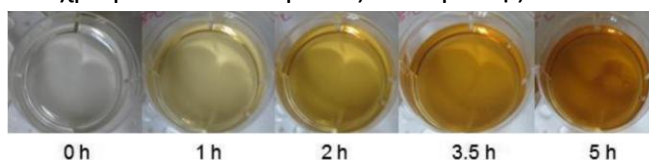
Εκτός από τους χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες της εταιρείας Vitsab που διατίθενται στο εμπόριο, εργαστηριακές δοκιμές διεξάγονται από ερευνητές προκειμένου να αναπτυχθούν και να βελτιστοποιηθούν νέα συστήματα ενζυμικών δεικτών.

Παρόμοια προσέγγιση με τους δείκτες της Vitsab ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη δύο νέων προτύπων. Για την κατασκευή του πρώτου δείκτη χρησιμοποιήθηκε ως ένζυμο μία λιπάση απομονωμένη από το βακτήριο *Burkholderia cepacia* και ως λιπαρό υπόστρωμα τρικαπρυλίνη (Kim et al, 2012a). Στο δεύτερο δείκτη, η ενζυμική υδρόλυση γίνεται μεταξύ μίας λιπάσης από τον μύκητα *Aspergillus niger* και τριβουτυρικής γλυκερόλης (Wu et al., 2015).



Εικόνα 3.6-Χρωματική μεταβολή του συστήματος ΤΤΙ με ένζυμο λιπάση από τον *Aspergillus niger*

Ένα άλλο ενζυμικό ΤΤΙ, η αρχή λειτουργίας του οποίου βασίζεται στην καταλυτική οξείδωση του αρωματικού ελαίου guaiacol από το ένζυμο λακκάση, έχει αναπτυχθεί σε εργαστηριακή κλίμακα (Kim et al, 2012b). Ο συγκεκριμένος δείκτης πλεονεκτεί έναντι αυτών που χρησιμοποιούν λιπάσες, διότι η κινητική απόκρισής του είναι απλούστερη(γραμμική χρονική εξάρτηση της μεταβολής χρώματος και όχι σιγμοειδής) και δεν χρειάζεται η προσθήκη συνθετικών δεικτών pH, καθώς η ίδια η λακκάση μεταβάλλει το χρώμα του διαλύματος αντίδρασης από διαυγές σε καφέ.



Εικόνα 3.7-Χρωματική μεταβολή του συστήματος ΤΤΙ με ένζυμο λακκάση

Εκτός από λιπαρά υποστρώματα, πολυσακχαρίτες έχουν επίσης αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη ενζυμικών ΤΤΙs. Ένα τέτοιο πρωτότυπο σύστημα ΤΤΙ βασίζεται στην ενζυμική υδρόλυση μεταξύ της αμυλάσης και του αμύλου (Yan et al., 2007).

Ακόμη, η καταλυτική υδρόλυση της ουρίας από την ουρεάση έχει εκμεταλλευτεί για την κατασκευή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (Wu et al., 2013). Το συγκεκριμένο σύστημα ΤΤΙ μπορεί να εφαρμοστεί πιθανώς σε τρόφιμα όπου η απώλεια ποιότητας οφείλεται σε φαινόμενα διάχυσης.

3.5.2 Μικροβιακοί δείκτες

Η αρχή λειτουργίας των περισσότερων δεικτών που έχουν περιγραφεί μέχρι στιγμής στηρίζεται σε αντιδράσεις διάχυσης, πολυμερισμού, χημικές ή ενζυμικές μεταβολές,

σε μια προσπάθεια προσομοίωσης μιας εντελώς διαφορετικής διεργασίας, όπως αυτής της μικροβιολογικής αλλοίωσης των τροφίμων. Μεταξύ όλων αυτών των τύπων χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών, τα μικροβιακά ΤΤΙs διαθέτουν το ξεχωριστό πλεονέκτημα ότι η απόκρισή τους (αλλαγή χρώματος) είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών, περιγράφοντας με τον τρόπο αυτό την πραγματική αιτία της μικροβιολογικής αλλοίωσης των τροφίμων. Έτσι, η ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων λόγω μικροβιακής αλλοίωσης δύναται να συσχετισθεί επακριβώς με την απόκριση των μικροβιακών ΤΤΙ, καθιστώντας τους συγκεκριμένους δείκτες περισσότερο ακριβείς και αξιόπιστους.

Οι McMeekin και Ross (1996a) ήταν οι πρώτοι που εστίασαν στη δυναμική ανάπτυξης βιολογικών δεικτών (bioindicators). Στην πρώτη αυτή προσέγγιση ανέφεραν χαρακτηριστικά ότι για την επιλογή ενός τέτοιου βιολογικού δείκτη στις μελέτες εκτίμησης της διάρκειας ζωής των τροφίμων, ο μικροοργανισμός που θα συμμετέχει στο βιολογικό δείκτη πρέπει να παρουσιάζει τα ίδια θερμοκρασιακά χαρακτηριστικά (θερμοκρασιακή ευαισθησία) με τον ειδικό αλλοιογόνο οργανισμό (SSO), και θα μπορούσε να είναι είτε ο ίδιος ο οργανισμός που προκαλεί την αλλοίωση ή κάποιος άλλος σχετικός με το τρόφιμο οργανισμός, στην περίπτωση που υπάρχει ενδεχόμενο επιμόλυνσης του προϊόντος (Βαϊκούση, 2009).

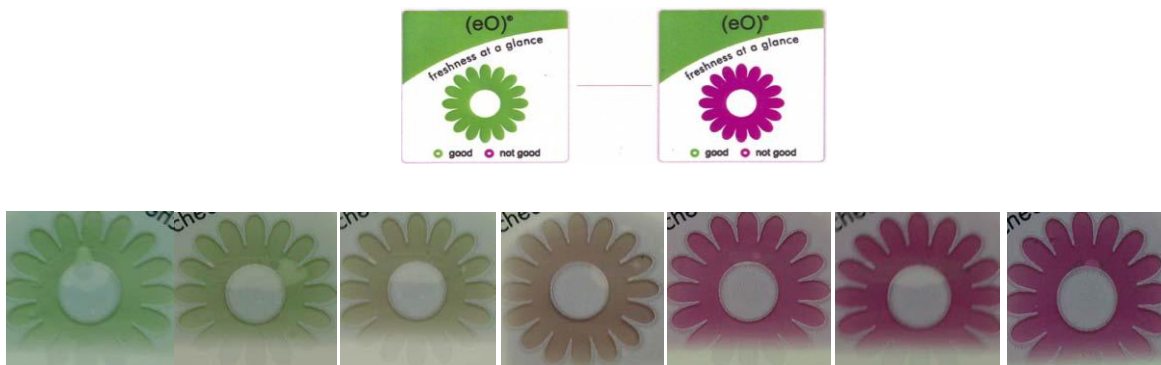
3.5.2.1 Εμπορικά διαθέσιμοι μικροβιακοί δείκτες

Η γαλλική εταιρία Cryolog (Cryolog S.A, Gentilly, France) είναι η πρώτη εταιρεία που έχει αναπτύξει εμπορικούς τύπους βιολογικών δεικτών, όπως οι eO[®], TRACEO[®], TRACEO RESTAURATION[®] και Topcryo[®].

Η αρχή λειτουργίας των συγκεκριμένων δεικτών βασίζεται στη πτώση του pH, ως αποτέλεσμα της θερμοκρασιακά εξαρτώμενης ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας πατενταρισμένων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων. Η οπτική απόκριση του δείκτη εκδηλώνεται σαν μεταβολή χρώματος μέσω του κατάλληλου δείκτη pH, ο οποίος αλλάζει χρώμα καθώς το pH μειώνεται.

Πριν τη χρήση, οι συγκεκριμένοι δείκτες αποθηκεύονται σε συνθήκες κατάψυξης, προκειμένου να αποφευχθεί η μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ η ενεργοποίηση γίνεται απλά αποψύχοντάς τους σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά (Ellouze et al., 2008).

Στο δείκτη eO[®], ο οποίος κυκλοφόρησε το 2006, εικονίζεται ένα “λουλούδι” που είναι πράσινο κατά την ενεργοποίηση ενώ όταν το τρόφιμο φτάσει σε επίπεδο αλλοίωσης που το καθιστά ακατάλληλο για κατανάλωση το λουλούδι γίνεται ερυθρό.



Εικόνα 3.8- Δείκτης eO®

Ο δείκτης TRACEO® αποτελείται από μια ετικέτα προσκολλημένη στο πακέτο του προϊόντος στην οποία βρίσκεται “παγιδευμένο” ένα μίγμα στελεχών γαλακτικών βακτηρίων. Η ετικέτα τοποθετείται πάνω στο γραμμικό κωδικό (barcode) του υπό ψύξη προϊόντος. Αρχικά, ο γραμμωτός κώδικας είναι ευδιάκριτος και ευανάγνωστος αλλά στην πορεία, ανάλογα με το προφίλ θερμοκρασίας – χρόνου στο οποίο υποβάλλεται η συσκευασία, παύει να είναι διαφανής εξαιτίας μικροβιακής αντίδρασης, η οποία καθιστά τον κώδικα μη ορατό.



Εικόνα 3.9- Δείκτης Traceo®

Ο πιο πρόσφατος δείκτης της εταιρείας Cryolog είναι ο Topcryo®. Η απόκριση του Topcryo®, όπως και στον δείκτη eO®, εκφράζεται με μεταβολή χρώματος από πράσινο σε ερυθρό λόγω μικροβιακής μεταβολικής δραστηριότητας.



Εικόνα 3.10- Δείκτης Topcryo®

Οι δείκτες της Cryolog αποτελούν καινοτομία στη συσκευασία τροφίμων χρησιμοποιώντας όλη τη διαθέσιμη τεχνολογία γύρω από την προρρητική μικροβιολογία και την ανάπτυξη των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών, και ουσιαστικά αποτελούν απόδειξη της δυνατότητας εφαρμογής των μικροβιακών χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών στην παρακολούθηση της μικροβιολογικής ποιότητας των υπό ψύξη προϊόντων (Βαϊκούση, 2009).





3.5.2.2 Πρότυπα μικροβιακά συστήματα ΤΤΙ

Ένα μικροβιακό σύστημα ΤΤΙ αποτελείται από έναν μικροοργανισμό, το θρεπτικό υπόστρωμα και το δείκτη pH. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται εν γένει είναι στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) για τους εξής δύο λόγους:

- Ο ρυθμός ανάπτυξης και η ευαισθησία των γαλακτικών βακτηρίων στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις είναι παρόμοια με εκείνη των ειδικών οργανισμών αλλοίωσης(SSO) στα περισσότερα αναλώσιμα τρόφιμα (Kim et al.,2012d; Ellouze et al., 2008). Έχει αποδειχθεί ότι στο σημείο λήξης του ΤΤΙ(σημείο όπου παρατηρείται η χρωματική μεταβολή), ο πληθυσμός των LAB στα μικροβιακά συστήματα ΤΤΙ συμπίπτει με το επίπεδο αλλοίωσης των τροφίμων (Βαϊκούση, 2009).
- Σχεδόν όλα τα στελέχη των LAB είναι προβιοτικά βακτήρια και συνεπώς δεν ελλοχεύουν υγειονομικούς κινδύνους εξαιτίας της φυσιολογικής ύπαρξής τους σε τρόφιμα και στη μικροχλωρίδα του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος. Συνεπώς, τα LAB έχουν ευρέως αναγνωρισθεί ως ασφαλή(GRAS, Generally Regarded as Safe) (Χιαοshuan, 2016).

Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει αξιόλογα πρωτότυπα μικροβιακά ΤΤΙ από τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 3.4- Αξιόλογα πρότυπα μικροβιακά ΤΤΙ από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (Χιαoshuan, 2016)

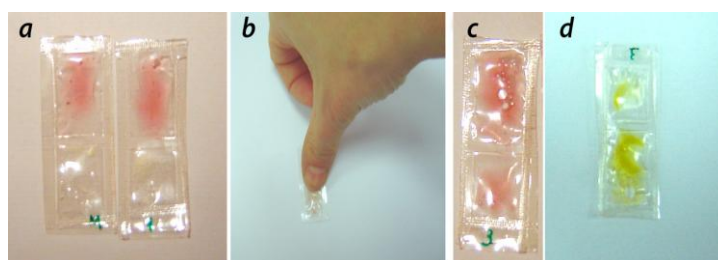
Μικροοργανισμός	Θρεπτικό υπόστρωμα	Δείκτης pH	Μεταβολή χρώματος	Βιβλιογραφία
Στέλεχος <i>L.sakei</i>	Υλικό No.1 ^a	Chlorophenol red	κόκκινο→πορτοκαλί→κίτρινο 	Vaikousi et al., 2008 Vaikousi et al., 2009
Γαλακτικά βακτήρια (LAB)	Υλικό No.2 ^a	Bromocresol green	-	Kim, Jung, Park, & Lee, 2012d
Weissella cibaria CIFP 009	Υλικό No.3 ^a	Bromocresol purple Methyl red sodium salt	μωβ→καφέ→κίτρινο 	Kim, Jung, Park, Chung, & Lee, 2012c Park, Kim, Jung, Kim, & Lee, 2013 Kim, Choi, Kim, Kim, & Lee, 2013
Weissella cibaria CIFP 009 (παγιδευμένοι σε σφαιρίδια)	Υλικό No.4 ^a	Bromocresol purple Bromocresol green Methyl orange	σκούρο βιολετί→καφέ→κόκκινο 	Rahman, Jung, Choi, Ko, & Lee, 2013
Weissella cibaria CIFP 009 (παγιδευμένοι σε σφαιρίδια)	Υλικό No.2 ^a	Bromocresol purple agar	μωβ→καφέ→κίτρινο	Choi, Jung, Kim, & Lee, 2014
Weissella koreensis	Υλικό No.5 ^a	Bromothymol blue sodium salt Methyl red sodium salt	πράσινο→κίτρινο→κόκκινο 	Lim, Choe, Son, & Hong, 2014

^a Απεικονίζονται στον Πίνακα 3.5

Πίνακας 3.5- Σύνθεση θρεπτικών υποστρωμάτων

Θρεπτικό υλικό	Σύνθεση
Υλικό Νο.1	Nutrient broth, εκχύλισμα ζυμών, γλυκόζη, απιονισμένο νερό
Υλικό Νο.2	MRS broth
Υλικό Νο.3	Γλυκόζη, εκχύλισμα ζυμών, τρυπτόνη, KH_2PO_4 , tween 80, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, αγαρόζη, απιονισμένο νερό
Υλικό Νο.4	Modified imitation crab broth medium (MIC): γλυκόζη, πεπτόνη, φωσφορικό δινάτριο, εκχύλισμα ζύμης, δεξτρόζη, χλωριούχο νάτριο, χλωριούχο νάτριο, θειικό μαγνήσιο, θειικό μαγγάνιο, κιτρικό νάτριο
Υλικό Νο.5	MRS broth, εκχύλισμα βοδινού, γλυκόζη, ξυλόζη, γλυκερόλη

Το μικροβιακό ΤΤΙ που ανέπτυξαν οι Vaikousi et al. (2008,2009) στηρίζει την αρχή λειτουργίας του στην ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα ενός στελέχους του βακτηρίου *Lactobacillus sakei* που κατά την ανάπτυξή του στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, παράγει γαλακτικό οξύ και προκαλεί την πτώση του pH του υποστρώματος, η οποία μεταφράζεται σε αλλαγή του χρώματος από κόκκινο σε κίτρινο ενός χημικού δείκτη που επίσης έχει προστεθεί στο σύστημα. Ο δείκτης αξιολογήθηκε για τη δυνατότητα εφαρμογής του στην παρακολούθηση της αλλοίωσης βοδινού κιμά συσκευασμένου υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Vaikousi et al, 2009).



Εικόνα 3.11- Πρωτότυπο μικροβιακό ΤΤΙ των Vaikousi et al. a) πριν την ενεργοποίηση b) κατά την ενεργοποίηση c) αμέσως μετά την ενεργοποίηση και d) στο σημείο λήξης

Σύμφωνα με την παραπάνω ιδέα, αναπτύχθηκαν και άλλα πρωτότυπα μικροβιακά ΤΤΙs αξιοποιώντας διαφορετικά είδη γαλακτικών βακτηρίων και μία πληθώρα δεικτών pH (Kim et al., 2012c, 2012d, 2013; Lim et al., 2014).

Ωστόσο, όλοι οι παραπάνω δείκτες διαθέτουν δύο μειονεκτήματα. Πρώτον, η κινητική πτώσης του pH περιγράφεται από δύο αντιδράσεις, τη μικροβιακή ανάπτυξη και την παραγωγή γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα έναν περίπλοκο μηχανισμό αντίδρασης. Δεύτερον, η απόκρισή τους μετά την ενεργοποίηση δεν είναι άμεση λόγω της ύπαρξης λανθάνουσας φάσης των μικροοργανισμών. Τα μειονεκτήματα αυτά κατάφεραν να εξαλειφθούν σε μεγάλο βαθμό με την μικροενθυλάκωση των γαλακτικών βακτηρίων σε μικροσφαιρίδια (microbeads) (Rahman et al., 2013; Choi et al., 2014). Έτσι, βελτιώθηκε η ευστάθεια των μικροβιακών συστημάτων ΤΤΙ στις μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH.

Ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία των Vaikousi et al. (2009), ένα ανάλογο μικροβιακό ΤΤΙ αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η κινητική απόκρισής του σε ισόθερμες και κάτω από δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα μαθηματικά μοντέλα.

3.6 Κινητική απόκρισης των ΤΤΙ

Στόχος της κινητικής μοντελοποίησης της απόκρισης ενός ΤΤΙ, είναι η ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου, το οποίο αφενός θα περιγράφει αποτελεσματικά τη συμπεριφορά του δείκτη, και αφετέρου θα μπορεί να συσχετιστεί εύκολα με το αντίστοιχο κινητικό μοντέλο για την ποιοτική αλλοίωση των τροφίμων.

Η μετρήσιμη απόκριση ενός δείκτη ΤΤΙ είναι αποτέλεσμα μιας φυσικοχημικής ή βιολογικής μεταβολής, η οποία εξαρτάται από τις χρονο-θερμοκρασιακές συνθήκες (Ταουκίς, 2001).

Αν X η μετρήσιμη απόκριση του ΤΤΙ, τότε η μεταβολή της απόκρισης αυτής στην πορεία του χρόνου μπορεί να οριστεί από μια συνάρτηση απόκρισης $F(X)$ ως εξής:

$$F(X) = k_1 * t \quad (3.1)$$

όπου k_1 είναι η σταθερά του ρυθμού απόκρισης του ΤΤΙ σε θερμοκρασία T

Αν η θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού μεταβολής της απόκρισης, k_1 , ακολουθεί την κινητική Arrhenius, η συνάρτηση της απόκρισης παίρνει την ακόλουθη μορφή:

$$F(X) = k_1 * t = k_{1ref} * \exp \left[-\frac{E_{A1}}{R} * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] * t \quad (3.2)$$

όπου k_{1ref} είναι η σταθερά του ρυθμού απόκρισης του ΤΤΙ στη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} , και E_{A1} η ενέργεια ενεργοποίησης της απόκρισης

Όμοια, για την περιγραφή της απόκρισης του ΤΤΙ σε κάποιο μεταβαλλόμενο προφίλ θερμοκρασίας-χρόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ολοκλήρωσης, καθώς και η προσέγγιση της δραστικής θερμοκρασίας (T_{eff}) που έχουν ήδη αναφερθεί για τη συνάρτηση ποιότητας ενός τροφίμου. Για ένα δείκτη που εκτίθεται στο ίδιο θερμοκρασιακό προφίλ, $T(t)$, με το προϊόν του τροφίμου, η συνάρτηση της απόκρισης με τη μέθοδο της ολοκλήρωσης μπορεί να εκφραστεί ως ακολούθως:

$$F(X)_t = k_{1ref} * \int_0^t \exp \left[-\frac{E_{A1}}{R} * \left(\frac{1}{T(t)} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] dt \quad (3.3)$$

και συναρτήσει της δραστικής θερμοκρασίας (T_{eff}):

$$F(X)_t = k_{\text{ref}} * \exp \left[-\frac{E_A}{R} * \left(\frac{1}{T_{\text{eff(TTI)}}} - \frac{1}{T_{\text{ref}}} \right) \right] * t \quad (3.4)$$

Για την ορθή εφαρμογή ενός TTI χρειάζεται να ακολουθηθούν τα εξής βήματα:

- Πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ώστε να εκτιμηθούν οι κινητικές παράμετροι (k_{ref} , E_A) και να εξαχθούν τα μοντέλα απόκρισης των δεικτών
- Για την εξασφάλιση της εγκυρότητας και αξιοπιστίας των TTIs, τα εξαγόμενα κινητικά μοντέλα επικυρώνονται σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις πραγματικές συνθήκες στην αλυσίδα διανομής

3.7 Αντιστοίχιση της απόκρισης των TTI με την ποιότητα των τροφίμων

Ο συσχετισμός της απόκρισης των δεικτών TTI με μια τιμή που να αποτελεί έκφραση της ποιότητας των τροφίμων δεν είναι άμεσος.

Προκειμένου να συσχετισθεί επιτυχώς ένα TTI με κάποιο τρόφιμο αναγκαίες προϋποθέσεις είναι:

1. Η ενέργεια ενεργοποίησης (E_A), ενδεικτική της θερμοκρασιακής ευαισθησίας της απόκρισης του TTI, να είναι παρόμοια με την ενέργεια ενεργοποίησης της απώλειας της ποιότητας των τροφίμων
2. Το σημείο λήξης του TTI να συμπίπτει με το τέλος της εμπορικής διάρκειας ζωής του τροφίμου.

Για να ικανοποιηθούν απόλυτα οι παραπάνω προϋποθέσεις απαιτείται η ανάπτυξη ενός ξεχωριστού TTI για κάθε τρόφιμο. Λόγω της μη πρακτικότητας της προσέγγισης αυτής, η χρήση ενός γενικευμένου διαγράμματος κρίνεται πιο εύχρηστη.

Στηριζόμενοι στα κινητικά μοντέλα που περιγράφουν την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων και την απόκριση ενός TTI εκτεθειμένου στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες, οι Ταουκίς και Labuza (1989a) ανέπτυξαν έναν γενικό αλγόριθμο εφαρμογής των TTI. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος επιτρέπει την εκτίμηση της τιμής του δείκτη ποιότητας A του τροφίμου, οποιαδήποτε χρονική στιγμή, από τη μετρούμενη απόκριση X του δείκτη στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή (Ταουκίς and Labuza, 1989a). Για την εφαρμογή του, είναι απαραίτητη η γνώση τόσο των κινητικών χαρακτηριστικών ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου ($f(A)$, k_A , E_A) όσο και των κινητικών χαρακτηριστικών απόκρισης του TTI ($F(X)$, k_i , E_{Ai}).

Η λογική ακολουθία που υποδεικνύει ο αλγόριθμος αυτός, περιλαμβάνει στην ουσία τα παρακάτω διαδοχικά βήματα:

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

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

- 2) Από την τιμή της $F(X)_t$ υπολογίζεται εν συνεχεία η τιμή της δραστικής θερμοκρασίας T_{eff} , η οποία μπορεί κάτω από κάποιες προϋποθέσεις να χρησιμοποιηθεί και για το τρόφιμο. Στο σημείο αυτό, πρέπει να εξεταστεί εάν η

θερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης του δείκτη από τη μια και της υποβάθμισης του τροφίμου από την άλλη είναι παρόμοιες, δηλαδή πρέπει

$$|E_{A(\text{ΤΤΙ})} - E_{A(\text{τροφίμου})}| < 25 \text{ kJ/mol.}$$

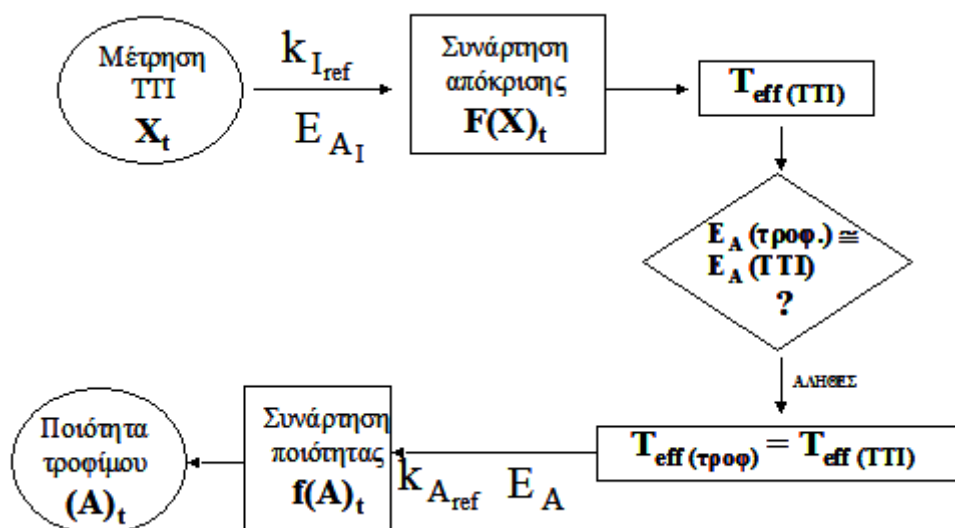
$$T_{\text{eff}(\text{ΤΤΙ})} = - \frac{E_{A_I}}{R \cdot \ln \left[\frac{F(X)_t}{k_{I_{\text{ref}}} \cdot t} \right]} \quad (\text{II})$$

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.

$$f(A)_t = k_A \cdot \exp \left(- \frac{E_A}{R \cdot T_{\text{eff}}} \right) \cdot t \quad (\text{III})$$

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.

$$A_t = f^{-1}(f(A)_t) \quad (\text{IV})$$



Σχήμα 3.1- Αλγόριθμος εφαρμογής ΤΤΙ για την πρόβλεψη της ποιότητας των τροφίμων (Ταουκίς, 2001)

Στο μοντέλο συσχέτισης ΤΤΙ και τροφίμου που περιγράφηκε παραπάνω, έχει γίνει η πολύ σημαντική παραδοχή, ότι $T_{\text{eff}(\text{τροφ})} = T_{\text{eff}(\text{ΤΤΙ})}$, για δεδομένη κατανομή της θερμοκρασίας. Αυτή η παραδοχή ισχύει όταν $E_{A(\text{τροφ})} = E_{A(\text{ΤΤΙ})}$. Δηλαδή, οι δραστικές θερμοκρασίες του τροφίμου και του ΤΤΙ είναι ίσες όταν και οι ενέργειες ενεργοποίησης είναι ίσες. Συνήθως, είναι δύσκολο να βρεθεί ένα ΤΤΙ που να έχει ακριβώς ίδια ενέργεια ενεργοποίησης με αυτή του τροφίμου. Ωστόσο, αν το ΤΤΙ και η αντίδραση υποβάθμισης της ποιότητας του τροφίμου έχουν παρόμοια θερμοκρασιακή ευαισθησία, γεγονός που μεταφράζεται σε διαφοροποίηση των ενεργειών ενεργοποίησης μικρότερη των 25 kJ/mol, η ίδια δραστική θερμοκρασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το προϊόν τροφίμου (Ταουκίς, 2001). Γενικά, όσο

μικρότερη είναι η διαφορά των E_A τόσο μεγαλύτερη είναι η ακρίβεια ένδειξης του ΤΤΙ για την πραγματική διάρκεια ζωής.

Είναι αναγκαίο να σημειωθεί ότι, η συγκεκριμένη κινητική προσέγγιση συσχετισμού της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιότητα των εξεταζόμενων τροφίμων, έχει εφαρμογή κατά κύριο λόγο στα ευαλλοίωτα ψυγμένα τρόφιμα (Taoukis et al., 1998; Taoukis and 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 εφαρμογής της εξίσωσης Arrhenius σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών και την παραδοχή ότι τα τρόφιμα δεν υπόκεινται σε απόψυξη κατά την αποθήκευσή τους (Giannakourou and Taoukis, 2003a, 2003b).

Το παραπάνω σχήμα εφαρμογής αποτέλεσε τη βάση για ένα φιλικό στο χρήστη λογισμικό (ΤΤΙ response and Shelf life calculator –ΤΤΙSLC v2.0) που αναπτύχθηκε στο ΕΜΠ για να μεταφράζει την απόκριση του κατάλληλου ΤΤΙ στην ποιοτική κατάσταση και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής οποιουδήποτε ελεγχόμενου τροφίμου (Ταούκης και συν., 2006).

3.8 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστηκής θερμοκρασίας T_{eff}

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

- **Η διαφορά στην E_A μεταξύ του τροφίμου και του ΤΤΙ**

Πρόκειται για συστηματικό και όχι στατιστικό σφάλμα. Γενικά ισχύει ότι όσο περισσότερο η E_A του ΤΤΙ προσεγγίζει αυτή του τροφίμου, τόσο μικρότερο το σφάλμα στον υπολογισμό της T_{eff} . Μια μετρούμενη απόλυτη διαφορά μικρότερη από 25kJ/mol μεταξύ των δύο τιμών της ενέργειας ενεργοποίησης, οδηγεί σε διαφορά μικρότερη από 1°C μεταξύ των δύο T_{eff} . Σφάλμα 1°C στον υπολογισμό του T_{eff} οδηγεί σε σφάλμα 10-15% στην εκτίμηση της συνάρτησης ποιότητας, απόκλιση που είναι συχνά αποδεκτή.

- **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 δειγματος, 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_{ref} , όμως αυτή η προσαρμογή

συνοδεύεται με κάποιο σφάλμα. Με τη χρήση τουλάχιστον 5 θερμοκρασιών μειώνεται η πιθανότητα σφάλματος (Ταουκίς, 2001).

3.9 Καταγραφή της ποιοτικής κατάστασης των τροφίμων στην αλυσίδα διακίνησης με τη χρήση των ΤΤΙ

Η χρήση των ΤΤΙ μπορεί να συμβάλει στον αποτελεσματικό ποιοτικό έλεγχο της αλυσίδας διακίνησης. Παρακολουθώντας, καταγράφοντας και ελέγχοντας το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό των τροφίμων-είτε σε επίπεδο ατομικών συσκευασιών είτε σε επίπεδο παλετών-σε όλη την πορεία τους, από το σημείο παραγωγής, τις ενδιάμεσες φάσεις διανομής μέχρι το τελικό στάδιο κατανάλωσης, καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός και η διόρθωση των προβληματικών σημείων όσο αφορά τις θερμοκρασιακές συνθήκες συντήρησης. Επίσης, γίνεται καλύτερος προγραμματισμός και διαχείριση των αποθεμάτων, αποδεσμεύοντας προς τα σημεία λιανικής πώλησης, πρώτα τις πιο "επιβαρυμένες" ποιοτικά μονάδες των προϊόντων.

Τέλος, μπορούν να λειτουργήσουν ως δείκτες "φρεσκότητας" για την εκτίμηση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής ευαλλοιώτων τροφίμων, όπως το κρέας, τα ιχθυηρά και τα θαλασσινά. Σημειώνεται, ότι οι δείκτες ΤΤΙ δεν στοχεύουν στην αντικατάστασή της αναγραφόμενης ημερομηνίας λήξης. Απεναντίας, δρούν συμπληρωματικά ως μια νέου τύπου θερμοκρασιακά εξαρτώμενη "ενεργή" σήμανση, η οποία επισημαίνει περιπτώσεις αυξημένης ποιοτικής υποβάθμισης λόγω ενδεχόμενης ανεπάρκειας της ψυκτικής αλυσίδας ή περιστασιακής θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης του προϊόντος.

Συνεπώς, η χρήση των "έξυπνων" ετικετών θα ωφελήσει σημαντικά τομείς όπως:

- διαχείριση ποιότητας τροφίμων
- διαχείριση ασφάλειας τροφίμων (HACCP)
- διαχείριση αποθηκών
- παρακολούθηση θερμοκρασίας
- ελάττωση απορριμμάτων

3.10 Εφαρμογές των ΤΤΙ

Από τη δεκαετία του 1980 που εντατικοποιήθηκε η έρευνα πάνω στους χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες ΤΤΙ, έχει πραγματοποιηθεί μία πληθώρα πειραματικών μελετών. Άλλες από αυτές τις μελέτες επικεντρώθηκαν στη συσχέτιση ανάμεσα σε συγκεκριμένους τύπους ΤΤΙ και συγκεκριμένα τρόφιμα, ενώ άλλες είχαν ως στόχο την επαλήθευση εφαρμογής των δεικτών στη ψυκτική αλυσίδα είτε σε δοκιμαστικό στάδιο είτε στην πραγματική διακίνηση.

Οι ΤΤΙ εφαρμόζονται σε διάφορα προϊόντα, όπως:

- ✓ Φρέσκο κρέας
- ✓ Φρέσκα φρούτα
- ✓ Φρέσκα λαχανικά
- ✓ Ψυγμένα και κατεψυγμένα τρόφιμα, όπως κρέας, ιχθυηρά, θαλασσινά, λαχανικά και άλλα
- ✓ Μπύρα και άλλα ποτά
- ✓ Γαλακτοκομικά προϊόντα
- ✓ Μανιτάρια
- ✓ Σοκολάτες
- ✓ Καραμέλες
- ✓ Καλλυντικά – Φάρμακα
- ✓ Προϊόντα φυτοκομίας και άλλα



Εικόνα 3.12- Εφαρμογή δεικτών CoolVu™ της Freshpoint

Η πρώτη ουσιαστική εμπορική εφαρμογή των ΤΤΙ ήταν η χρήση του δείκτη 3M Monitor Mark® από την εταιρεία 3M Co. στις συσκευασίες εμβολίων ιλαράς και πολιομυελίτιδας που διακινούνται από τον Διεθνή Οργανισμό Υγείας (WHO) προς τις χώρες του Τρίτου Κόσμου. Όσον αφορά την εφαρμογή των ΤΤΙ σε τρόφιμα, ξεχωρίζει η επί μία σειρά ετών χρήση των δεικτών Fresh-Check® στα προϊόντα ντελικατέσεν της γαλλικής αλυσίδας Monoprix με θετική αποδοχή από τους καταναλωτές. Η μονάδα διανομής φαγητού της εταιρείας Carrefour χρησιμοποιεί επίσης τους Fresh-Check® για να αποδείξει στους καταναλωτές της την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων που διανέμει (Ταουκίς, 2010). Επίσης, η μεγαλύτερη γερμανική αλυσίδα λιανικής πώλησης, EDEKA, πειραματίζεται στη χρήση των δεικτών OnVu™ στα προϊόντα κρέατος που διαθέτει. Στις ΗΠΑ, οι εισαγωγές φρέσκου σολομού υποχρεωτικά φέρουν ΤΤΙ (FDA's Import Alert # 16-25) στη συσκευασία τους ενώ χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες χρησιμοποιεί και η αμερικάνικη αλυσίδα υπεραγορών CUB FOODS. Οι δείκτες Check-Point® της

εταιρείας VITSAB χρησιμοποιούνται σε φρέσκα θαλασσινά συσκευασμένα υπό κενό ή τροποποιημένες ατμόσφαιρες(MAP) για εισαγωγή στις ΗΠΑ. Η αεροπορική εταιρεία British airways έχει δημιουργήσει ένα Smart Label σύστημα ελέγχου για τις κατεψυγμένες έτοιμες τροφές που καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της πτήσης χρησιμοποιώντας ενζυμικά δίχρωμα ΤΤΙ της εταιρείας VITSAB. Μάλιστα, η συνεργασία της British Airways με τη Vitsab βραβεύτηκε στο Συμβούλιο της IFSA (International Inflight Food Service Association) στις 11 Μαρτίου 2005 στην Κοπεγχάγη, Δανία (Ταουκίς, 2010, <http://vitsab.com>). 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. Ο δείκτης eO[®] της εταιρείας CRYOLOG συνοδεύει τα πακέτα λιανικής πώλησης κάποιου τύπου σάντουιτς (Ταουκίς, 2010). Πιο πρόσφατα, η γαλλική εταιρεία catering Dabawalla αξιοποιεί τους νέους δείκτες Torcrgo[®] της CRYOLOG για να αποδείξει στους πελάτες της την φρεσκότητα και ασφάλεια των προϊόντων της. Επίσης, και η εταιρεία κατεψυγμένων τροφίμων Tourargel αξιοποιεί τους Torcrgo[®] για τον έλεγχο των θερμοκρασιακών συνθηκών στην ψυκτική της αλυσίδα (<http://cryolog.com>)



Εικόνα 3.13- Fresh-check[®] της Temptime σε συσκευασίεςμανιταριών



(α)

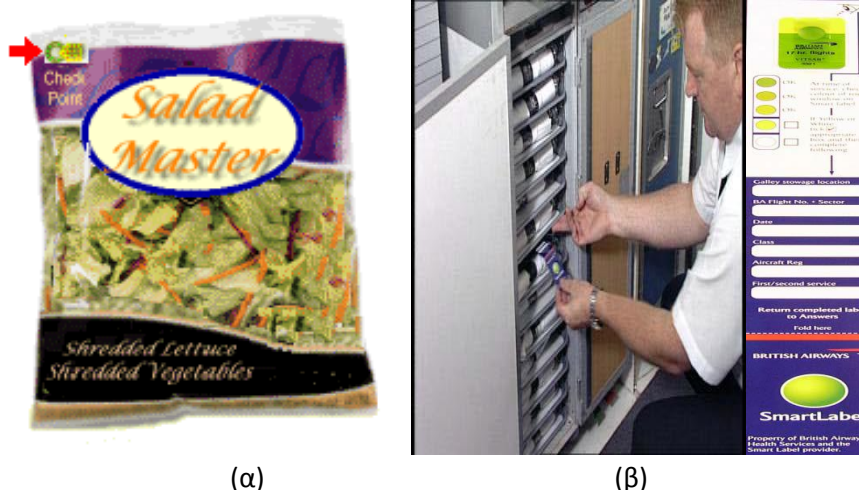


(β)



(γ)

Εικόνα 3.14- OnVu[™] ΤΤΙ σε (α) σαλάτες, (β) προϊόντα κρέατος από την γερμανική αλυσίδα EDEKA και (γ) από την ελβετική εταιρεία Kneuss



Εικόνα 3.15- (α) Τρίχρωμος δείκτης Checkpoint® της Vitsab σε σαλάτες, (β) σύστημα ελέγχου Smartlabel της British Airways



Εικόνα 3.16- eO® της Cγολοg σε (α) προϊόντα τύπου σάντουιτς και (β) προϊόντα της γαλλικής εταιρείας Dabawalla

Στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν διπλωματικές εργασίες με αντικείμενο την εφαρμογή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών στην διαχείριση της αλυσίδας ψυγμένων και κατεψυγμένων προϊόντων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η εφαρμογή των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών σε προϊόντα κρέατος (Μεταξά, 2009, Πολεμαρχάκη, 2015, Πέτρου, 2016) και ψυγμένα και κατεψυγμένα ψάρια (Σταματίου, 2008, Πλατάκου, 2010, Τσατσαράγκου, 2010, Λουκιανού, 2011, Τούλη, 2013, Περικλέους, 2016).

3.11 Περιορισμοί στη χρήση και εφαρμογή των ΤΤΙ

Παρά τη σημαντική συνεισφορά των δεικτών ΤΤΙ στον έλεγχο και στη βελτιστοποίηση της αλυσίδας διακίνησης των τροφίμων, στην ελάττωση των

απορριπτόμενων προϊόντων και στην ουσιαστική πληροφόρηση των καταναλωτών για την κατάσταση ποιότητας των προϊόντων, δεν έχουν μέχρι στιγμής αξιοποιηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό σε πραγματικές συνθήκες. Οι βασικότεροι λόγοι για την επιφυλακτικότητα που δείχνουν οι παραγωγοί είναι το κόστος, η αξιοπιστία και η εφαρμοσιμότητά τους (Ταουκίς, 2001).

1. **Αξιοπιστία:** Η αξιοπιστία ενός συστήματος ΤΤΙ εξαρτάται από την αναπαραγωγιμότητα των αποκρίσεων του στα μελετούμενα θερμοκρασιακά εύρη, τα διαστήματα εμπιστοσύνης των υπολογισμένων κινητικών παραμέτρων, καθώς και από τη διαφορά μεταξύ της ενέργειας ενεργοποίησης τροφίμου-δείκτη (Fu and Labuza, 1992). Οι αμφιβολίες της βιομηχανίας τροφίμων για την αξιόπιστη απόκριση των δεικτών βασίζεται στους υπερβολικούς ισχυρισμούς κατασκευαστών κάποιων πρώτων συστημάτων ΤΤΙ. Ωστόσο, η κατασκευή των σύγχρονων συστημάτων ΤΤΙ ακολουθεί αυστηρά πρότυπα παραγωγής και διασφάλισης ποιότητας, με αποτέλεσμα την παροχή αναπαραγωγίσιμων και αξιόπιστων αποκρίσεων σύμφωνα με τις προδιαγραφές BSI (BS 7908, 1999).
2. **Κόστος:** Το κόστος των περισσότερων δεικτών παραμένει σχετικά υψηλό παρ' όλο που αρκετοί δείκτες έχουν εισέλθει στη μαζική παραγωγή. Το κόστος των ΤΤΙ εξαρτάται άμεσα από τον όγκο και έχει εκτιμηθεί από 2 έως 20 λεπτά ανά μονάδα (Ταουκίς & Labuza, 2001). Ένας τρόπος για να μειωθούν τα κόστη ελέγχου σε αποδεκτά επίπεδα είναι να τυποποιηθεί η μονάδα παραγωγής και τα ΤΤΙ να επικολλούνται σε ένα κατάλληλο μέγεθος (π.χ. κασόνι, παλέτα). Ωστόσο, αν όλα τα άλλα ερωτηματικά ήταν απαντημένα, μία ανάλυση κόστους-οφέλους θα ήταν υπέρ της εκτεταμένης χρήσης των ΤΤΙ.
3. **Εφαρμοσιμότητα:** Το πιο σημαντικό εμπόδιο στην ευρεία εμπορική χρήση των δεικτών έγκειται στο αν η εφαρμογή τους είναι πράγματι αποτελεσματική. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απόκριση ενός ΤΤΙ πρέπει να μπορεί να συσχετισθεί με την ποιοτική αλλοίωση του τροφίμου. Στο παρελθόν, οι σχετικές δημοσιεύσεις επικεντρώθηκαν στη συσχέτιση ΤΤΙ με μια γενική τάξη τροφίμων (π.χ. κατεψυγμένα τρόφιμα). Η γενίκευση αυτή, όμως, κρίθηκε αναξιόπιστη, διότι ακόμη και τρόφιμα του ίδιου τύπου διαφέρουν ως προς την ποιοτική υποβάθμιση και τη θερμοκρασιακή ευαισθησία. Συνεπώς, έπρεπε η θερμοκρασιακή συμπεριφορά του δείκτη να ταιριάζει με αυτή του υπό εξέταση τροφίμου. Η συγκεκριμένη προσέγγιση απαιτούσε την ύπαρξη μεγάλου αριθμού ΤΤΙ και αυτό ήταν πρακτικά αδύνατο και καθιστούσε την ευρεία χρήση τους δύσκολη (Ταουκίς, 2001). Με την ανάπτυξη, όμως, κινητικών μοντέλων τόσο για την απόκριση των δεικτών όσο και για την απώλεια ποιότητας και τη διατηρησιμότητα των τροφίμων κατέστη δυνατή η εγκαθίδρυση μιας γενικής μαθηματικής μεθοδολογίας συσχετισμού (Ταουκίς και Labuza, 1989a, 1989b; Ταουκίς, 2001), η οποία επιτρέπει την επιλογή του καταλληλότερου δείκτη για ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Ακόμη, δεν θα πρέπει να αναμένει κανείς ότι ένα ΤΤΙ θα μπορέσει να καταγράψει τις θερμοκρασιακές συνθήκες όπως ένα ηλεκτρονικό

- καταγραφικό θερμοκρασίας (data logger). Ωστόσο, σε επίπεδο μονάδας προϊόντος, οι TTI θεωρούνται οικονομικότεροι και πιο εύχρηστοι.
4. **Κίνδυνος διαπερατότητας αερίων:** Σε κάποια TTI που λειτουργούν με χημική ή ενζυμική αντίδραση αποδείχθηκε ότι πολλές φορές εμφανίζουν ευαισθησία στη διάχυση αερίου διαμέσου πολυμερούς φιλμ που χρησιμοποιείται για να περιλάβει τα αντιδραστήρια.
 5. **Έλεγχος της εξωτερικής θερμοκρασίας της συσκευασίας και όχι του τροφίμου:** Επειδή τα TTI 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 παρείχε ακριβέστερες θερμοκρασιακές τιμές καθώς θα επέτρεπε στον αισθητήρα να αποκριθεί καλύτερα στο ίδιο θερμικό περιεχόμενο με αυτό του τροφίμου στο εσωτερικό και να αναγνωστεί με εύκολο τρόπο.
 6. **Αντιδράσεις από τις εταιρείες διανομής και τη βιομηχανία:** Οι εταιρείες διανομής υποστηρίζουν ότι, στην περίπτωση που η ένδειξη του TTI υποδεικνύει αλλοίωση του προϊόντος, η οποία όμως οφείλεται σε αστοχίες από την εταιρεία παραγωγής, θα υπάρξει δυσφήμιση και υπονόμευσή τους και περαιτέρω κόστη και προσπάθειες για διόρθωση της ζημιάς. Από την πλευρά των επιχειρήσεων παραγωγής τροφίμων, και ειδικότερα των μικρο-μεσαίων, ένα τέτοιο γεγονός μπορεί να αποβεί μοιραίο για τη βιωσιμότητα τους εξαιτίας των περιορισμένων διαθέσιμων πόρων (Pennanen et al., 2015).
 7. **Άγνοια των καταναλωτών:** Εκτός από τα ανωτέρω τεχνικά και οικονομικά προβλήματα, η άγνοια των καταναλωτών για 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.

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

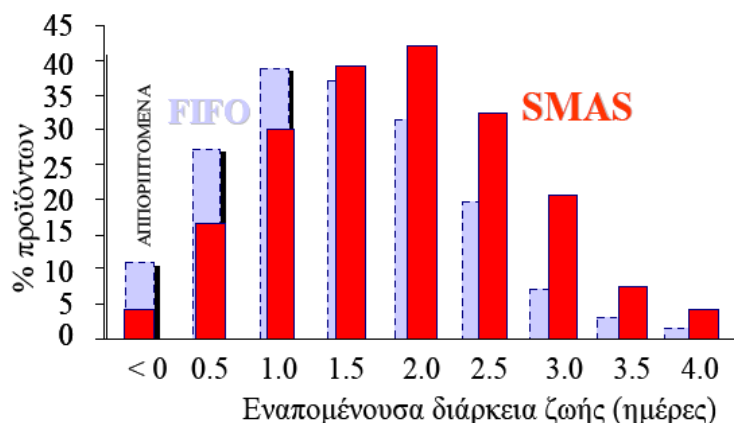
Το SMAS είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας που στοχεύει στη βελτιστοποίηση της διακίνησης των προϊόντων από την άποψη της ποιότητας και της ασφάλειας. Βασίζεται στη δυνατότητα της συνεχούς καταγραφής των θερμοκρασιακών συνθηκών του κάθε προϊόντος με τη χρήση Χρονο-θερμοκρασιακών Ολοκληρωτών (TTI). Η απόκριση των TTI μπορεί να συσχετιστεί με την ασφάλεια και την ποιοτική κατάσταση των τροφίμων σε κάθε σημείο της ψυκτικής αλυσίδας παρέχοντας ένα αποτελεσματικό εργαλείο απόφασης.

Το ακρωνύμιο SMAS είναι ο σύντομος τίτλος του τριετούς προγράμματος (2003-2006) ερευνητικού έργου “Development and application of a TTI based Safety and Monitoring System for Chilled Meat Products”, το οποίο συντονίστηκε από το Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Σε αυτό το σύστημα επιχειρείται να αντικατασταθεί το παραδοσιακό σύστημα διανομής FIFO (first in-first out), σύμφωνα με το οποίο τα προϊόντα που έχουν παραχθεί παλαιότερα ή εισέρχονται πρώτα σε κάποιο χώρο αποθήκευσης είναι αυτά που αποδεσμεύονται πρώτα, 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 χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό των προϊόντων.

Το SMAS χρησιμοποιεί τα επαληθευμένα μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης των παθογόνων και των ειδικών μικροοργανισμών αλλοίωσης (Specific spoilage organisms SSO) για κάθε είδος προϊόντος, στοιχεία για την κατανομή του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού των αλλοιογόνων οργανισμών, καθώς και για την πιθανότητα ύπαρξης παθογόνων, τη συνεχή θερμοκρασιακή καταγραφή της ψυκτικής αλυσίδας με τη βοήθεια των ΤΤΙ και τέλος, τη συσχέτιση της οργανοληπτικής αποδοχής με ένα τελικό επίπεδο μικροοργανισμών, που σηματοδοτεί τη λήξη της ζωής του προϊόντος.

Όλα τα παραπάνω στοιχεία εισάγονται στο σύστημα και ολοκληρώνονται με τη βοήθεια ενός λογισμικού, το οποίο επιτρέπει τον υπολογισμό της εναπομένουσας 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, κατά το δυνατόν, στενότερη κατανομή ποιότητας στο τελικό στάδιο της κατανάλωσης και μείωση του ρίσκου ασθένειας κατά την κατανάλωση (<http://www.smas.chemeng.ntua.gr>).



Σχήμα 3.2- Αύξηση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής προϊόντων κρέατος με τη χρήση του SMAS (Ταούκης, 2005)

3.13 Μελλοντικές τάσεις για τη χρήση ΤΤΙ

Η ολοένα αυξανόμενη απαίτηση των καταναλωτών για βελτιστοποίηση των συστημάτων διασφάλισης της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων, θα οδηγήσουν στην ευρεία εμπορική εφαρμογή των συγκεκριμένων δεικτών.

Η πρόοδος σε ότι αφορά την ποικιλία, την αξιοπιστία και την ευελιξία των ΤΤΙ, αλλά και τον καλύτερο προσδιορισμό της διάρκειας ζωής των προϊόντων τροφίμων, θα επιτρέψει την επιτυχή εφαρμογή των εργαλείων αριστοποίησης της ψυκτικής αλυσίδας όπως το σύστημα λήψης αποφάσεων SLDS (Shelf Life Decision System). Επίσης, η τεχνολογία ανάπτυξης των ΤΤΙ εστιασμένη στην ποσοτική ανάλυση της επικινδυνότητας των τροφίμων, θα επιτρέψει τη μελέτη και ανάπτυξη ενός συστήματος που βασίζεται στα ΤΤΙ και το οποίο μαζί με την ποιότητα θα επιβεβαιώνει και την ασφάλεια της ψυκτικής αλυσίδας, όπως συμβαίνει με το σύστημα SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) (Taoukis and Labuza, 2003).

Η ανάπτυξη νέων μαθηματικών μοντέλων για τη θερμοκρασιακή ευαισθησία των συστημάτων ΤΤΙ αποτελεί ένα ανοιχτό πεδίο έρευνας, καθώς η εξίσωση Arrhenius που χρησιμοποιείται για την κινητική μοντελοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά σφάλματα λόγω έλλειψης δεδομένων ή μη γραμμικότητας. Ήδη μία καινούρια μέθοδος μοντελοποίησης της θερμοκρασιακής εξάρτησης βασισμένη στη fuzzy reasoning έχει αναπτυχθεί (Han et al., 2012).

Μέχρι στιγμής πλήθος επιστημονικών μελετών έχουν διεξαχθεί για την χρήση των ΤΤΙ στην παρακολούθηση της ποιότητας και διατηρησιμότητας ψυγμένων κυρίως τροφίμων στα οποία αναπτύσσονται αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί. Μία νέα και ανοιχτή περιοχή έρευνας είναι η εφαρμογή ΤΤΙ για τον έλεγχο πιθανής ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών, η ανάπτυξη των οποίων στα τρόφιμα εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Η πιθανή χρήση ΤΤΙ σε τρόφιμα όπου μπορεί να παραχθεί τοξίνη από το *Clostridium botulinum* έχει προταθεί από τους

Skinner και Larkin (1998). Ο δείκτης L5-8 CheckPoint® της Vitsab χρησιμοποιείται για αυτό το σκοπό σε φρέσκα συσκευασμένα σε κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα θαλασσινά για εισαγωγή στις ΗΠΑ (Ταουκίς, 2010). Ο καινούριος δείκτης Shellstock® που ανέπτυξε η ίδια εταιρεία σε συνεργασία με τον U.S. FDA εφαρμόστηκε σε στρείδια, αμέσως μετά την συγκομιδή τους, προκειμένου να ελεγχθεί η ανάπτυξη των παθογόνων *Vibrio parahaemolyticus* και *Vibrio vulnificus* (Vitsab, 2016). Άλλες έρευνες που έχουν δημοσιευθεί προς αυτή την κατεύθυνση περιλαμβάνουν την εφαρμογή του δείκτη eO® για την πρόβλεψη μόλυνσης προϊόντων κρέατος συσκευασμένων σε MAP από τα παθογόνα *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* (Ellouze et al., 2010) και ενός πρότυπου μικροβιακού ΤΤΙ για τη πρόβλεψη μόλυνσης προμαγειρεμένου πατέ από *Listeria monocytogenes* (Koutsoumanis et al., 2015).

Τέλος, ο συνδυασμός των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) με την τεχνολογία ταυτοποίησης μέσω ραδιοσυχνότητας (Radio Frequency Identification, RFID), ενός συστήματος ασύρματης αναγνώρισης αντικειμένων προς αντικατάσταση του barcode, θα επιτρέψει την εξ αποστάσεως παρακολούθηση της ποιότητας και διατηρησιμότητας των τροφίμων. Στο ερευνητικό πρόγραμμα Chill-on (2006-2010) επιχειρήθηκε ένας τέτοιος συνδυασμός ενός φωτοχημικού ΤΤΙ (OnVu™) με ένα τσιπ RFID και εφαρμόστηκε στην ψυκτική αλυσίδα ιχθύων.



Εικόνα 3.17- Δείκτης Shellstock® της Vitsab σε στρείδια

3.14 Σκοπός της εργασίας

Έχει γίνει αντιληπτό από τα προηγούμενα κεφάλαια ότι η θερμοκρασιακή κακομεταχείριση ευαλλοιώτων τροφίμων κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα οδηγεί στην ποιοτική τους υποβάθμιση. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανό η πραγματική διάρκεια ζωής του προϊόντος να διαφέρει από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης του. Η χρήση χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) για την εντατική παρακολούθηση και καταγραφή των θερμοκρασιακών συνθηκών σε όλα τα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας κρίνεται απαραίτητη για να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η ποιότητα των ιχθύων.

Προϋπόθεση για την εύρεση του κατάλληλου ΤΤΙ είναι η κινητική μελέτη και η εύρεση της συνάρτησης απόκρισης διάφορων ΤΤΙ, η κινητική μελέτη της αλλοίωσης του ιχθύος, και τέλος, η συσχέτιση των κινητικών χαρακτηριστικών και των χρόνων ζωής ΤΤΙ και τροφίμου, έτσι ώστε από την οπτική απόκριση του δείκτη να εκτιμάται η κατάσταση ποιότητας του τροφίμου.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών και μικροβιακών τύπων ΤΤΙ, η μέλετη της διατηρησιμότητας συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας και η επιλογή και αντιστοίχιση κατάλληλου χρονοθερμοκρασιακού ολοκληρωτή για τη βελτίωση της διαχείρισης της ποιότητας του τροφίμου στην ψυκτική αλυσίδα.

Κεφάλαιο 4

Πειραματική διαδικασία-Υλικά και μέθοδοι

4.1 Εισαγωγή-Σκοπός

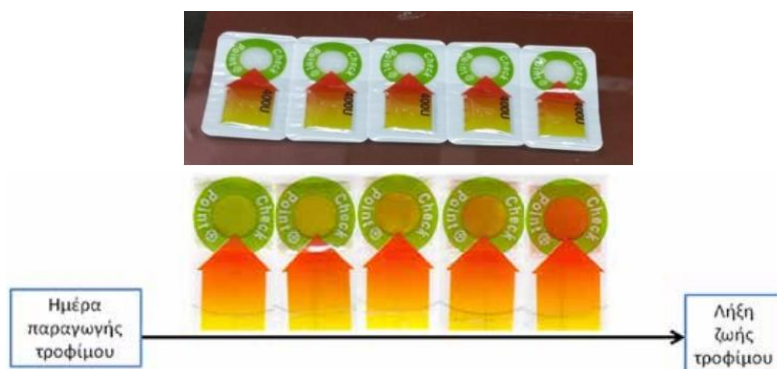
Ο σκοπός της εργασίας συνοψίζεται αναλυτικότερα στα ακόλουθα βήματα:

- Μελέτη της κινητικής απόκρισης ενζυμικών ΤΤΙ σε θερμοκρασίες ψύξης και ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων με απώτερο στόχο την εφαρμογή τους στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας
- Μελέτη της κινητικής απόκρισης μικροβιακών ΤΤΙ σε θερμοκρασίες ψύξης και ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων με απώτερο στόχο την εφαρμογή τους στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας
- Μελέτη της αξιοπιστίας των ΤΤΙ, μέσω παρακολούθησης της εξέλιξής τους σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες.
- Κινητική μελέτη υποβάθμισης της ποιότητας καπνιστής πέστροφας συσκευασμένης υπό κενό σε θερμοκρασίες ψύξης
- Εύρεση και αντιστοίχιση του κατάλληλου ΤΤΙ για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας της συσκευασμένης υπό κενό καπνιστής πέστροφας.

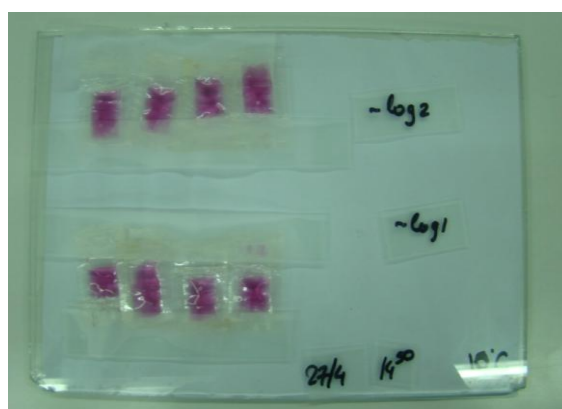
4.2 Μελέτη ενζυμικών και μικροβιακών χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών(ΤΤΙ)

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η κινητική απόκριση των παρακάτω τύπων χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών:

- ενζυμικών ΤΤΙ της εταιρείας Vitsab, τύπου LP (Check Point®, VITSAB Co., Malmö, Sweden) με διαφορετική συγκέντρωση ενζύμου (σε Units) το καθένα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ένζυμο που περιέχουν οι δείκτες αυτού του τύπου είναι η παγκρεατική λιπάση. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι: LP_5U, LP_10U, LP_20U, LP_50U, LP_100U, LP_200U, LP_400U και LP_600U. Σε κάθε δείκτη εφαρμόστηκαν 5 επαναλήψεις.
- μικροβιακών ΤΤΙ, οι οποίοι παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π. ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία των Vaikousi et al.(2008). Οι δείκτες που μελετήθηκαν είχαν αρχικό επίπεδο εμβολίου μικροοργανισμού 1 logCFU/ml, 2 logCFU/ml, 5 logCFU/ml. Σημειώνεται ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο θα αναφέρεται ως log1, log2 και log5. Σε κάθε δείκτη εφαρμόστηκαν 4 επαναλήψεις.



Εικόνα 4.1-Ενζυμικά TTI τύπου LP (α) πριν και (β) μετά την ενεργοποίηση



Εικόνα 4.2-Μικροβιακά TTI

4.2.1 Πειραματική διαδικασία

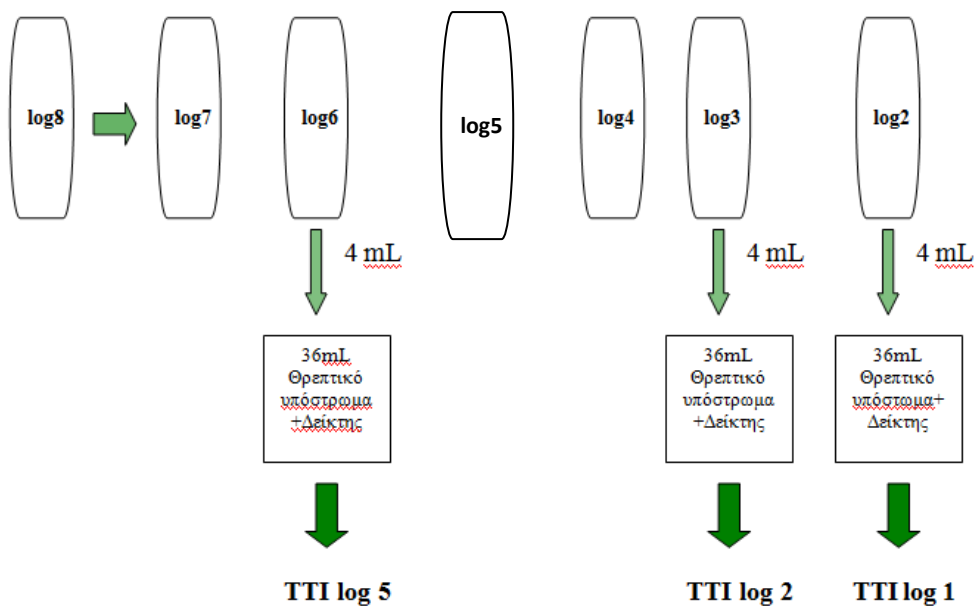
Ανάπτυξη μικροβιακού συστήματος TTI

Ένα μικροβιακό σύστημα TTI αποτελείται από το μικροοργανισμό, το θρεπτικό υπόστρωμα και το χημικό δείκτη pH. Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus sakei* (LQC 1089) που προμηθεύτηκε από το Εργαστήριο Υγιεινής και Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ως μέσο ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient broth εμπλουτισμένο με γλυκόζη (2% w/v) (Merck, Darmstadt, Germany) και εκχύλισμα ζυμών (Yeast extract) (0.5% w/v) (Merck, Darmstadt, Germany). Το ερυθρό της χλωροφαινόλης (chlorophenol red) (διάλυμα συγκέντρωσης 1,5 % v/v σε 0.00944M NaOH), επιλέχτηκε ως ο καταλληλότερος χημικός δείκτης που προκαλεί εμφανή και διακριτή μη αντιστρεπτή χρωματική μεταβολή του υποστρώματος από τον αρχικό μωβ σε ροζέ και τελικά κίτρινο χρωματισμό (σημείο λήξης), αντικατοπτρίζοντας τη σταδιακή μείωση του pH λόγω της βακτηριακής ανάπτυξης, χωρίς να μεταβολίζεται ο ίδιος από το μικροβιακό στέλεχος.

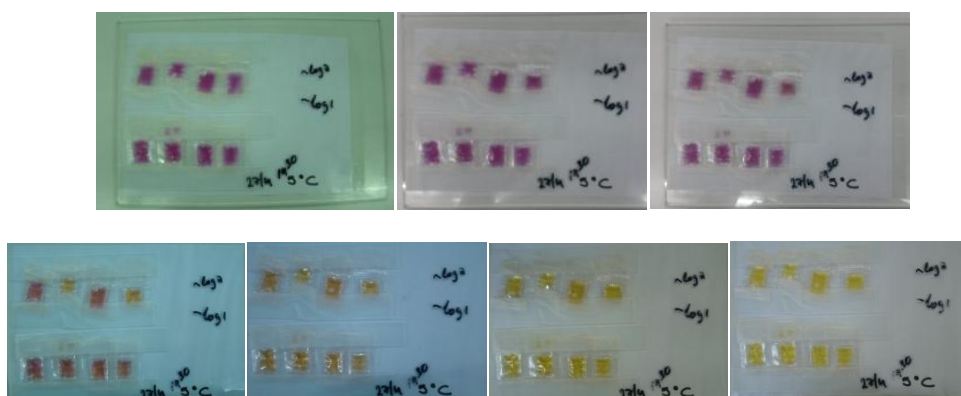
Για την προετοιμασία των δειγμάτων του τελικού συστήματος ΤΤΙ, αρχικά τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος διαλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό και αφού έγινε ρύθμιση του pH στο 6.4 – 6.5 με χρήση 1M HCl, το μίγμα μοιράστηκε σε ποσότητες των 36 ml σε ερμητικά σφραγισμένους περιέκτες και αποστειρώθηκε (121°C, 15 min). Το διάλυμα του χημικού δείκτη αποστειρώθηκε με διήθηση (ψυχρή αποστείρωση) και προστέθηκε ασηπτικά σε συγκέντρωση 1.5% v/v στους αποστειρωμένους περιέκτες πριν τον εμβολιασμό τους με το στέλεχος του *L. sakei*, ώστε να διαπιστωθεί και οπτικώς η προκαλούμενη από την ανάπτυξή του μικροοργανισμού πτώση του pH και αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος.

Για την κατασκευή των μικροβιακών ΤΤΙ ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Μετάγγιση 1 mL διαλύματος μικροοργανισμού, ο οποίος βρισκόταν στους 0°C, σε 9 mL αποστειρωμένου διαλύματος MRS broth (Merck, Darmstadt, Germany) και τοποθέτησή του νέου διαλύματος σε θάλαμο στους 30°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, βρέθηκε μικροβιακό φορτίο στο διάλυμα γύρω στο log8.
2. Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml προστέθηκαν 9 ml ορού Ringer. Από το διάλυμα με μικροβιακό φορτίο log8 λήφθηκε 1ml, τοποθετήθηκε στο σωλήνα και αναδεύτηκε. Από αυτόν λήφθηκε 1ml και προστέθηκε στον επόμενο σωλήνα. Κάθε αραιώση ήταν υποδεκαπλάσια της προηγούμενης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι την αραιώση log2.
3. Από κάθε αραιώση log2, log3 και log6 λήφθηκαν 4ml και προστέθηκαν στα 36ml κάθε περιέκτη. Έτσι, προέκυψαν συγκεντρώσεις log1, log2 και log5 αντίστοιχα.
4. Από κάθε περιέκτη λήφθηκαν 300ml και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια (mini-pouches), τα οποία θερμοκολλήθηκαν και στερεώθηκαν σε γυαλιά. Έτσι, προέκυψαν ΤΤΙ με αρχικό επίπεδο εμβολίου log1, log2 και log5. Ταυτόχρονα, ποσότητα από κάθε περιέκτη τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες για μέτρηση pH.



Εικόνα 4.3-Παρασκευή μικροβιακών ΤΤΙ αρχικού επιπέδου εμβολίου log1, log2 και log5



Εικόνα 4.4-Χρωματική κλίμακα μικροβιακών ΤΤΙ

Για την επιβεβαιωθεί το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε ΤΤΙ, στρώθηκαν τρυβλία του επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος MRS για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων. Η μικροβιολογική ανάλυση σε υπόστρωμα MRS έδειξε πως:

ΤΤΙ log5 → log5.37

ΤΤΙ log2 → log2.37

ΤΤΙ log1 → log1.37

Συνεπώς, αποδείχτηκε πως οι υποθέσεις για τη συγκέντρωση των ΤΤΙ είναι ορθές. Η αναφορά στα ΤΤΙ θα γίνεται ως ΤΤΙ αρχικού επιπέδου εμβολίου log5, log2 και log1.

Μελέτη της απόκρισης ενζυμικών και μικροβιακών ΤΤΙ

- 1) Αρχικά, έγινε η ενεργοποίηση των ενζυμικών και μικροβιακών χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών.
- 2) Στη συνέχεια, εκτελέστηκαν πειράματα τόσο σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες όσο και σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες. Συγκεκριμένα, ένας ορισμένος αριθμός δειγμάτων από κάθε τύπο ΤΤΙ τοποθετήθηκε σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας. Στους Πίνακες 4.1 και 4.2 φαίνονται οι θερμοκρασίες μελέτης για κάθε τύπο ΤΤΙ.
- 3) Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε κάθε θερμοκρασία και για κάθε τύπο ΤΤΙ γινόταν μέτρηση της μεταβολής του χρώματος με τη χρήση χρωματόμετρου (X-rite, Michigan, USA). Ύστερα από επεξεργασία των παραμέτρων του χρώματος εξήχθησαν οι συναρτήσεις απόκρισης των ΤΤΙ. Για τα μικροβιακά ΤΤΙ παράλληλα με το χρώμα λαμβάνονταν και μετρήσεις pH από τους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Πίνακας 4.1-Θερμοκρασίες μελέτης για κάθε τύπο ενζυμικού ΤΤΙ

Τύπος ενζυμικού ΤΤΙ	Θερμοκρασίες(°C)
LP_5U	0, 5, 10, 15
LP_10U	0, 5, 10, 15
LP_20U	0, 5, 10, 15
LP_50U	0, 2,5, 5, 10, 15
LP_100U	0, 2,5, 5, 10, 15
LP_200U	0, 2,5, 5, 10, 15
LP_400U	0, 2,5, 5, 10, 15
LP_600U	0, 2,5, 5, 10, 15

Πίνακας 4.6-Θερμοκρασίες μελέτης για κάθε τύπο μικροβιακού ΤΤΙ

Τύπος μικροβιακού ΤΤΙ	Θερμοκρασίες(°C)
log1	0, 5, 7, 10
log2	0, 5, 7, 10
log5	0, 5, 7, 10

Σημειώνεται ότι και για τους ενζυμικούς και για τους μικροβιακούς δείκτες πραγματοποιήθηκαν πειράματα και σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες ψύξης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε το παρακάτω χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ:

- ✓ 5°C (5h)
- ✓ 8°C (5h)
- ✓ 10°C (2h)

4.2.2 Συσκευές πειραματικής διαδικασίας

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συσκευές:

- ❖ Θάλαμοι αποθήκευσης των ΤΤΙ (Μοντέλο : Sanyo MIR 153)
- ❖ Χρωματόμετρο X-rite Eye1pro Colorimeter Illumination D50 για τη μέτρηση του χρώματος των ΤΤΙ
- ❖ Πεχάμετρο (pH-meter 338, AMEL Instruments, Milan, Italy) για τη μέτρηση της μεταβολής pH των μικροβιακών ΤΤΙ

Θάλαμοι αποθήκευσης των ΤΤΙ

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, τα ΤΤΙ τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ελεγχόμενου θερμοκρασιακού περιβάλλοντος. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SANYO MIR 153.

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.

Συσκευή μέτρησης χρώματος

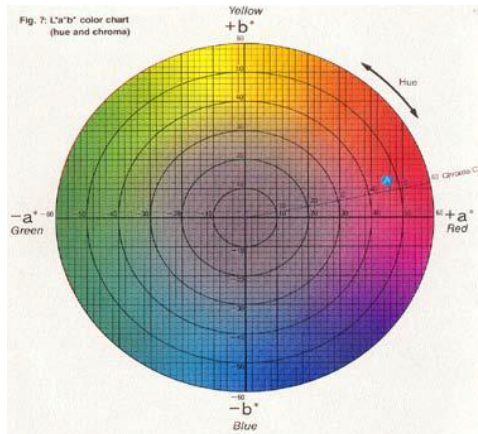
Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων χρώματος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή X-rite Eye1pro Colorimeter Illumination D50 η οποία φαίνεται στην εικόνα 4.2.



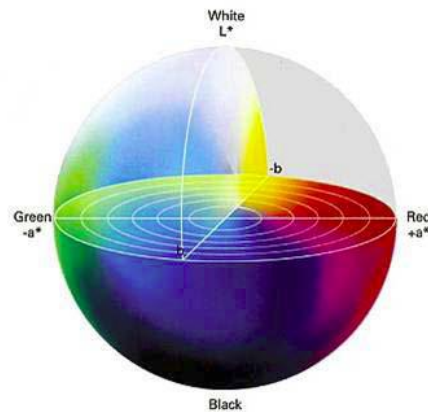
Εικόνα 4.5-Χρωματόμετρο X-rite Eye1pro

Η συσκευή αυτή προσδιορίζει τις παραμέτρους L, a και b στο τριαξονικό σύστημα CIELAB.

Η παράμετρος a όταν παίρνει αρνητικές τιμές προσδιορίζει το πράσινο χρώμα, ενώ στις θετικές τιμές προσδιορίζει το κόκκινο χρώμα. Επίσης, η παράμετρος b στις αρνητικές τιμές προσδιορίζει το μπλε χρώμα ενώ στις θετικές τιμές το κίτρινο χρώμα. Το L προσδιορίζει την φωτεινότητα του δείγματος.



Εικόνα 4.6-Το χρωματικό διάγραμμα των a, b



Εικόνα 4.7-Απεικόνιση στο χώρο των L, a, 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):

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

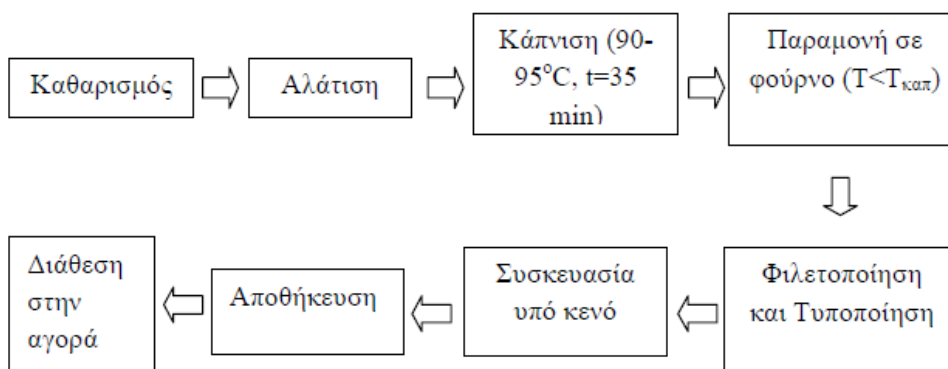
$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (4.2)$$

όπου,

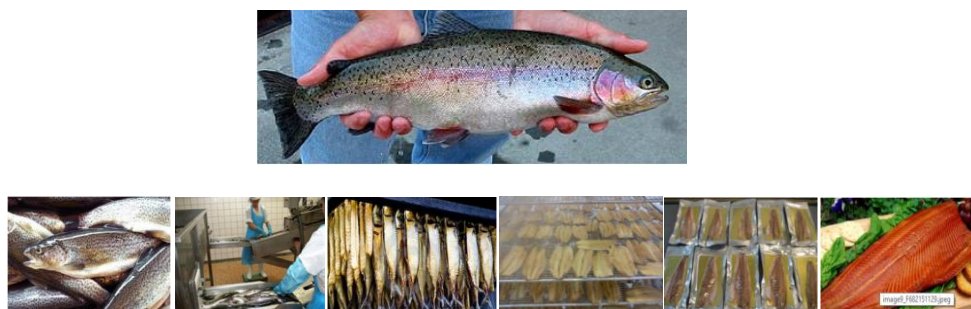
L_0, a_0, b_0 : οι τιμές των L, a, b τη χρονική στιγμή της ενεργοποίησης(χρόνος 0)

4.3 Μελέτη των παραγόντων αλλοίωσης καπνιστής πέστροφας συσκευασμένης υπό κενό - Εφαρμογή των TTI για την πρόβλεψη της εναπομένουσας διάρκειας ζωής

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η διατηρησιμότητα καπνιστής πέστροφας συσκευασμένης υπό κενό και συντηρημένης σε ψύξη 0-15°C. Τα δείγματα προμηθεύονταν από την εταιρεία Ιχθυοκαλλιέργειες - Β. ΓΕΙΤΟΝΑΣ & ΣΙΑ Ε.Ε. Η πέστροφα είχε προηγουμένως υποστεί επεξεργασία (καθαρισμό, αλάτιση, κάπνιση για 35 λεπτά σε θερμοκρασία 90-95°C σε ξύλο ελιάς και οξιάς και τέλος φιλετοποίηση). Στο διάγραμμα ροής που ακολουθεί απεικονίζεται η διαδικασία μεταποίησης της πέστροφας.



Εικόνα 4.8-Διάγραμμα ροής μεταποίησης πέστροφας



Εικόνα 4.9-Διαδικασία παραγωγής καπνιστής πέστροφας

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη για τον έλεγχο της εφαρμοσιμότητας των ενζυμικών δεικτών τύπου LP μέσω πειραμάτων κατά τη διάρκεια των οποίων προσκολλήθηκαν πάνω στις συσκευασίες των καπνιστών προϊόντων διάφορες συγκεντρώσεις ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP των οποίων η απόκριση θα μπορεί να μεταφραστεί σε ποιότητα και εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου.

4.3.1 Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη της διατηρησιμότητας τα δείγματα-συσκευασίες αποθηκεύτηκαν σε ψυκτικούς θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας 0, 5 και 10°C και σε θάλαμο μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακών συνθηκών ψύξης με δραστική θερμοκρασία $T_{\text{eff}}=6,9$ °C. Σε κάθε θάλαμο τοποθετήθηκαν 10 συσκευασίες φιλέτων καπνιστής πέστροφας.

Οι θάλαμοι αποθήκευσης ήταν το μοντέλο Sanyo MIR 153 (Sanyo electric, Japan).

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα από κάθε θερμοκρασία στα οποία γινόταν η ακόλουθη επεξεργασία:

- ✓ Μέτρηση της απόκρισης των τοποθετημένων στα δείγματα ΤΤΙ (μόνο για τις μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης)

- ✓ Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου
- ✓ Μέτρηση pH
- ✓ Μέτρηση χρώματος
- ✓ Ανάλυση υφής
- ✓ Οργανοληπτικός έλεγχος

4.3.1.1 Μέτρηση της απόκρισης των προσκολλημένων στα δείγματα ΤΤΙ

Πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση κατάλληλων για το υπό εξέταση τρόφιμο ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP, οι οποίοι τοποθετήθηκαν πάνω στη συσκευασία των δειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο θάλαμο μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακών συνθηκών ψύξης. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, γινόταν μέτρηση της μεταβολής του χρώματος των προσκολλημένων στη συσκευασία ΤΤΙ με τη χρήση χρωματομέτρου (X-rite, Michigan, USA). Ύστερα από επεξεργασία των παραμέτρων του χρώματος εξήχθησαν οι συναρτήσεις απόκρισης των ΤΤΙ. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται δείγμα καπνιστού φιλέτου ιριδιζουσας πέστροφας συσκευασμένο υπό κενό μετά την τοποθέτηση των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP.

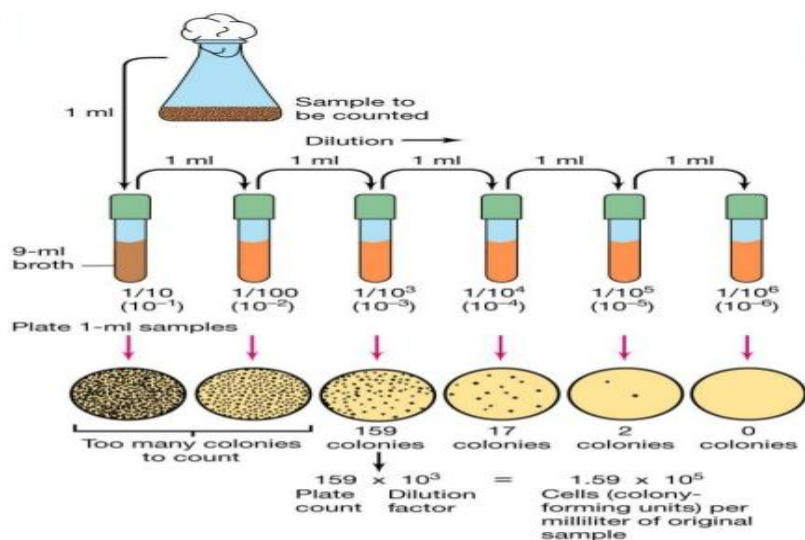


Εικόνα 4.10- Συσκευασία φιλέτου καπνιστής πέστροφας συσκευασμένου υπό κενό μετά την τοποθέτηση ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP

4.3.1.2 Μέτρηση μικροβιακού φορτίου

Για τον υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα εφαρμόστηκε η μέθοδος της επιφανειακής ανάπτυξης σε τρυβλία. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο ότι από ένα μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται μία και μόνο αποικία. Με αυτόν τον τρόπο, η μέτρηση αποικιών δίνει τον αριθμό των μικροοργανισμών από όπου προήλθαν. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, 10 g ψαριού φέρονται σε αποστειρωμένη σακούλα και προστίθενται σε αυτό 90 g αποστειρωμένου όρου Ringer. Το μίγμα ομογενοποιείται για 1 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη χρήση κατάλληλου ομογενοποιητή Stomacher (Bagmixer®, Interscience, France). Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL φέρονται 9 mL ορού Ringer. Από το ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται 1 mL που τοποθετείται σε ένα σωλήνα και το

μίγμα αναδεύεται. Από αυτόν λαμβάνεται 1 mL και φέρεται στον επόμενο σωλήνα. Κάθε αραιώση είναι υποδεκαπλάσια της προηγούμενης. Η τεχνική των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων επαναλαμβάνεται έως ότου επιτευχθούν οι επιθυμητές αραιώσεις. Σημειώνεται ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών στο δείγμα, τόσο περισσότερες αραιώσεις απαιτούνται.



Εικόνα 4.11-Τεχνική των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και επιφανειακής ανάπτυξης σε τρυβλία για τη μέτρηση του μικροβιακού φορτίου

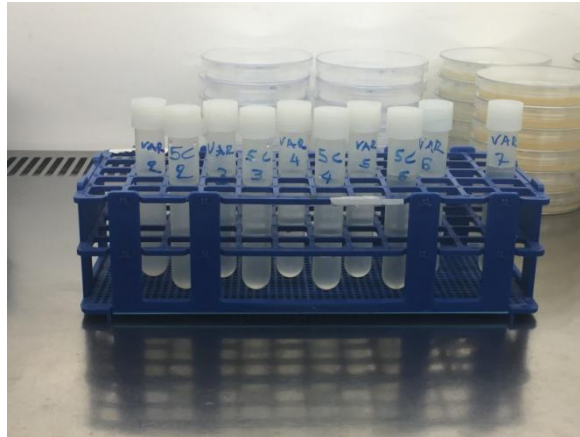
Οι μικροοργανισμοί που μετρήθηκαν ήταν η **ολική μικροβιακή χλωρίδα**, το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* και τα **γαλακτικά βακτήρια**(LAB).

Για τη μέτρηση της **ολικής μικροβιακής χλωρίδας**, χρησιμοποιήθηκε το μη επιλεκτικό υπόστρωμα **Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Germany)**. Το θρεπτικό υλικό διανέμεται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Αρκετή θεωρείται η ποσότητα που αρκεί για να καλύψει τον πυθμένα του κάθε τρυβλίου. Λαμβάνεται 0.1 mL δείγματος και φέρεται στην επιφάνεια του υποστρώματος και ακολουθεί επάλειψη με τη βοήθεια σπιλεό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλες τις αραιώσεις και πραγματοποιούνται διπλά δείγματα για κάθε αραιώση. Τα τρυβλία αφήνονται να επώασουν για 3 ημέρες στους 25°C.

Για τη μέτρηση του *Brochothrix thermosphacta* χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα **Streptomycin – Thallous Acetate - Actidione (STAA, Merck, Darmstadt, Germany)**. Η διαδικασία είναι αντίστοιχη με αυτήν που αφορά τον υπολογισμό της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και η επώαση απαιτεί 2 ημέρες στους 25°C.

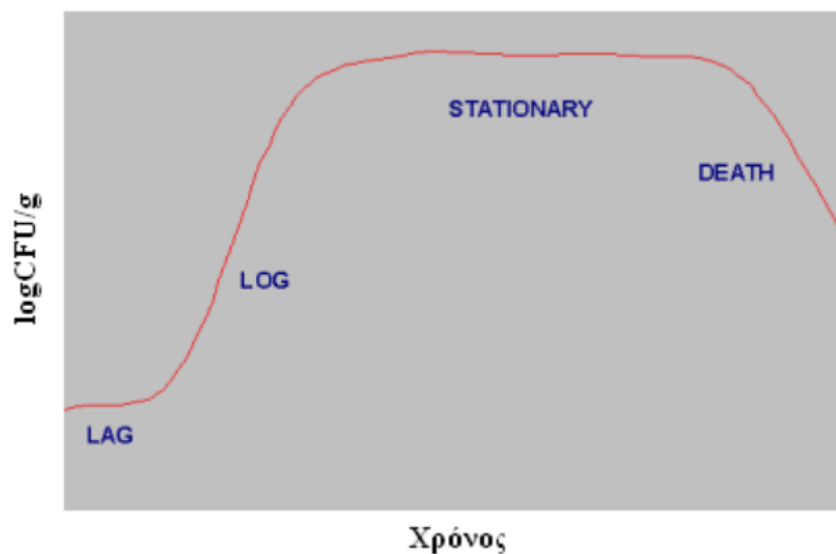
Τέλος, για τη μέτρηση των **γαλακτικών βακτηρίων** χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα **de Mann Rogosa and Sharpe's (MRS, Merck, Darmstadt, Germany)**. Τα γαλακτικά βακτήρια είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Από το κάθε

Δείγμα λαμβάνεται 1 mL και τοποθετείται σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Για το κάθε δείγμα πραγματοποιούνται διπλά τρυβλία. Το υπόστρωμα διανέμεται στα τρυβλία ώσπου να καλυφθεί η επιφάνεια του τρυβλίου, αλλά η στρώση θα πρέπει να είναι λεπτή. Τα δείγματα ανακινούνται προσεκτικά και το υπόστρωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί. Ακολουθεί μια δεύτερη στρώση υποστρώματος τόσης ποσότητας, ώστε να καλύψει την επιφάνεια και παράλληλα η στρώση να είναι λεπτή. Η διαδικασία της δεύτερης επίστρωσης εξασφαλίζει αναερόβιες συνθήκες. Η επώαση απαιτεί 5 ημέρες στους 25°C.

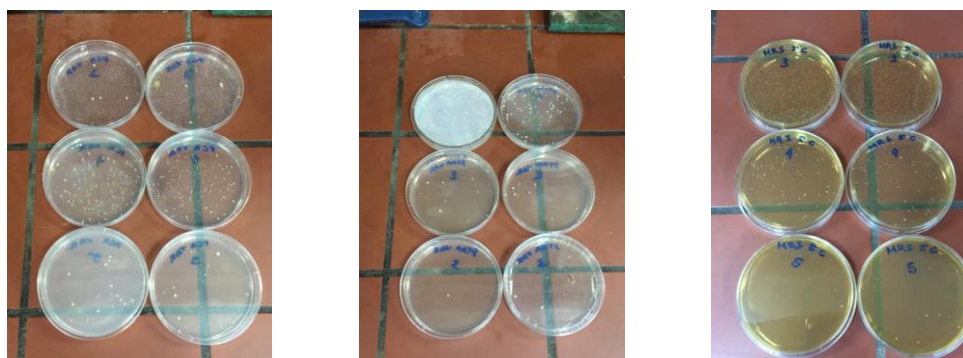


Εικόνα 4.12-Φιαλίδια με αραιώσεις

Μετά την επώαση των τρυβλίων, καταμετρούνται οι αναπτυσσόμενες αποικίες. Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιείται σε μια αραιώση, τέτοια ώστε να υπάρχουν 50 – 200 αποικίες ανά τρυβλίο. Λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση του δείγματος, υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών που περιλαμβάνει 1 g δείγματος, πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των αποικιών με το αντίστροφο της αραιώσης (Koutsoumanis *et al.*, 2002). Ο μετρούμενος αριθμός μικροοργανισμών εκφράζεται σε CFU/g αλλά για τη διευκόλυνση επεξεργασίας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο δεκαδικός λογάριθμος και τα αποτελέσματα των μετρήσεων που λαμβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, αναπαρίστανται σε μορφή διαγράμματος, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.13, το οποίο ακολουθεί την τυπική καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών.



Εικόνα 4.13-Τυπική καμπύλη ανάπτυξης μικροβίων



Εικόνα 4.14-Μέτρηση αποικιών (α) ολικής μικροβιακής χλωρίδας, (β) *B. thermosphacta* και (γ) γαλακτικών βακτηρίων μετά από επώαση

4.3.1.3 Μέτρηση pH

Η μέτρηση των τιμών του pH πραγματοποιήθηκε με χρήση ηλεκτρονικού pH - μέτρου (pH-meter 338, AMEL Instruments, Milan, Italy) στο ομογενοποιημένο διάλυμα δείγματος – ορού Ringer 1/10 (σακούλα) κατόπιν της μικροβιολογικής ανάλυσης.



Εικόνα 4.15 -Πεχάμετρο AMEL Instruments 338

4.3.1.4 Μέτρηση χρώματος

Η ανάλυση του χρώματος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του χρωματόμετρου Minolta CR – 200 (Minolta Company, Chuo-Ku, Osaka, Japan) με χρήση των παραμέτρων χρώματος CIE (Commission International de l'Eclairage) Lab (CIE 1978). Το χρωματόμετρο φέρει στο άκρο του οπή διαμέτρου 8 mm. Πριν πραγματοποιηθεί μέτρηση προηγείται βαθμονόμηση με χρήση λευκής πλάκας (Calibration plate CR-200, L=97.5, a=-0.31, b=-3.83). Το χρώμα αναλύθηκε στις συντεταγμένες L, a και b. Η παράμετρος L εκφράζει την φωτεινότητα (λαμπρότητα) του χρώματος, η παράμετρος a εκφράζει την ένταση του κόκκινου χρώματος (redness) ή διαφορετικά ερυθρότητα και η παράμετρος b εκφράζει την ένταση του κίτρινου χρώματος (yellowness).

Κάθε δείγμα φιλέτου πέστροφας μετρήθηκε σε δύο διαφορετικές περιοχές(ράχη και ουρά) έτσι ώστε οι τιμές που λαμβάνονται να είναι αντιπροσωπευτικές.

Η μεταβολή χρώματος των δειγμάτων υπολογίστηκε μέσω της σχέσης

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (4.3)$$

όπου L_0 , a_0 , b_0 οι τιμές αναφοράς που αντιστοιχούν στα δείγματα φιλέτων καπνιστής πέστροφας κατά την έναρξη της αποθήκευσής τους (χρόνος 0) στις διάφορες θερμοκρασίες.



Εικόνα 4.16-Χρωματόμετρο Minolta CR-200(Minolta Company, Chuo-Ku, Osaka, Japan)

4.3.1.5 Ανάλυση υφής

Η ανάλυση υφής των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αναλυτή υφής(Texture Analyzer, TA-XT2i, Stable Micro Systems, Godalming Surrey, UK), ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Οι μετρήσεις διεξάχθηκαν σε δύο διαφορετικά σημεία κάθε φιλέτου πέστροφας(ράχη και ούρα). Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε στον αναλυτή υφής και υπέστη συμπίεση, η οποία έλαβε χώρα σε δύο κύκλους συμπίεσης, προσομοιώνοντας τη διαδικασία της μάσησης. Κατά τη διάρκεια της συμπίεσης, ο αναλυτής υφής κατέγραφε συνεχώς την τιμή της δύναμης που ασκούνταν στο δείγμα κι έτσι προέκυπτε το διάγραμμα της δύναμης ως συνάρτηση του χρόνου. Για τη συμπίεση χρησιμοποιήθηκε κυλινδρικό έμβολο διαμέτρου 2cm, ενώ οι παράμετροι του αναλυτή υφής που καθορίστηκαν εικονίζονται στο ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 4.7-Τιμές παραμέτρων της μεθόδου ανάλυσης υφής στα δείγματα καπνιστής πέστροφας

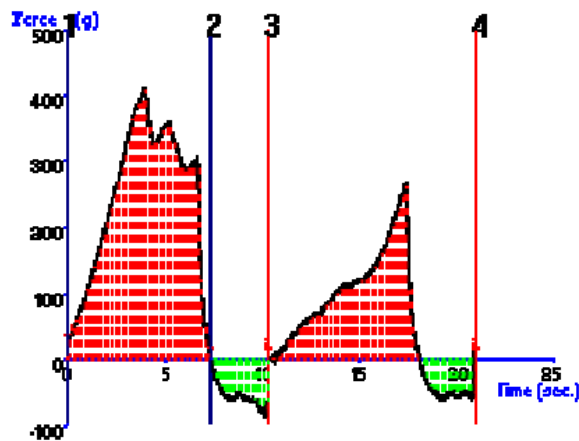
Παράμετρος	Τιμή
Ταχύτητα καθόδου του εμβόλου πριν συναντήσει το δείγμα	0,1cm/s
Ταχύτητα καθόδου του εμβόλου κατά τη συμπίεση του δείγματος	0,05cm/s
Ταχύτητα ανόδου του εμβόλου μετά το τέλος των 2 κύκλων συμπίεσης	0,5cm/s
Βάθος διείσδυσης του εμβόλου	5mm

Με τη βοήθεια του διαγράμματος δύναμης-χρόνου που προκύπτει για το κάθε δείγμα από κάθε θερμοκρασία προσδιορίστηκαν η σκληρότητα, η προσκολλησιμότητα, η συνεκτικότητα και η ελαστικότητα του δείγματος. Η σκληρότητα είναι η μέγιστη δύναμη(μέγιστηκορυφή) που καταγράφεται κατά τον

πρώτο κύκλο συμπίεσης του δείγματος. Το εμβαδόν που τυχόν μπορεί να υπάρχει στην αρνητική μεριά του διαγράμματος ορίζεται ως προσκολλησιμότητα. Ο λόγος του έργου που καταναλώθηκε κατά τον δεύτερο κύκλο συμπίεσης προς το έργο του πρώτου κύκλου, δηλαδή ο λόγος του εμβαδού της καμπύλης του δεύτερου κύκλου προς το εμβαδόν του πρώτου κύκλου αποτελεί την συνεκτικότητα. Τέλος, η ελαστικότητα είναι ο λόγος της μέγιστης δύναμης του δεύτερου κύκλου προς τη μέγιστη δύναμη του πρώτου κύκλου.



Εικόνα 4.17-Αναλυτής υφής TA-XT2i Texture Analyzer



Εικόνα 4.18-Διάγραμμα δύναμης-χρόνου κατά την ανάλυση υφής δείγματος

4.3.1.6 Οργανοληπτικός έλεγχος

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αποτελούν βασικό κριτήριο ποιότητας, γιατί καθορίζουν και το βαθμό αρεσκείας και αποδοχής των τροφίμων από τους καταναλωτές. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τα οποία αξιολογούνται με τις αισθήσεις είναι τα ακόλουθα:

- Η εμφάνιση των προϊόντων τροφίμων που χαρακτηρίζεται από παράγοντες όπως το χρώμα, τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά, το μέγεθος, το σχήμα και η παρουσία ή μη ελαττωμάτων.
- Η υφή, που αποτελεί το άθροισμα των ιδιοτήτων οι οποίες προκύπτουν από τα δομικά στοιχεία (μοριακά, μικροσκοπικά, μακροσκοπικά) και με τον τρόπο τον οποίο αυτά επιδρούν στα αισθητήρια όργανα.
- Η γεύση και το άρωμα, που είναι χαρακτηριστικά τα οποία αξιολογεί ο καταναλωτής με τα αισθητήρια γεύσης και οσμής, καθώς και με τις άλλες αισθήσεις, όπως η αφή (κρύο - ζεστό).

Η οργανοληπτική εξέταση των δειγμάτων πραγματοποιείται για τη βαθμολόγηση των οργανοληπτικών παραμέτρων και τον καθορισμό της αποδοχής του προϊόντος. Μία ομάδα εκπαιδευμένων δοκιμαστών (6 άτομα) εξετάζει τα δείγματα ως προς την

αποδεκτότητά τους και τα βαθμολογεί ως προς την εμφάνιση, τη γεύση, τη μετάγευση, το άρωμα, την υφή και τη γενική εντύπωση. Για τη βαθμολόγηση χρησιμοποιείται κλίμακα από το 1 έως το 9, με 9 την υψηλότερη ποιότητα και 1 τη χαμηλότερη (9: εξαιρετικής ποιότητας, 1: εμφανείς αλλοιώσεις). Όλες οι ερωτήσεις αφορούν την αρέσκεια των δοκιμαστών ως προς κάθε παράμετρο. Ως όριο αποδοχής ορίζεται ο βαθμός 6. Στο Παράρτημα δίνεται το έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό.

Κεφάλαιο 5

Μελέτη απόκρισης των ΤΤΙ

5.1 Βήματα επεξεργασίας της απόκρισης των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών

Στις παρακάτω υποενότητες περιγράφονται τα βήματα της στατιστικής επεξεργασίας που ακολουθήθηκε για τις πειραματικές μετρήσεις των ενζυμικών και μικροβιακών ΤΤΙ.

5.1.1 Καθορισμός της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ των ενζυμικών ΤΤΙ

Στα ενζυμικά ΤΤΙ, η αλλαγή χρώματος εκφράζεται ως:

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

όπου a, b είναι οι συντεταγμένες του χρώματος που ελήφθησαν με το χρωματόμετρο X-rite.

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 οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης των ΤΤΙ (το k_1 αναφέρεται στη λανθάνουσα φάση ενώ το k_2 στην εκθετική φάση).

5.1.2 Καθορισμός της συνάρτησης απόκρισης των μικροβιακών ΤΤΙ

Στα μικροβιακά ΤΤΙ, η αλλαγή χρώματος εκφράζεται ως:

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (5.3)$$

όπου L, a, b είναι οι συντεταγμένες του χρώματος που ελήφθησαν με το χρωματόμετρο X-rite και L_0, a_0, b_0 είναι οι τιμές των L, a, b τη χρονική στιγμή της ενεργοποίησης ($t_0=0$).

Η εξίσωση (5.3) δείχνει την απόκριση του δείκτη, η οποία όταν σχεδιαστεί σαν συνάρτηση του χρόνου έχει σιγμοειδή μορφή, όπως και στα ενζυμικά ΤΤΙ. Το κινητικό αυτό μοντέλο είναι τριών παραμέτρων και αποδείχτηκε ότι περιγράφει

καλύτερα την κινητική των μικροβιακών ΤΤΙ. Στην περίπτωση αυτή η *συνάρτηση απόκρισης* είναι:

$$\Delta E = \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{k_1 - t}{k_2}\right)} \quad (5.4)$$

όπου, το a δείχνει το σημείο όπου η σιγμοειδής καμπύλη εμφανίζει πλατό και k_1, k_2 οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης των ΤΤΙ (το k_1 αναφέρεται στη λανθάνουσα φάση ενώ το k_2 στην εκθετική φάση).

5.1.3 Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών k_1 και E_A των ΤΤΙ

❖ Κινητικά χαρακτηριστικά 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, οπότε προέκυψαν οι σταθερές k_1 και k_2 για κάθε θερμοκρασία. Για τον προσδιορισμό της θερμοκρασιακής εξάρτησης της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

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

$$X = F(X_c) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1ref} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2ref} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (5.5)$$

όπου, T_{ref} η θερμοκρασία αναφοράς (σχετίζεται με τη μέση θερμοκρασία συντήρησης των ΤΤΙ που μελετώνται)

Τέλος, με τη βοήθεια του προγράμματος Systat 10.2 και με χρήση της εξίσωσης (5.5) προκύπτουν η ενέργεια ενεργοποίησης E_A και οι δύο σταθερές του ρυθμού απόκρισης, k_{1ref} και k_{2ref} .

❖ Κινητικά χαρακτηριστικά των μικροβιακών ΤΤΙ

Για τον προσδιορισμό των κινητικών χαρακτηριστικών των μικροβιακών ΤΤΙ πραγματοποιήθηκε κατάλληλη επεξεργασία της σιγμοειδούς καμπύλης της συνάρτησης απόκρισης ΔE στο υπολογιστικό πρόγραμμα SigmaPlot, οπότε προέκυψαν οι παράμετροι a , k_1 και k_2 για κάθε θερμοκρασία. Για τον προσδιορισμό της θερμοκρασιακής εξάρτησης της απόκρισης των μικροβιακών ΤΤΙ ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Με εφαρμογή Arrhenius, η εξίσωση (5.4) γίνεται της μορφής:

$$\Delta E = \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{k_{1\text{ref}} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right] - t}{k_{2\text{ref}} \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right]}\right)} \quad (5.6)$$

όπου, T_{ref} είναι μια θερμοκρασία αναφοράς (σχετίζεται με τη μέση θερμοκρασία συντήρησης των ΤΤΙ που μελετώνται)

Τέλος, με τη βοήθεια του προγράμματος Systat 10.2 και με χρήση της εξίσωσης (5.6) προκύπτουν η ενέργεια ενεργοποίησης E_A , η παράμετρος a και οι δύο σταθερές του ρυθμού απόκρισης, $k_{1\text{ref}}$ και $k_{2\text{ref}}$.

5.1.4 Έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων

Ο έλεγχος της αξιοπιστίας του κινητικού μοντέλου πραγματοποιήθηκε μέσω της επεξεργασίας των μετρήσεων του πειράματος εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ (Variable Temperature Conditions), προσομοιάζοντας κατά κάποιο τρόπο τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης επιλέχθηκε το παρακάτω θερμοκρασιακό προφίλ:

- Διατήρηση των δεικτών σε θερμοκρασία 5°C για 5 ώρες.
- Διατήρηση των δεικτών σε θερμοκρασία 8°C για 5 ώρες.
- Διατήρηση των δεικτών σε θερμοκρασία 10°C για 2 ώρες

Αρχικά, με βάση το παραπάνω 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 έγινε έλεγχος των κινητικών μοντέλων των διαφόρων ΤΤΙ.

5.2 Κινητική μελέτη απόκρισης των ενζυμικών TTI

Οι ενζυμικοί χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν είναι:

- LP_5U
- LP_10U
- LP_20U
- LP_50U
- LP_100U
- LP_200U
- LP_400U
- LP_600U

Αρχικά, για καθένα από τα παραπάνω TTI πραγματοποιήθηκαν ισοθερμοκρασιακά πειράματα σε θερμοκρασίες ψύξης. Από τις πειραματικές μετρήσεις του χρώματος, όπως μετρήθηκαν από το χρωματόμετρο X-rite, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα της απόκρισης του δείκτη X [ή $\text{norm}(a+b)$] συναρτήσεως του χρόνου σε κάθε μελετώμενη θερμοκρασία. Στη συνέχεια, έγινε ο προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών E_A , k_{1ref} , k_{2ref} των TTI ($T_{ref} = 4^\circ\text{C}$).

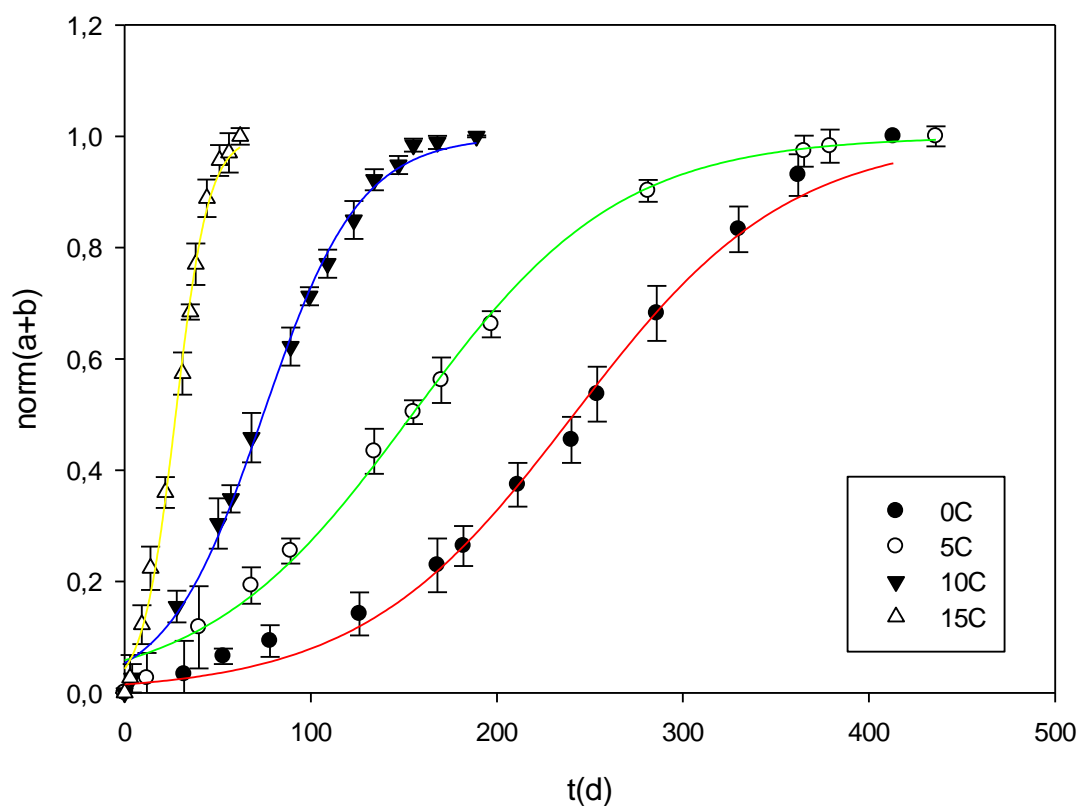
Τέλος, πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα εναλλασσόμενου χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ από τα οποία έγινε έλεγχος της αξιοπιστίας του κινητικού μοντέλου σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες.

Επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων

5.2.1 Κινητική μελέτη ενζυμικών TTI τύπου LP_5U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσεως του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

LP_5U



Σχήμα 5.3- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_5U και για θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνεται ο ρυθμός μεταβολής χρώματος των ενζυμικών δεικτών.

Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_5U

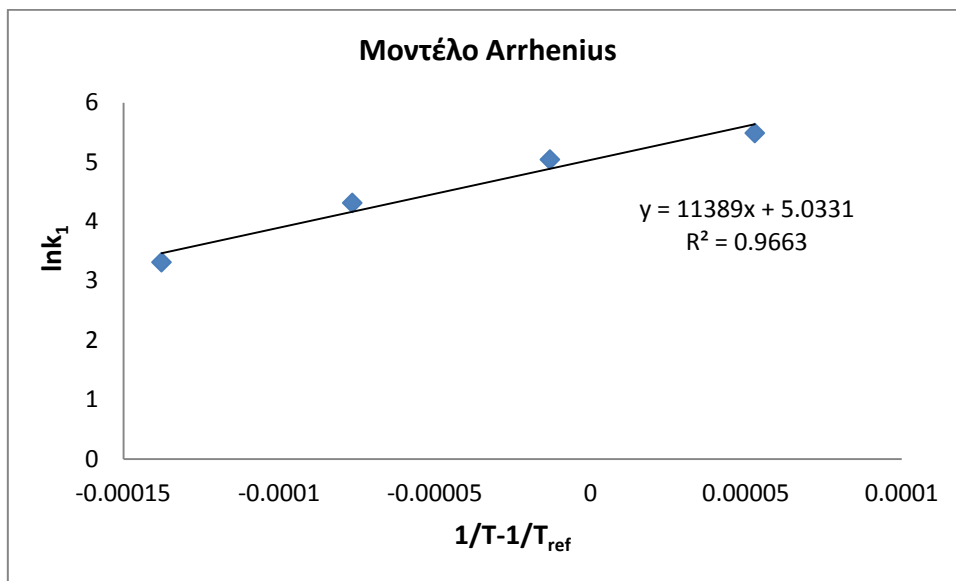
Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.8-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_5U

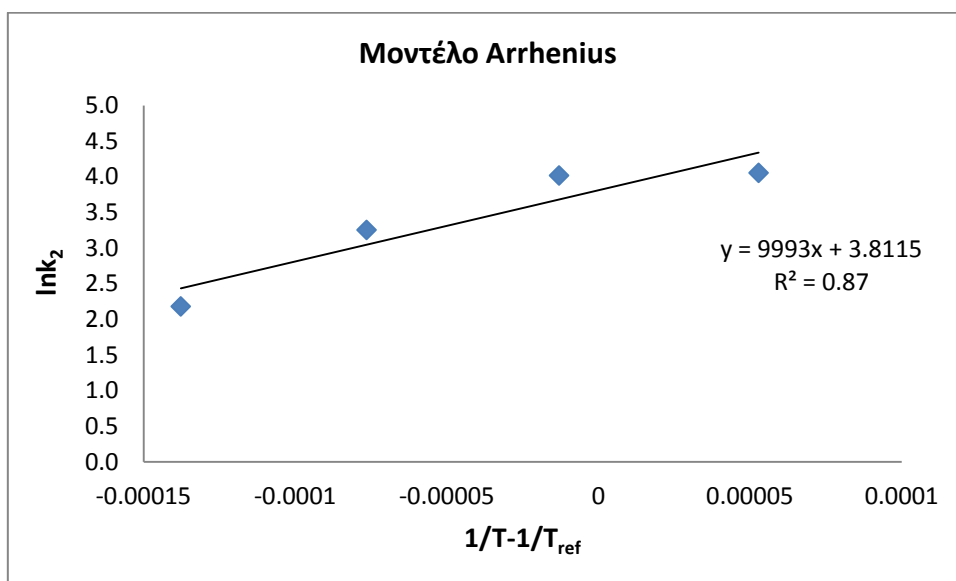
$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	241.3	57.6	0.994
5	154.5	55.5	0.996

10	74.4	25.9	0.996
15	27.4	8.9	0.993

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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.



Σχήμα 5.4-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_5U ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$)



Σχήμα 5.5-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_5U ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$)

Με τη 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 τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

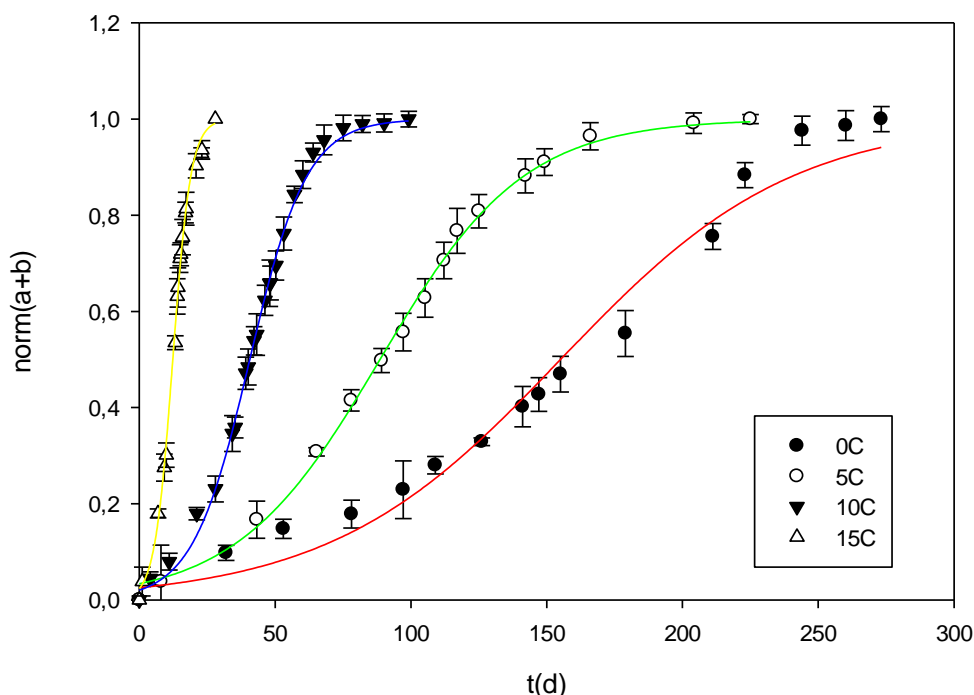
Πίνακας 5.9-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_5U ($T_{ref}=4^{\circ}C$)

E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
92.1	146.3	48.1	0.945

5.2.2 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_10U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

LP_10U



Σχήμα 5.4- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με τον χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_10U και για θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

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 5.3.

Πίνακας 5.3-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_10U

$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	155.14	42.57	0.979
5	88.61	26.38	0.998
10	40.66	10.49	0.997

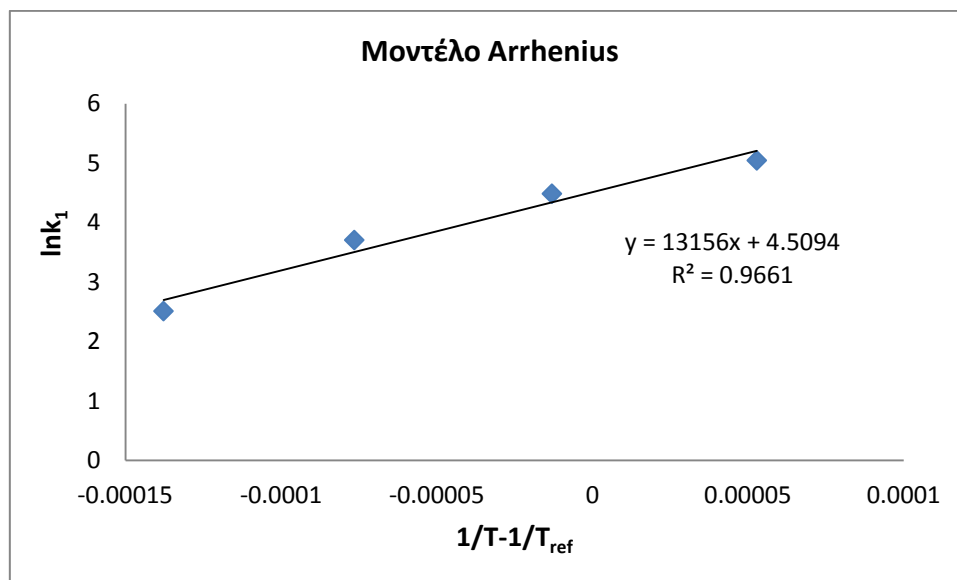
15

12.31

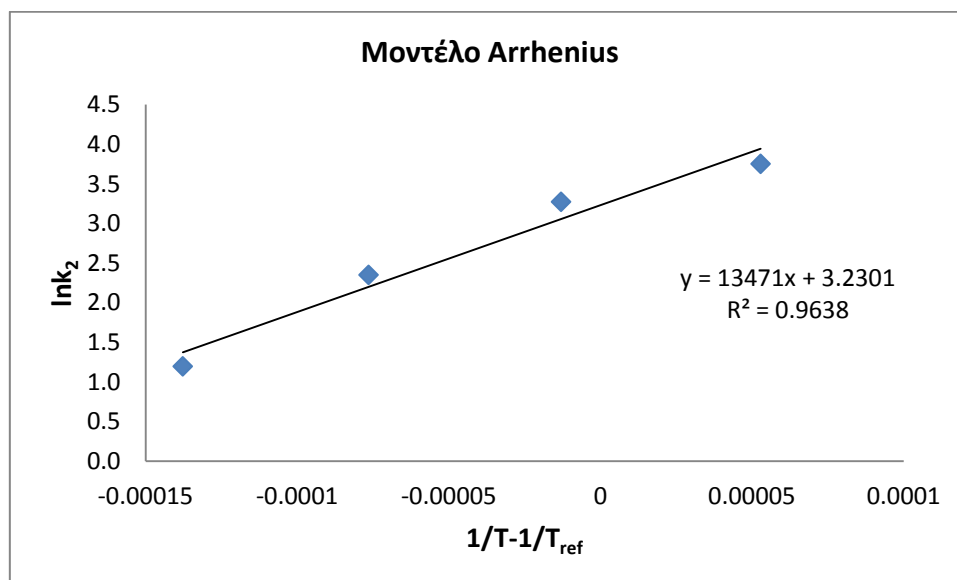
3.31

0.996

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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_10U.



Σχήμα 5.5-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_10U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)



Σχήμα 5.6-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_10U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη 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 τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

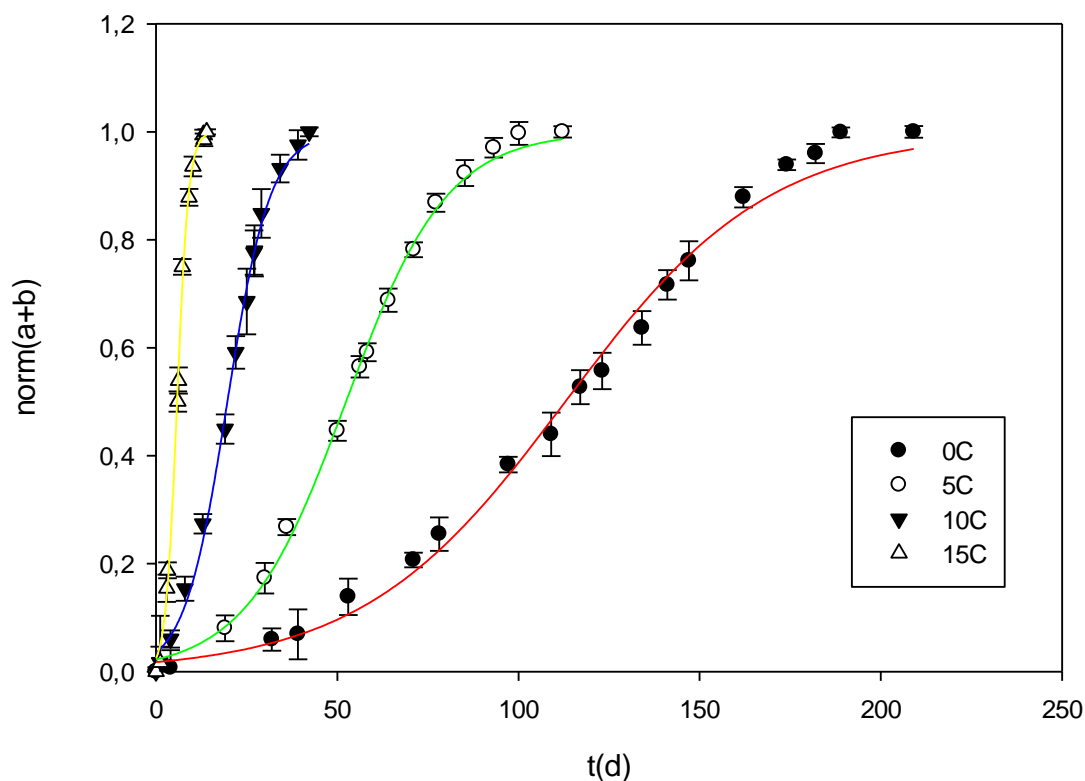
Πίνακας 5.4-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_10U ($T_{ref}=4^{\circ}C$)

E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
110.0	88.85	39.07	0.882

5.2.3 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_20U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

LP_20U



Σχήμα 5.7- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με τον χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_20U και για θερμοκρασίες 0, 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_20U

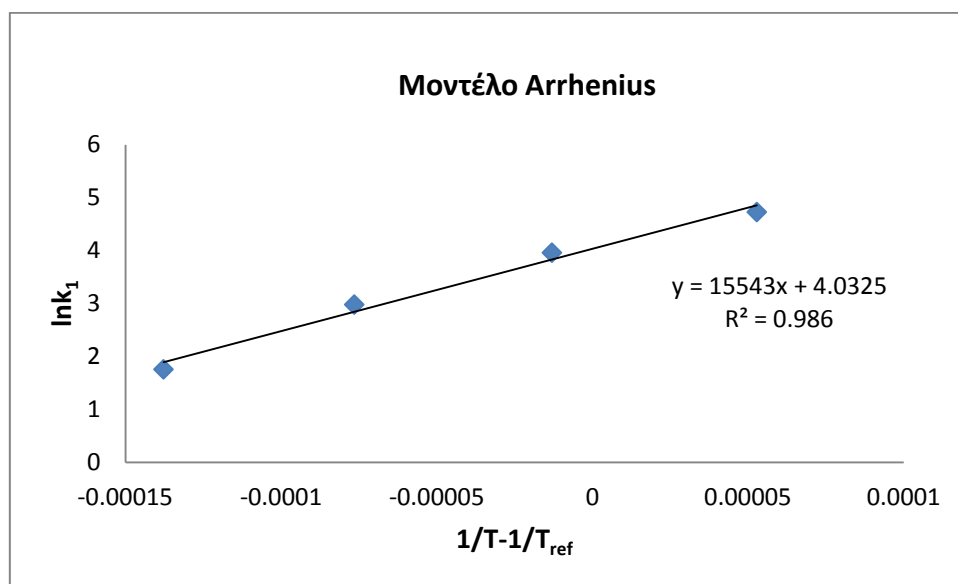
Με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5.

Πίνακας 5.5-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_20U

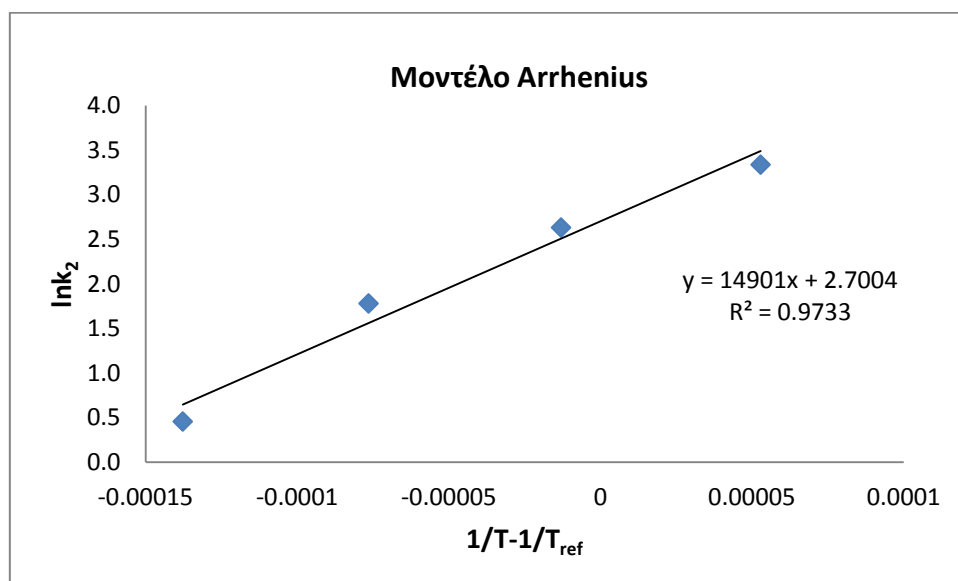
$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	112.90	28.11	0.993
5	52.39	13.89	0.998

10	19.67	5.93	0.997
15	5.79	1.58	0.997

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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_20U.



Σχήμα 5.8-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_20U ($T_{ref}=4^{\circ}C$)



Σχήμα 5.9-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_20U ($T_{ref}=4^{\circ}C$)

Με τη 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 τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

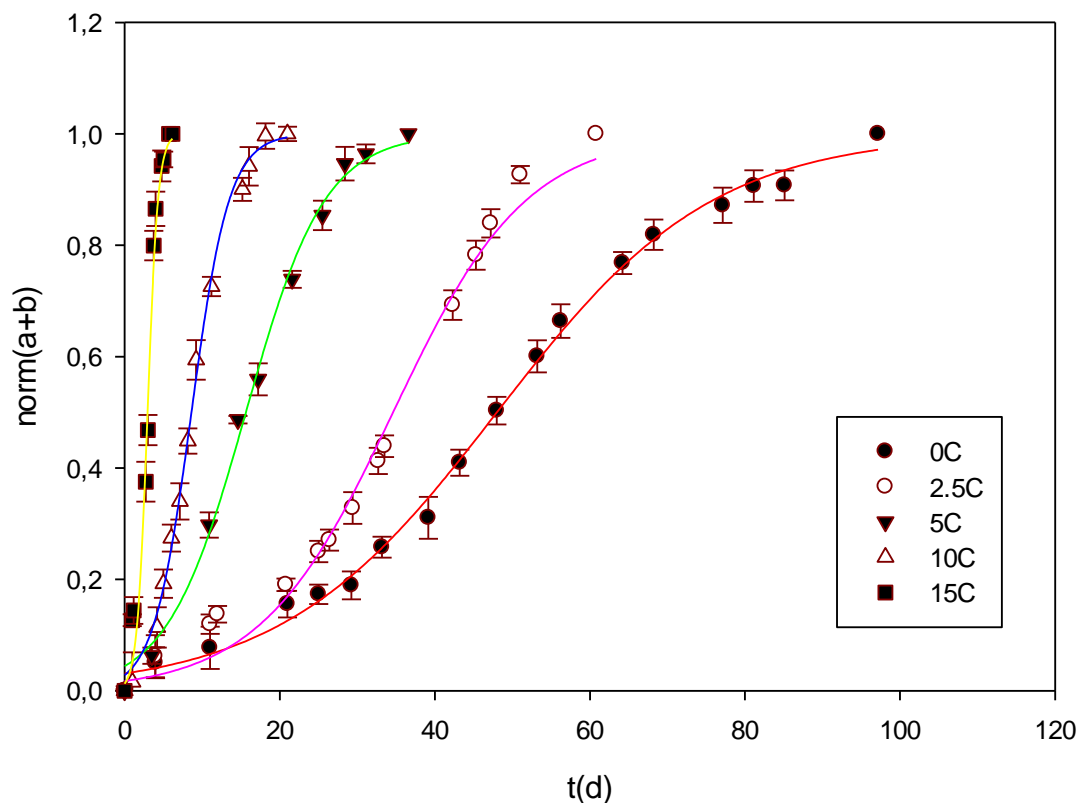
Πίνακας 5.6-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_20U ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$)

$E_A(\text{kJ/mol})$	$k_{1ref}(\text{d})$	$k_{2ref}(\text{d})$	R^2
124.6	53.80	16.28	0.951

5.2.4 Κινητική μελέτη ενζυμικών TTI τύπου LP_50U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

LP_50U



Σχήμα 5.10- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με τον χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_50U και για θερμοκρασίες 0, 2,5, 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_50U

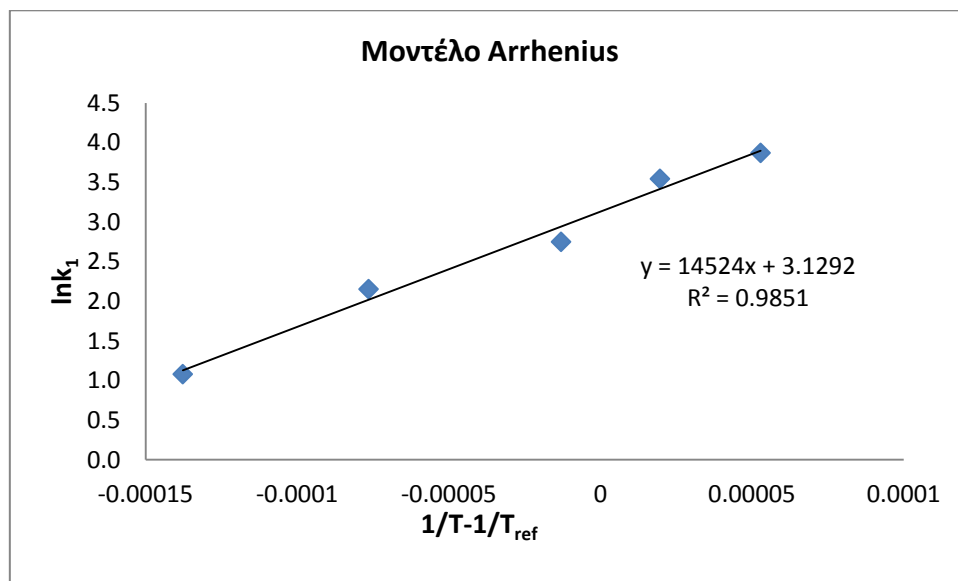
Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.7-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_50U

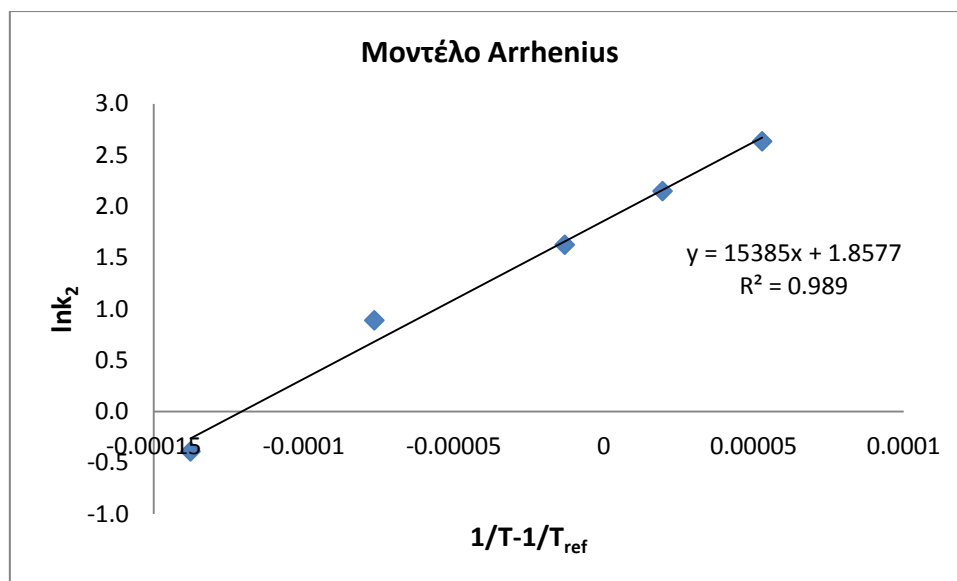
$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	48.0	13.93	0.997

2.5	34.61	8.57	0.988
5	15.64	5.08	0.995
10	8.61	2.43	0.997
15	2.95	0.68	0.987

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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_10U.



Σχήμα 5.11-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_50U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)



Σχήμα 5.12-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_50U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη 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 τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

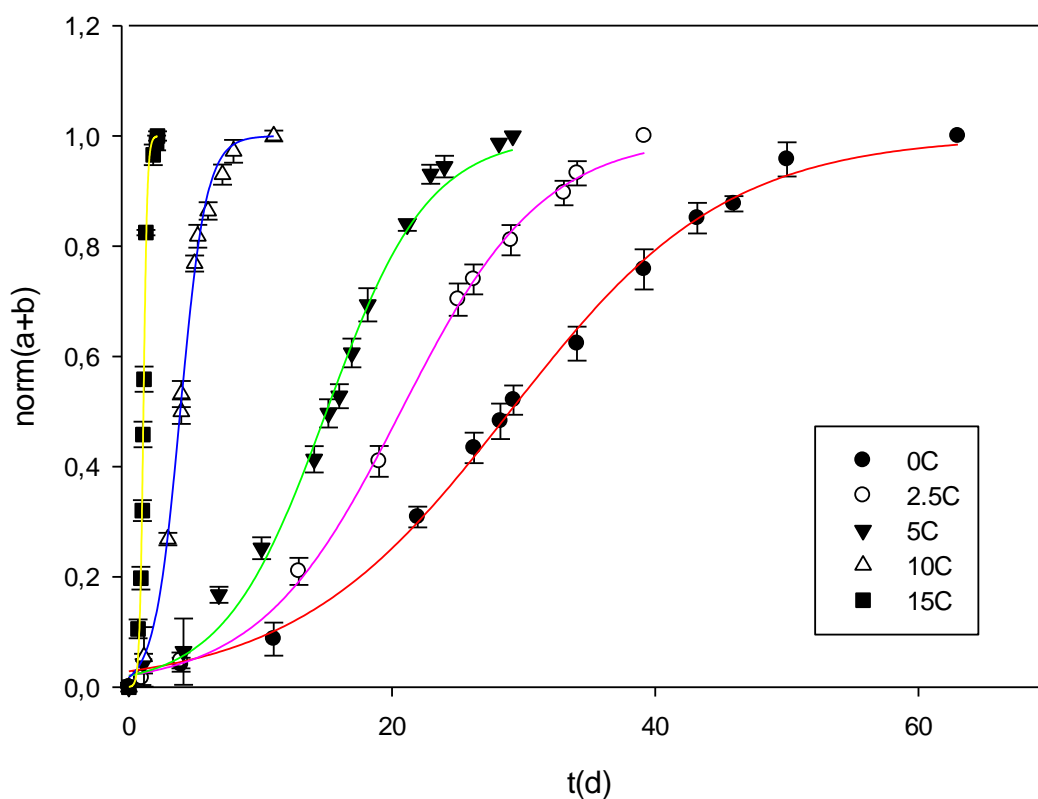
Πίνακας 5.8-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_50U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
122.6	23.19	6.45	0.960

5.2.5 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_100U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

LP_100U



Σχήμα 5.13- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με τον χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_100U και για θερμοκρασίες 0, 2,5, 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_100U

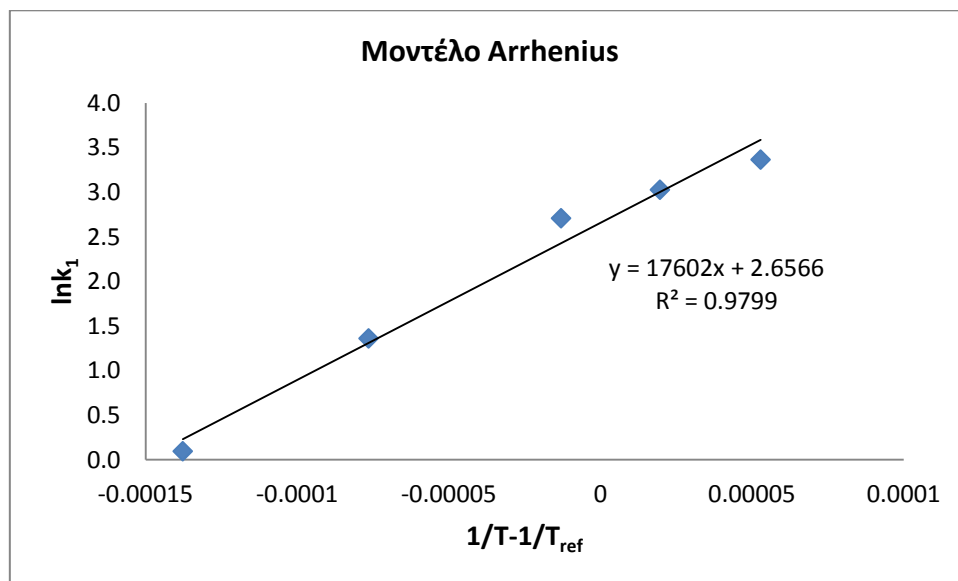
Με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot υπολογίσθηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.9.

Πίνακας 5.9-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_100U

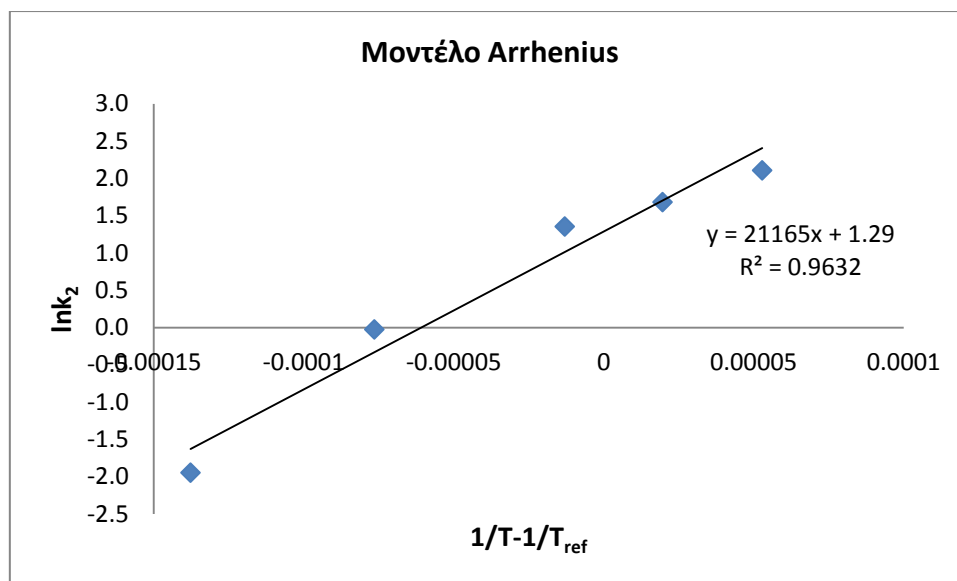
$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	28.96	8.23	0.997

2.5	20.65	5.38	0.998
5	15.00	3.88	0.994
10	3.90	0.98	0.997
15	1.10	0.14	0.995

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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_100U.



Σχήμα 5.14-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_100U ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$)



Σχήμα 5.15-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T - 1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_100U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη 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 τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

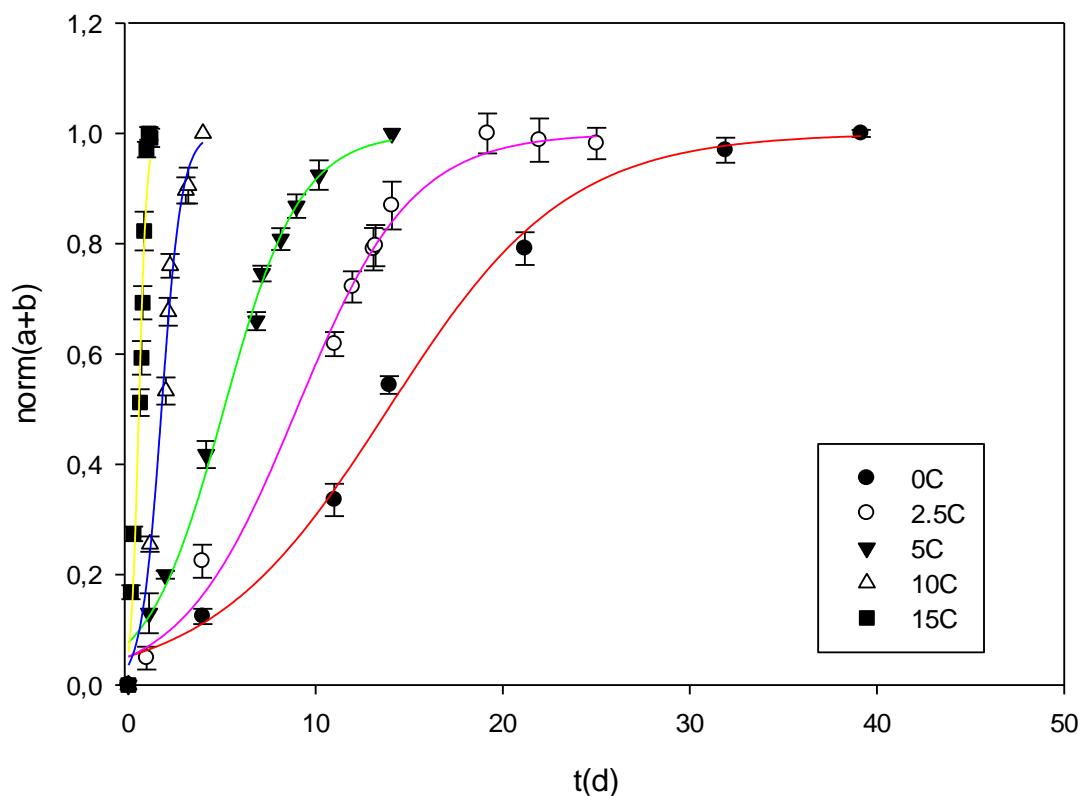
Πίνακας 5.10-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_100U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
144.9	13.73	4.46	0.900

5.2.6 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_200U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

LP_200U



Σχήμα 5.16- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με τον χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_200U και για θερμοκρασίες 0, 2,5, 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

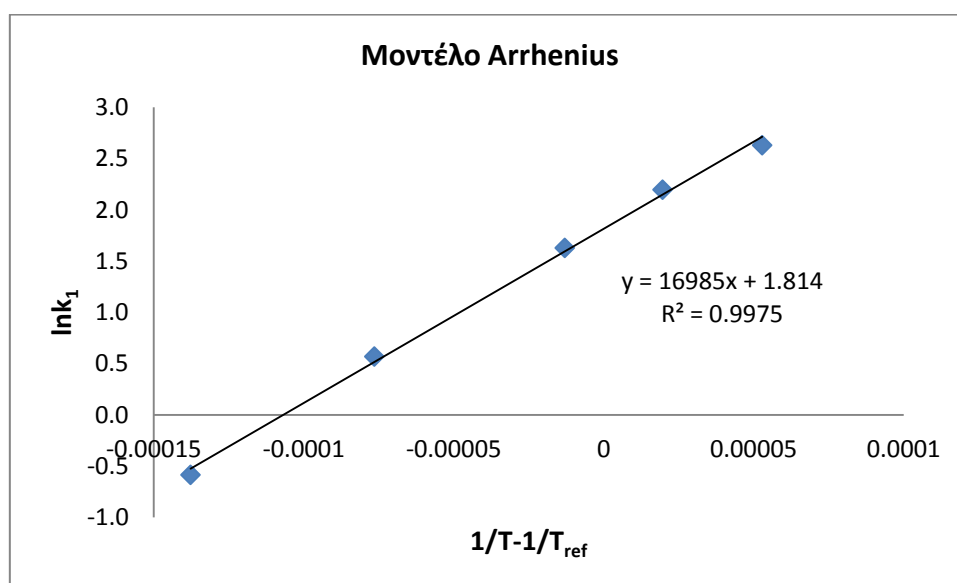
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_200U

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 5.11.

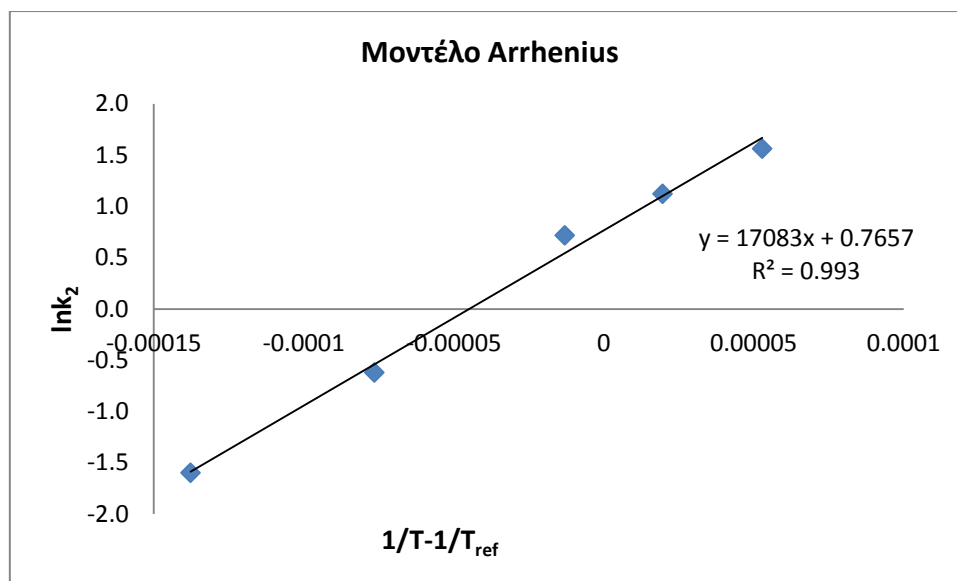
Πίνακας 5.11-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_200U

$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	13.87	4.77	0.994
2.5	8.99	3.07	0.992
5	5.10	2.05	0.992
10	1.77	0.54	0.985
15	0.56	0.20	0.968

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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_200U.



Σχήμα 5.17-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_200U ($T_{ref}=4^{\circ}C$)



Σχήμα 5.18-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T - 1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_200U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη 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 τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

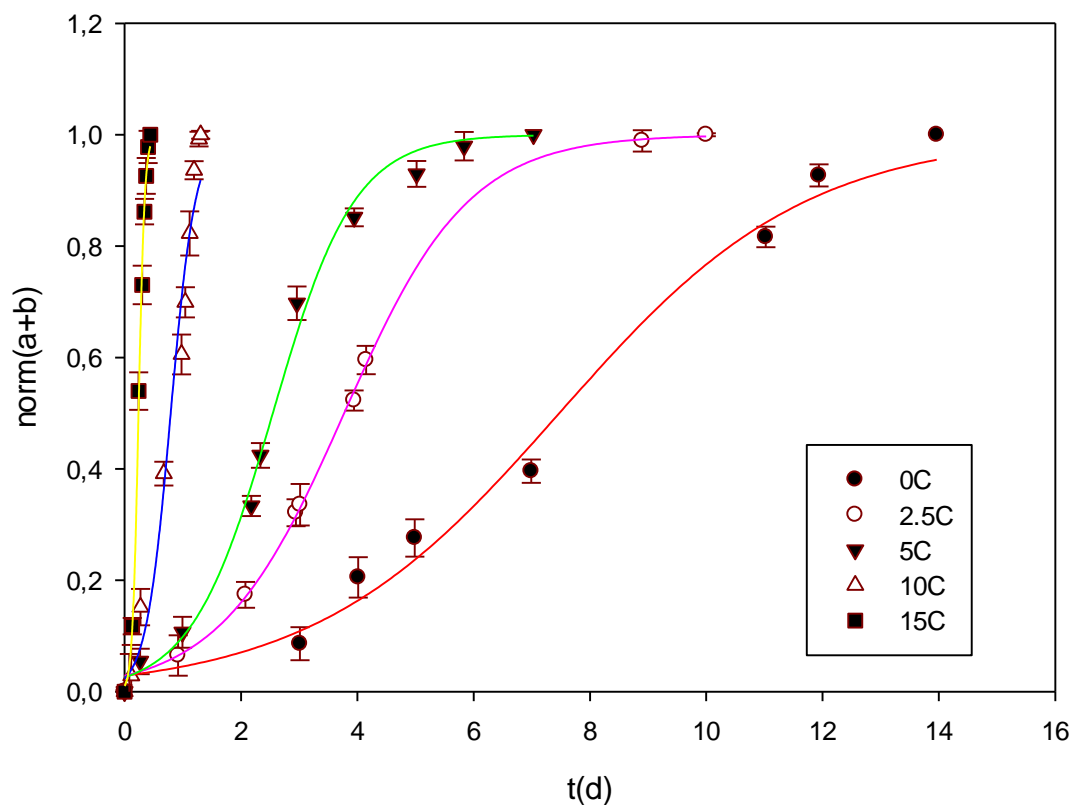
Πίνακας 5.12-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_200U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
143.5	6.19	2.27	0.981

5.2.7 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_400U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

LP_400U



Σχήμα 5.19- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με τον χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_400U και για θερμοκρασίες 0, 2,5 , 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

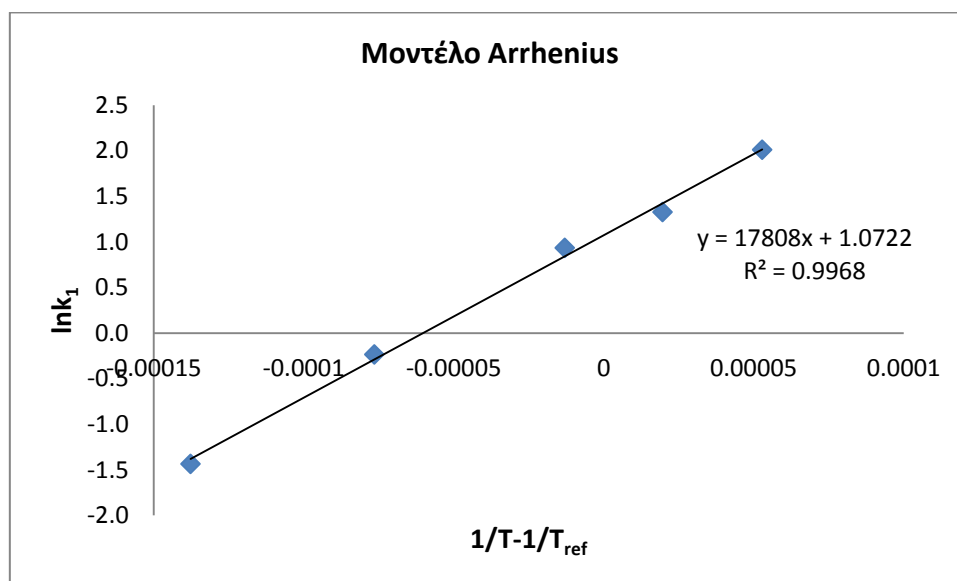
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_400U

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 5.13.

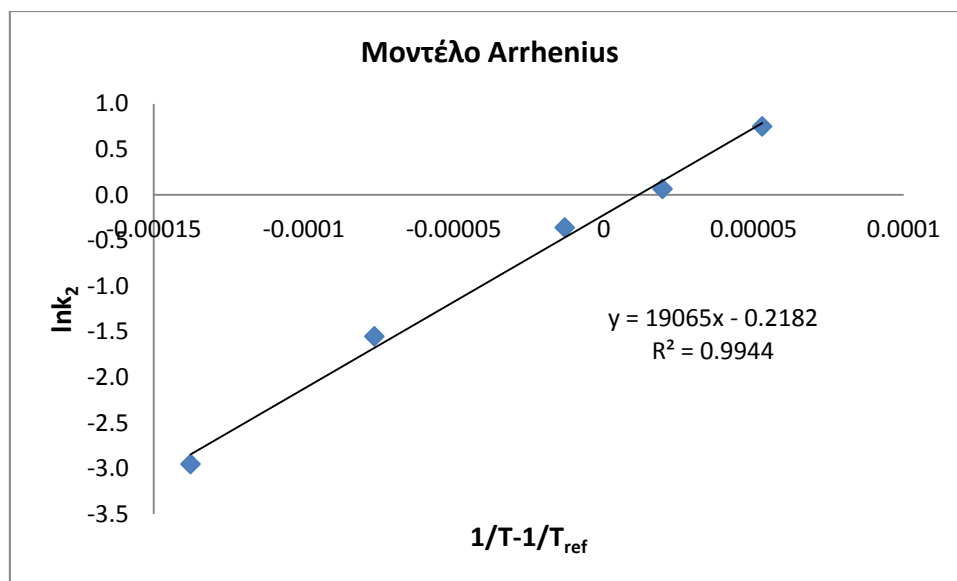
Πίνακας 5.13-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_400U

$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	7.47	2.12	0.990
2.5	3.77	1.07	0.999
5	2.55	0.70	0.995
10	0.79	0.21	0.972
15	0.24	0.05	0.996

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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_400U.



Σχήμα 5.20-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_400U ($T_{ref}=4^{\circ}C$)



Σχήμα 5.21-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T - 1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_400U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

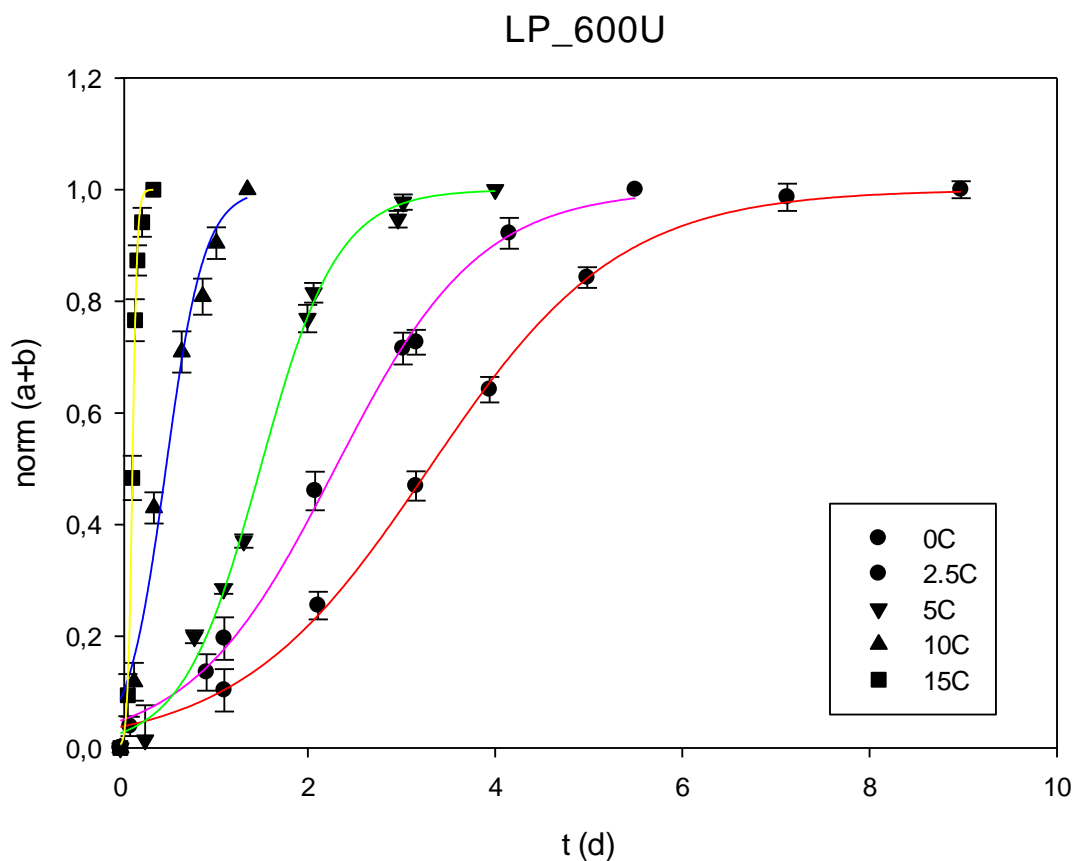
Με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_400U, που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2, και τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.14-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_400U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
150.9	2.93	0.84	0.978

5.2.8 Κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP_600U

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης $X_c = \text{norm}(a+b)$ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.



Σχήμα 5.22- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης X_c με τον χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP_600U και για θερμοκρασίες 0, 2,5 , 5, 10, 15°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

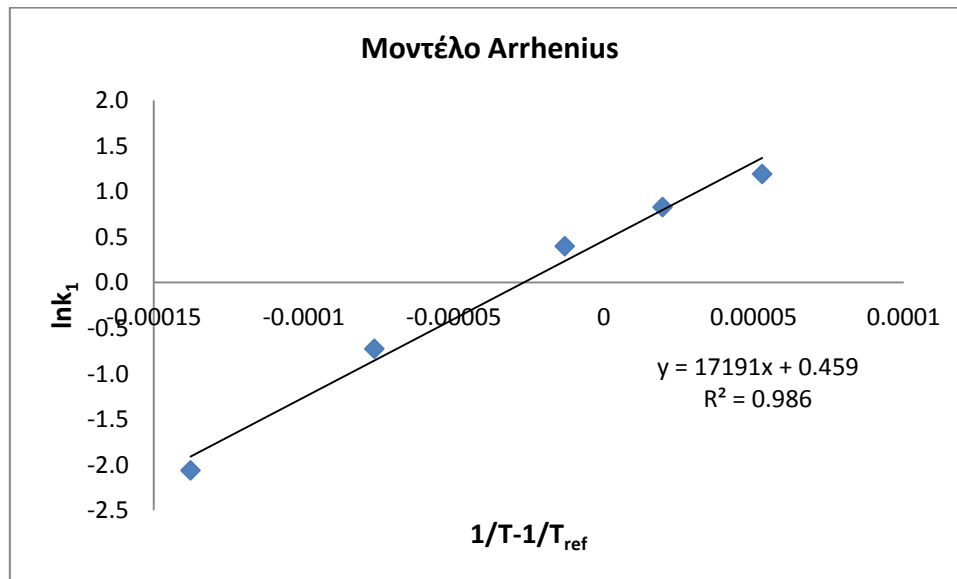
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_600U

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 5.15.

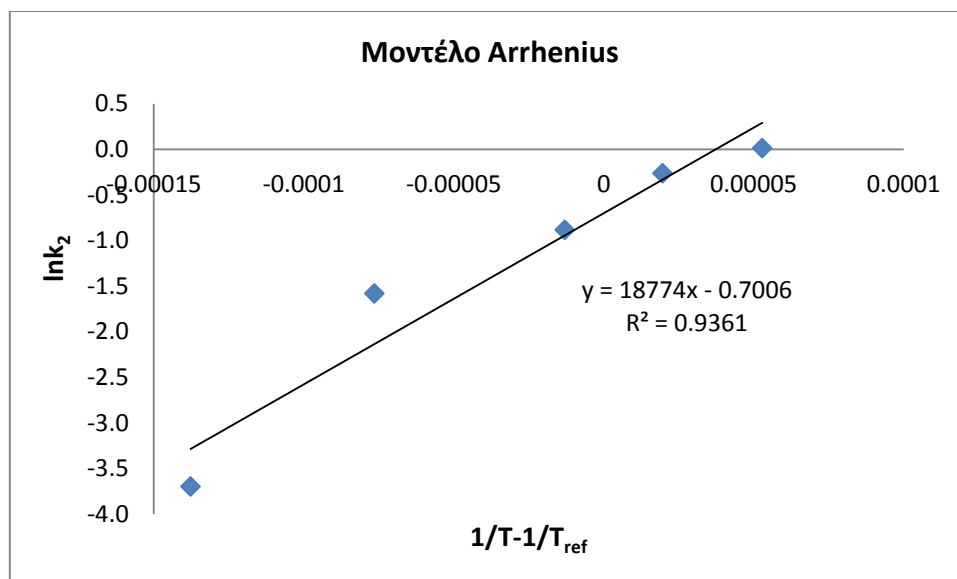
Πίνακας 5.15-Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης $F(X_c)$ του ενζυμικού δείκτη LP_600U

$T(^{\circ}C)$	$k_1(d)$	$k_2(d)$	R^2
0	3.29	1.01	0.998
2.5	2.29	0.77	0.996
5	1.49	0.41	0.996
10	0.48	0.21	0.977
15	0.13	0.03	0.997

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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_600U.



Σχήμα 5.23-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_600U ($T_{ref}=4^{\circ}C$)



Σχήμα 5.24-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T - 1/T_{ref}$ για τον δείκτη LP_600U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη 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 τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.16-Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP_600U ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

E_A (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
147.9	1.55	0.49	0.953

5.2.9 Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των μελετηθέντων ενζυμικών ΤΤΙ (Συγκεντρωτικά)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι κινητικές παράμετροι όλων των ενζυμικών ΤΤΙ που έχουν αναφερθεί.

Πίνακας 5.17-Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των ενζυμικών ΤΤΙ ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$)

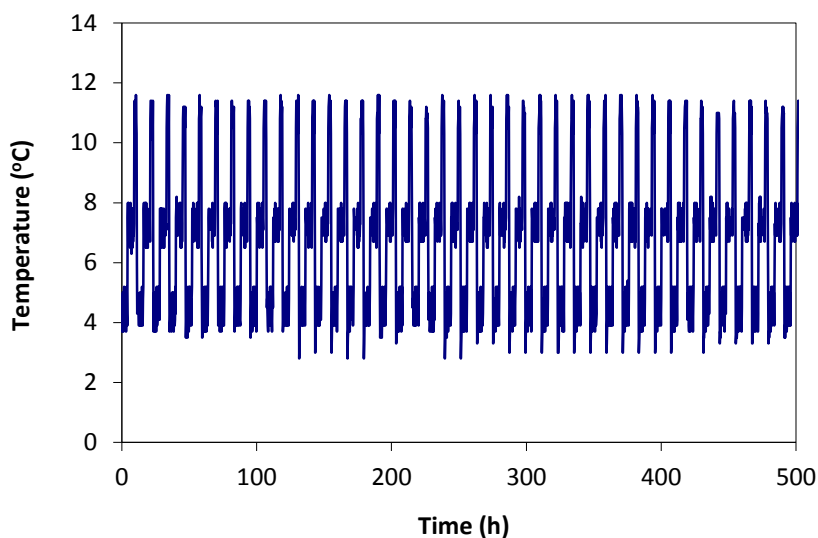
Ενζυμικός δείκτης	$E_A(\text{kJ/mol})$	$k_{1ref}(\text{d})$	$k_{2ref}(\text{d})$	R^2
LP_5U	92.1	146.32	48.11	0.945
LP_10U	110.0	88.85	39.07	0.882
LP_20U	124.6	53.80	16.28	0.951
LP_50U	122.6	23.19	6.45	0.960
LP_100U	144.9	13.73	4.46	0.900
LP_200U	143.5	6.19	2.27	0.981
LP_400U	150.9	2.93	0.84	0.978
LP_600U	147.9	1.55	0.49	0.953

Ο υψηλός συντελεστής προσαρμογής R^2 που παρατηρείται για όλα τα ΤΤΙ, αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Να σημειωθεί ότι ο ρυθμός απόκρισης του ΤΤΙ (ρυθμός μεταβολής χρώματος) εκφράζεται από τα μεγέθη $1/k_1$ και $1/k_2$, όπου k_1 και k_2 σταθερές του ρυθμού απόκρισης σε μια θερμοκρασία T . Στο σιγμοειδές διάγραμμα $\ln(m(a+b))-t$, το $1/k_1$ αναφέρεται στη φάση όπου η απόκριση του ΤΤΙ(μεταβολή χρώματος) δεν αλλάζει σημαντικά με το χρόνο, ενώ το $1/k_2$ αναφέρεται στη φάση όπου η απόκριση του ΤΤΙ μεταβάλλεται εκθετικά με το χρόνο. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση ενζύμου στο ΤΤΙ(σε Units), μειώνονται οι σταθερές k_{1ref} και k_{2ref} (αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης), το οποίο είναι αναμενόμενο αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΤΙ, τόσο πιο γρήγορα θα προχωράει η ενζυμική αντίδραση και άρα η μεταβολή χρώματος. Τέλος, η ενέργεια ενεργοποίησης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP αντιστοιχεί σε τιμή 131.4 kJ/mol (εξίσωση 5.8).

5.2.10 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ για τον δείκτη LP_20U - Έλεγχος αξιοπιστίας μαθηματικού μοντέλου

Μέσω μελέτης της απόκρισης του ενζυμικού δείκτη LP_20U σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης, έγινε προσπάθεια ελέγχου της αξιοπιστίας του κινητικού μοντέλου των ενζυμικών δεικτών τύπου LP, σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα.

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 ψύξης για τον ενζυμικό δείκτη LP_20U.



Σχήμα 5.25- Χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ (VAR) ψύξης

Με βάση το παραπάνω χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ και με τη χρήση της E_A για τον δείκτη LP_20U που βρέθηκε παραπάνω υπολογίστηκε η T_{eff} . Στη συνέχεια, γνωρίζοντας την T_{eff} και τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP_20U (E_A , k_{1ref} και k_{2ref}), υπολογίστηκαν οι προβλεπόμενες σταθερές τους ρυθμού απόκρισης k_{1pred} και k_{2pred} μέσω της σχέσης:

$$k_{pred} = k_{ref} \exp \left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (5.7)$$

όπου,

$T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$ και $R=8.314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$

Είναι εφικτό, λοιπόν, μέσω της εξίσωσης (5.2) να υπολογιστεί η προβλεπόμενη από το μοντέλο συνάρτηση απόκρισης του δείκτη $F(X_c)_{pred}$ και να συγκριθεί με την πειραματική συνάρτηση απόκρισης $F(X_c)_{exp}$.

Πολλές φορές, είναι δυνατό η προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη να μην ταυτίζεται ακριβώς με την πειραματική. Ωστόσο, η αξιοπιστία του δείκτη θεωρείται ικανοποιητική, αν τα πειραματικά σημεία βρίσκονται εντός κάποιων οριακών προβλεπόμενων αποκρίσεων ($F(X_c)_{pred(min)}$ και $F(X_c)_{pred(max)}$). Μέσω γραμμικής

παλινδρομικής ανάλυσης για διάστημα εμπιστοσύνης 95% (η εξαρτημένη μεταβλητή θεωρείται η $\ln k$ και η ανεξάρτητη μεταβλητή η $((1/T)-(1/T_{ref}))$) στο Excel, υπολογίστηκαν οι ελάχιστες και οι μέγιστες τιμές των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP_20U ($k_{1ref(min)}$, $E_{A1(min)}$, $k_{1ref(max)}$, $E_{A1(max)}$, $k_{2ref(min)}$, $E_{A2(min)}$, $k_{2ref(max)}$, $E_{A2(max)}$). Με χρήση της σχέσης (5.7) υπολογίστηκαν οι ελάχιστες και μέγιστες προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού απόκρισης ($k_{1pred(min)}$, $k_{1pred(max)}$, $k_{2pred(min)}$ και $k_{2pred(max)}$) και στη συνέχεια μέσω της σχέσης (5.2), η ελάχιστη και η μέγιστη προβλεπόμενη συνάρτηση απόκρισης του δείκτη $F(X_c)_{pred(min)}$ και $F(X_c)_{pred(max)}$.

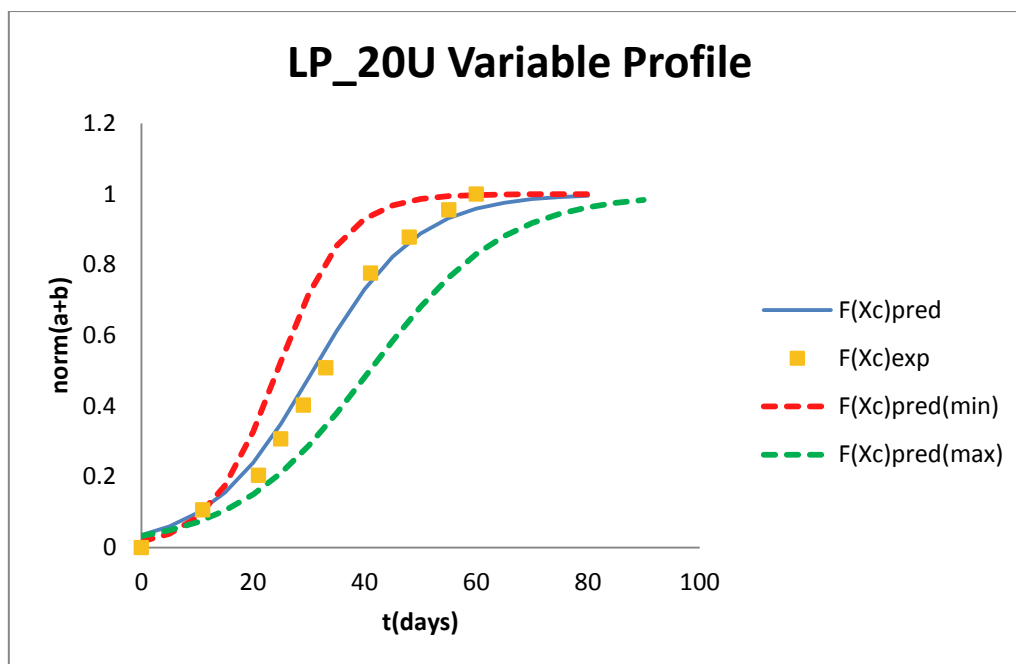
Στους επόμενους Πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραπάνω επεξεργασίας και στο Σχήμα 5.26 παρουσιάζεται η απεικόνιση του δείκτη LP_20U για το εναλλασσόμενο χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ VAR.

Πίνακας 5.18-Προβλεπόμενες και πειραματικές σταθερές του ρυθμού απόκρισης για τον ενζυμικό δείκτη LP_20U

$T_{eff}(^{\circ}C)$	$k_{1exp}(d)$	$k_{2exp}(d)$	$k_{1pred}(d)$	$k_{2pred}(d)$
6.9	31.91	8.03	30.73	9.29

Πίνακας 5.19-Ελάχιστες και μέγιστες προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού απόκρισης για τον ενζυμικό δείκτη LP_20U και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

$T_{eff}(^{\circ}C)$	$k_{1pred(min)}(d)$	$k_{1pred(max)}(d)$	$k_{2pred(min)}(d)$	$k_{2pred(max)}(d)$
6.9	24.36	40.88	6.04	12.04



Σχήμα 5.26- Απόκριση του δείκτη LP_20U για το εναλλασσόμενο χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ VAR και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Όπως παρατηρείται από το Σχήμα 5.26, η πειραματική απόκριση βρίσκεται εντός των προβλεπόμενων οριακών αποκρίσεων και μάλιστα υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της προβλεπόμενης και της πειραματικής απόκρισης του δείκτη, γεγονός που καθιστά το ανεπτυγμένο μαθηματικό μοντέλο αξιόπιστο και για τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα.

5.3 Κινητική μελέτη απόκρισης μικροβιακών ΤΤΙ

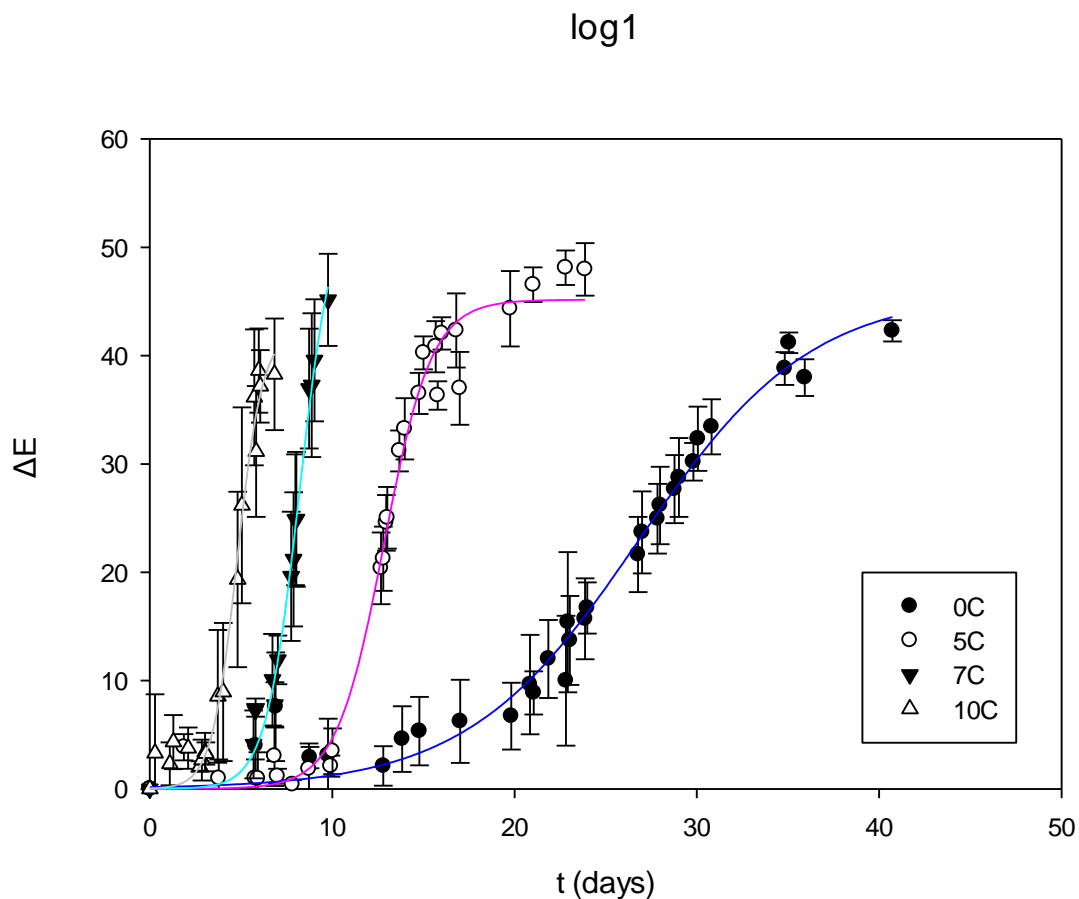
Οι μικροβιακοί χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν είναι:

- \log_1
- \log_2
- \log_5

Ακριβώς όπως και για τη μελέτη των ενζυμικών δεικτών, για καθένα από τα παραπάνω ΤΤΙ πραγματοποιήθηκαν ισοθερμοκρασιακά πειράματα σε θερμοκρασίες ψύξης. Από τις πειραματικές μετρήσεις του χρώματος, όπως μετρήθηκαν από το χρωματομέτρο X-rite, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα της απόκρισης του δείκτη ΔE σε κάθε μελετώμενη θερμοκρασία. Στη συνέχεια, έγινε ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων α , E_A , k_{1ref} , k_{2ref} των ΤΤΙ (με $T_{ref} = 4^\circ\text{C}$). Από τις πειραματικές μετρήσεις του pH, που λαμβάνονταν ταυτόχρονα με τις μετρήσεις χρώματος, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα pH-χρόνου σε κάθε μελετώμενη θερμοκρασία.

Επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων**5.3.1 Κινητική μελέτη μικροβιακών ΤΤΙ τύπου \log_1**

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης ΔE συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.



Σχήμα 5.27- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης ΔE με τον χρόνο για τον μικροβιακό δείκτη \log_1 και για θερμοκρασίες 0, 5, 7, 10°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

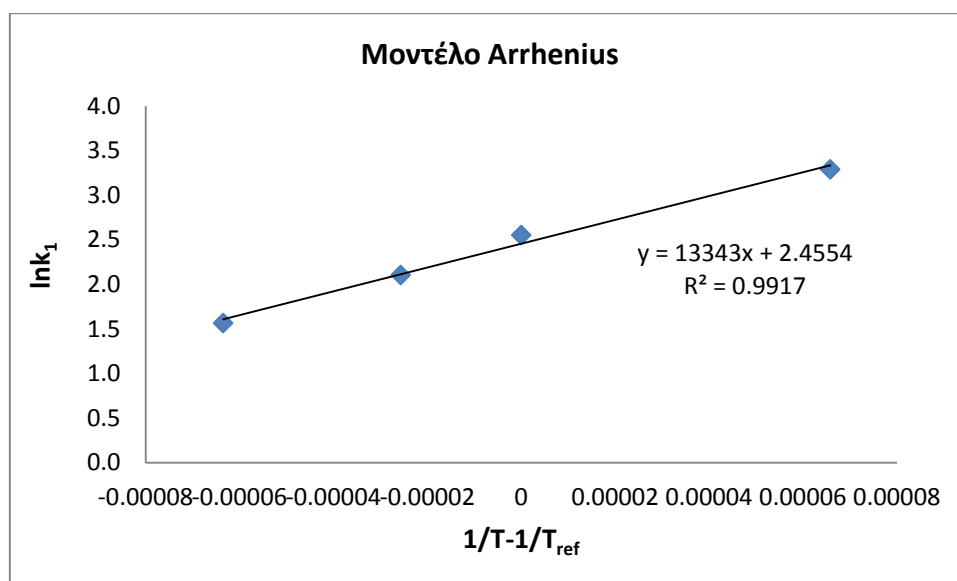
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη \log_1

Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν η παράμετρος α , οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.17.

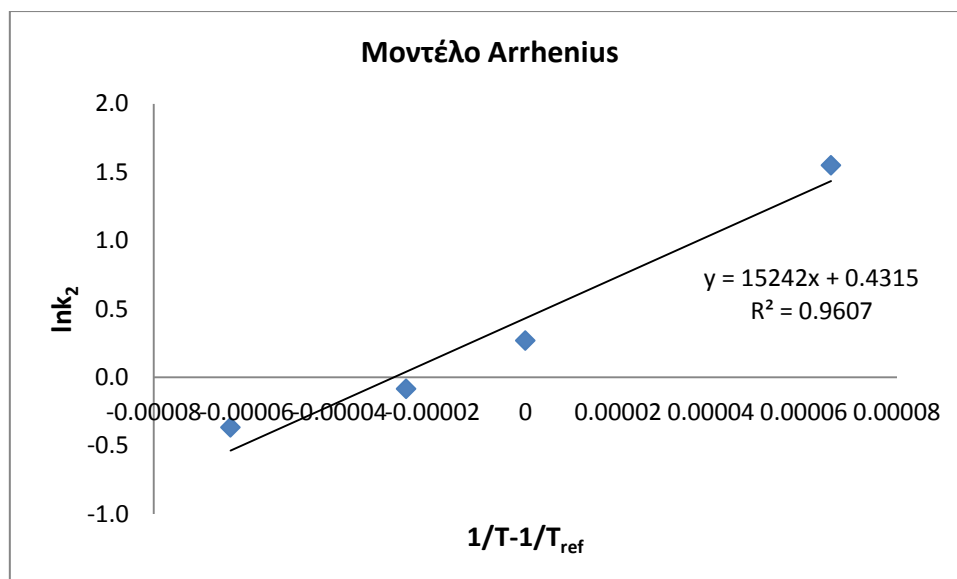
Πίνακας 5.20- Παράμετρος α και σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης ΔE του μικροβιακού δείκτη \log_1

$T(^{\circ}\text{C})$	α	$k_1(\text{d})$	$k_2(\text{d})$	R^2
0	45.84	26.81	4.71	0.977
5	45.16	12.84	1.31	0.987
7	54.76	8.20	0.92	0.989
10	42.27	4.80	0.69	0.979

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{\text{ref}}$ και των $\ln k_2$ ως προς $1/T-1/T_{\text{ref}}$ για τον δείκτη \log_1 .



Σχήμα 5.28-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{\text{ref}}$ για τον δείκτη \log_1 ($T_{\text{ref}}=4^{\circ}\text{C}$)



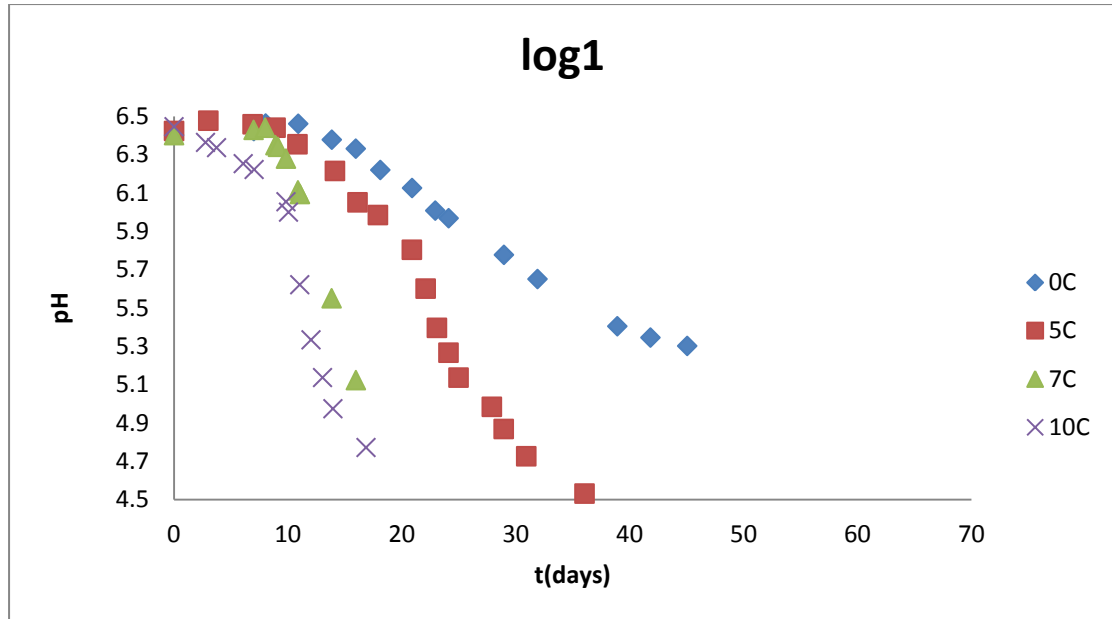
Σχήμα 5.29-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη \log_1 ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη \log_1 , που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2, και τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.21-Κινητικοί παράμετροι του μικροβιακού δείκτη \log_1 ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

$E_A(\text{kJ/mol})$	α	$k_{1ref}(\text{d})$	$k_{2ref}(\text{d})$	R^2
109	44.12	13.45	1.99	0.939

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

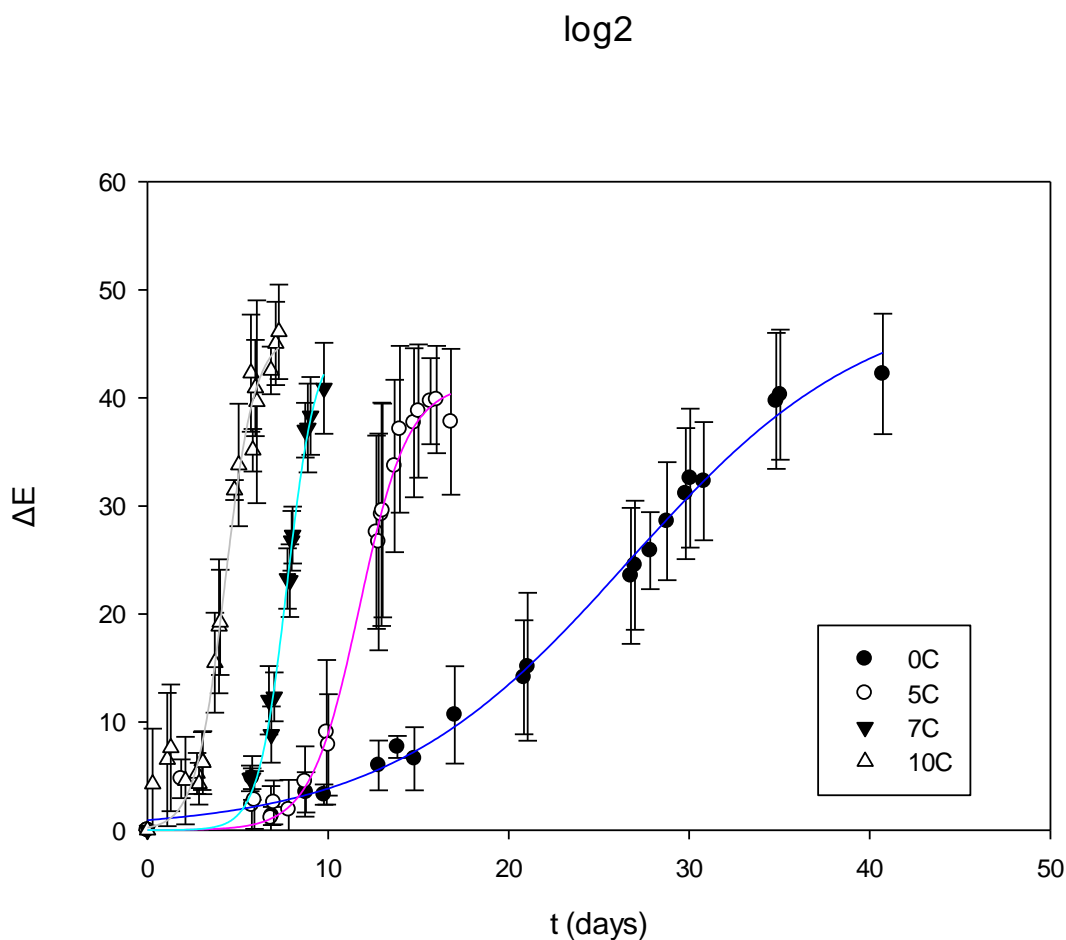


Σχήμα 5.30-Συνολικό διάγραμμα μεταβολής του pH με το χρόνο για τον μικροβιακό δείκτη log1 και για θερμοκρασίες 0, 5, 7, 10°C

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η πτώση του pH είναι πιο γρήγορη.

5.3.2 Κινητική μελέτη μικροβιακών ΤΤΙ τύπου log2

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης ΔΕ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.



Σχήμα 5.31- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης ΔE με τον χρόνο για τον μικροβιακό δείκτη \log_2 και για θερμοκρασίες 0, 5, 7, 10°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

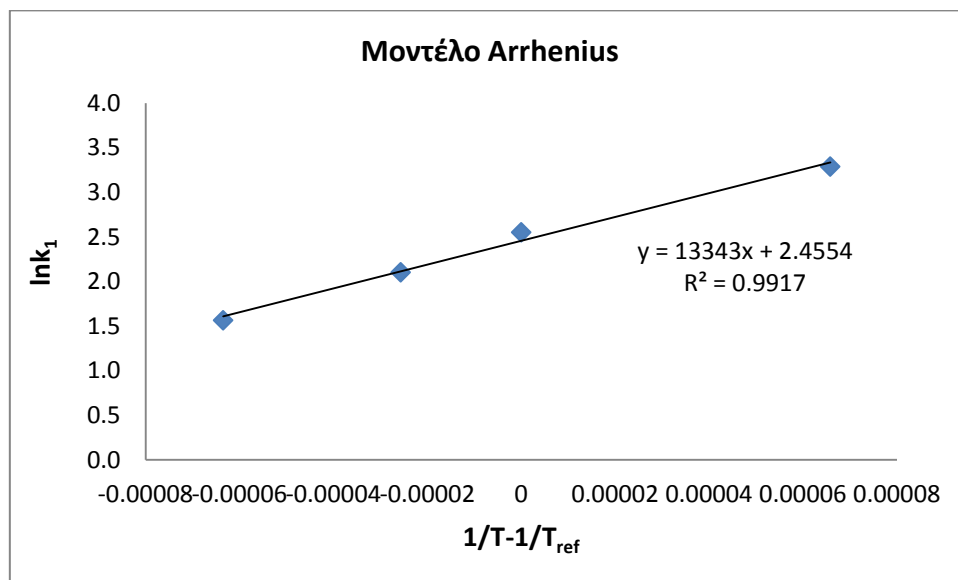
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη \log_2

Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν η παράμετρος α , 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.

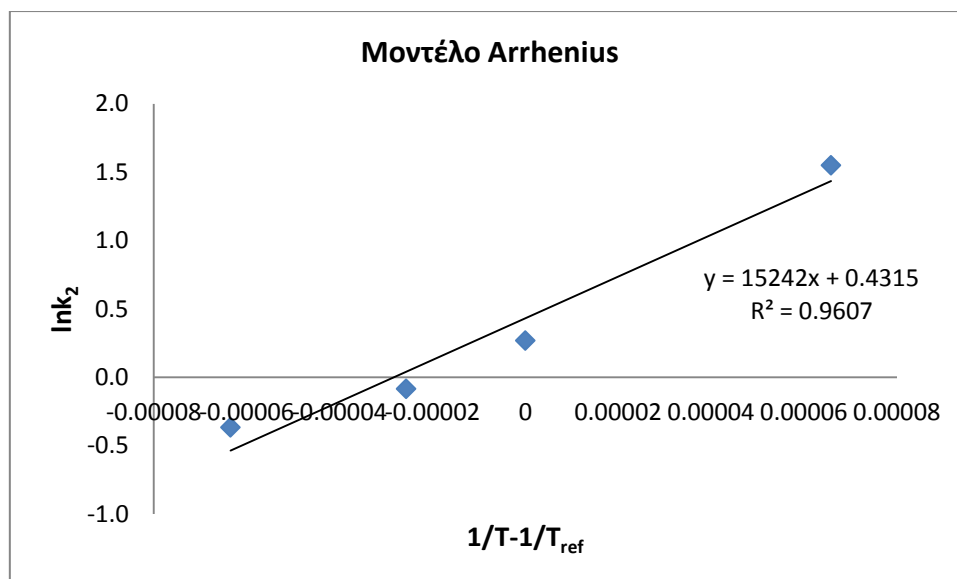
Πίνακας 5.22- Παράμετρος α και σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης ΔΕ του μικροβιακού δείκτη log2

T(°C)	α	k_1 (d)	k_2 (d)	R ²
0	49.58	26.61	6.71	0.974
5	41.31	11.74	1.35	0.991
7	45.40	7.73	0.79	0.990
10	45.80	4.29	0.82	0.993

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται 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 log2.



Σχήμα 5.32-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{ref}$ για τον δείκτη log2 ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)



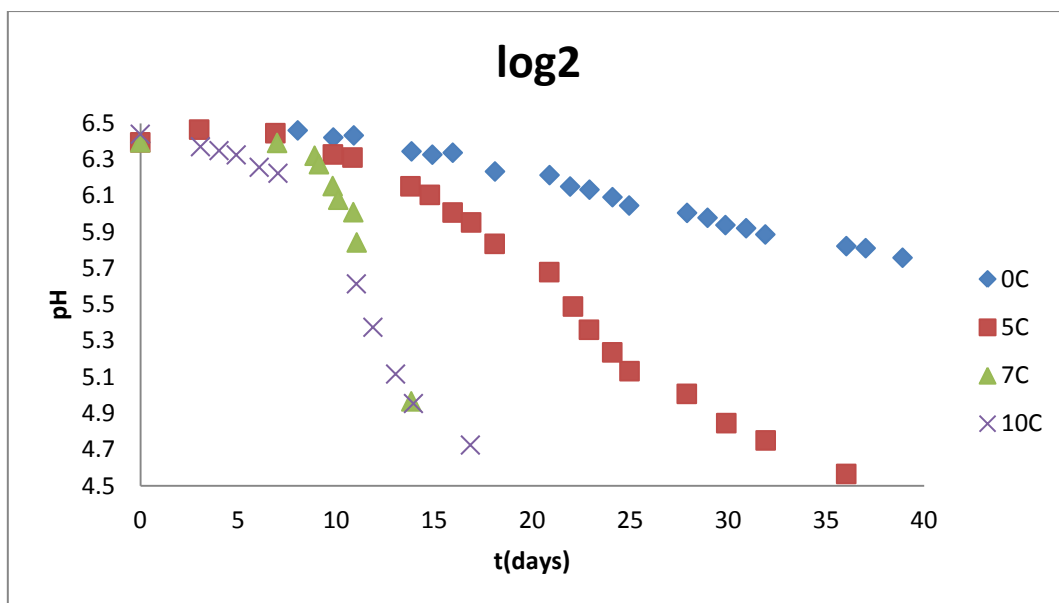
Σχήμα 5.33-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T - 1/T_{ref}$ για τον δείκτη \log_2 ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη \log_2 , που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2, και τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.23-Κινητικοί παράμετροι του μικροβιακού δείκτη \log_2 ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

$E_A(\text{kJ/mol})$	α	$k_{1ref}(\text{d})$	$k_{2ref}(\text{d})$	R^2
117.3	44.30	10.93	1.82	0.942

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.



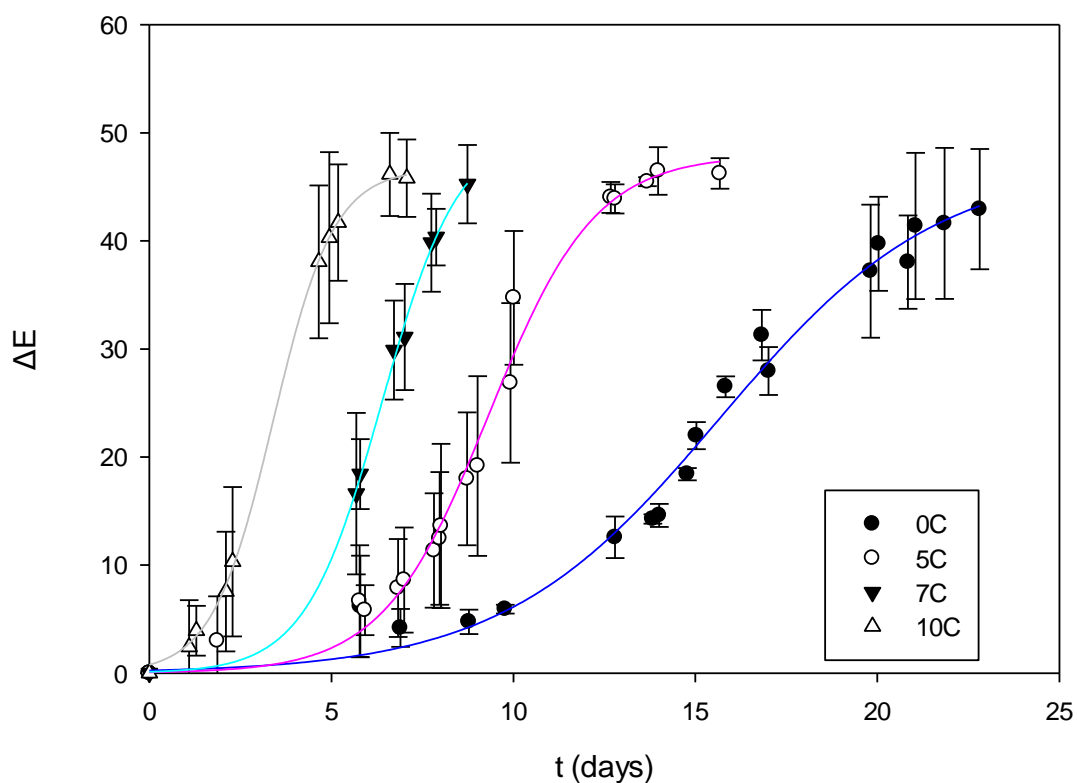
Σχήμα 5.34-Συνολικό διάγραμμα μεταβολής του pH με το χρόνο για τον μικροβιακό δείκτη log2 και για θερμοκρασίες 0, 5, 7, 10°C

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η πτώση του pH είναι πιο γρήγορη.

5.3.3 Κινητική μελέτη μικροβιακών ΤΤΙ τύπου log5

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης ΔΕ συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.

log5



Σχήμα 5.35- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής της απόκρισης ΔΕ με τον χρόνο για τον μικροβιακό δείκτη log5 και για θερμοκρασίες 0, 5, 7, 10°C. Τα σημεία υποδηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές την προσαρμογή του μοντέλου σ'αυτά.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόκριση του δείκτη μεταβάλλεται γρηγορότερα.

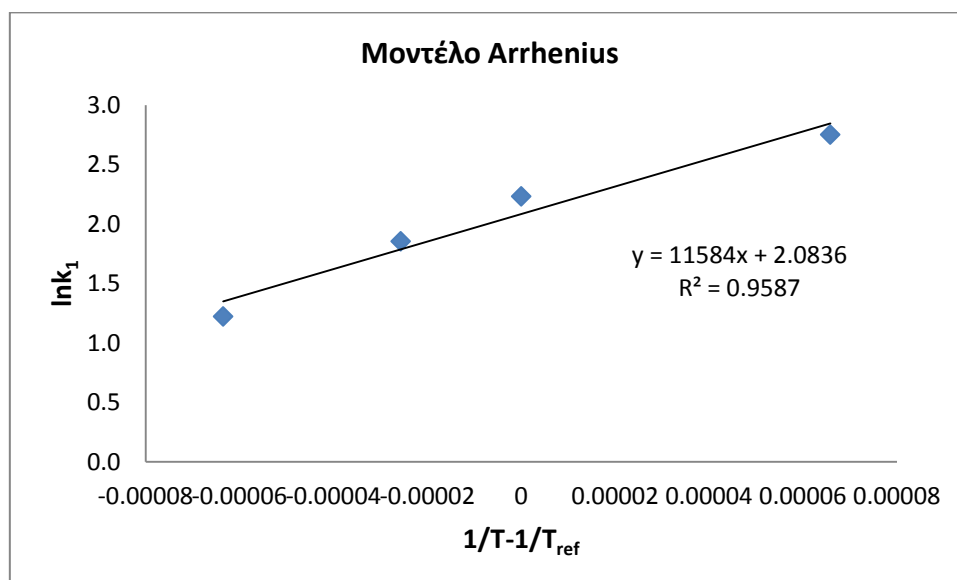
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη log5

Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot υπολογίσθηκαν η παράμετρος α , οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.21.

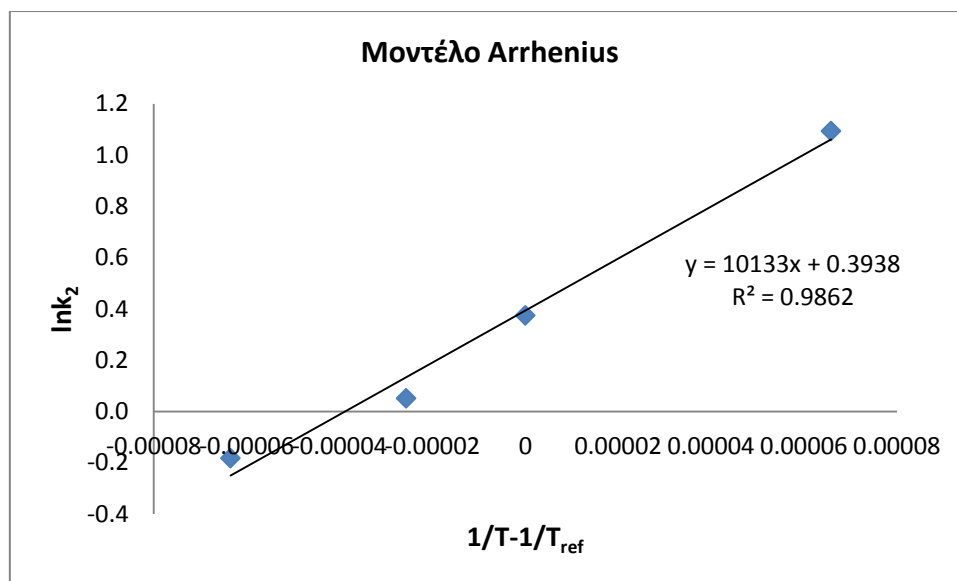
Πίνακας 5.24- Παράμετρος α και σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 της συνάρτησης απόκρισης ΔE του μικροβιακού δείκτη \log_5

$T(^{\circ}\text{C})$	α	$k_1(\text{d})$	$k_2(\text{d})$	R^2
0	47.20	15.68	2.99	0.984
5	47.96	9.33	1.45	0.988
7	50.25	6.39	1.05	0.998
10	46.68	3.40	0.83	0.999

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{\text{ref}}$ και των $\ln k_2$ ως προς $1/T-1/T_{\text{ref}}$ για τον δείκτη \log_5 .



Σχήμα 5.36-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $1/T-1/T_{\text{ref}}$ για τον δείκτη \log_5 ($T_{\text{ref}}=4^{\circ}\text{C}$)



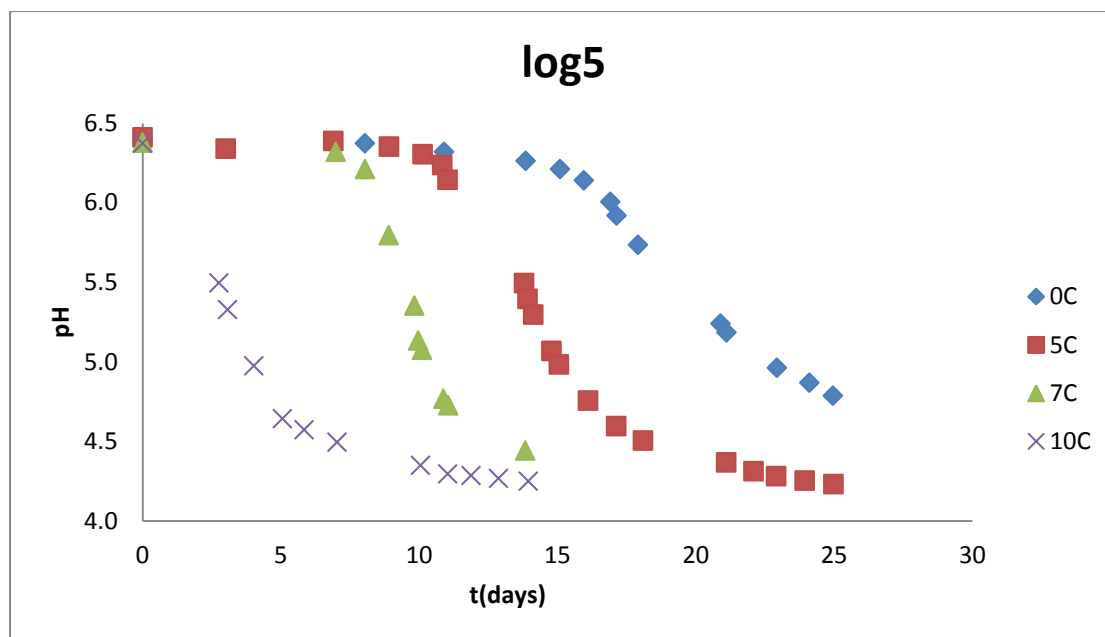
Σχήμα 5.37-Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $1/T - 1/T_{ref}$ για τον δείκτη \log_5 ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

Με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη \log_5 , που προέκυψαν από την επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Systat 10.2, και τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.25-Κινητικοί παράμετροι του μικροβιακού δείκτη \log_5 ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

E_A (kJ/mol)	α	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
85.4	47.77	8.39	1.43	0.936

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης.



Σχήμα 5.38- Συνολικό διάγραμμα μεταβολής του pH με το χρόνο για τον μικροβιακό δείκτη log5 και για θερμοκρασίες 0, 5, 7, 10°C

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, η πτώση του pH είναι πιο γρήγορη.

5.3.4 Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των μελετηθέντων μικροβιακών ΤΤΙ (Συγκεντρωτικά)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι κινητικές παράμετροι όλων των μικροβιακών ΤΤΙ που έχουν αναφερθεί.

Πίνακας 5.26-Κινητικά χαρακτηριστικά όλων των μικροβιακών ΤΤΙ ($T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$)

Μικροβιακός δείκτης	$E_A(\text{kJ/mol})$	α	$k_{1ref}(\text{d})$	$k_{2ref}(\text{d})$	R^2
log1	109	44.12	13.45	1.99	0.939
log2	117.3	44.30	10.93	1.82	0.942
log5	85.4	47.77	8.39	1.43	0.936

Ο υψηλός συντελεστής προσαρμογής R^2 που παρατηρείται για όλα τα ΤΤΙ, αυξάνει την αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Όπως και στους ενζυμικούς δείκτες,

ο ρυθμός απόκρισης του ΤΠΙ (ρυθμός μεταβολής χρώματος) εκφράζεται από τα μεγέθη $1/k_1$ και $1/k_2$, όπου k_1 και k_2 σταθερές του ρυθμού απόκρισης σε μια θερμοκρασία T . Στο σιγμοειδές διάγραμμα $\Delta E-t$, το $1/k_1$ αναφέρεται στη φάση όπου η απόκριση του ΤΠΙ (μεταβολή χρώματος) δεν αλλάζει σημαντικά με το χρόνο, ενώ το $1/k_2$ αναφέρεται στη φάση όπου η απόκριση του ΤΠΙ μεταβάλλεται εκθετικά με το χρόνο. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται το αρχικό επίπεδο εμβολίου μικροοργανισμού στο ΤΠΙ (σε $\log CFU/ml$), μειώνονται οι σταθερές k_{1ref} και k_{2ref} (αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης), το οποίο είναι αναμενόμενο αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του εμβολιασμένου μικροοργανισμού στο σύστημα ΤΠΙ, ο μικροοργανισμός προσεγγίζει τα μέγιστα επίπεδα του πληθυσμού (υψηλή παραγωγή γαλακτικού οξέος, χαμηλές τιμές pH) σε συντομότερο χρόνο. Συνεπώς, γρηγορότερη θα είναι η πτώση του pH και άρα και η απόκριση του ΤΠΙ (μεταβολή χρώματος). Η παράμετρος α , που σχετίζεται με το σημείο στο οποίο η σιγμοειδής καμπύλη εμφανίζει πλατό, λαμβάνει παραπλήσιες τιμές για όλες τις συγκεντρώσεις και συνεπώς δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη συγκέντρωση του αρχικού εμβολίου. Τέλος, η ενέργεια ενεργοποίησης E_A αντιστοιχεί σε τιμή 105.5 kJ/mol (εξίσωση 5.10), τιμή παραπλήσια με εκείνη των Vaikousi et al. (2008) για το μικροβιακό ΤΠΙ που ανέπτυξαν ($E_A=97.7$ kJ/mol).

5.3.5 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ για τον δείκτη \log_1 - Έλεγχος αξιοπιστίας μαθηματικού μοντέλου

Προκειμένου να ελεγχθεί η εφαρμοσιμότητα του ανεπτυγμένου κινητικού μοντέλου στις μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες της ψυκτικής αλυσίδας, μελετήθηκε ενδεικτικά η απόκριση του μικροβιακού δείκτη \log_1 σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης.

Γνωρίζοντας την T_{eff} από την §5.2.10 και τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη (α , E_A , k_{1ref} και k_{2ref}) υπολογίστηκαν οι προβλεπόμενες σταθερές τους ρυθμού απόκρισης k_{1pred} και k_{2pred} μέσω της σχέσης (5.7).

Είναι εφικτό, λοιπόν, μέσω της εξίσωσης (5.4) να υπολογιστεί η προβλεπόμενη από το μοντέλο συνάρτηση απόκρισης του $F(X_c)_{pred}$ και να συγκριθεί με την πειραματική συνάρτηση απόκρισης $F(X_c)_{exp}$.

Πολλές φορές, είναι δυνατό η προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη να μην ταυτίζεται ακριβώς με την πειραματική. Ωστόσο, η αξιοπιστία του δείκτη θεωρείται ικανοποιητική, αν τα πειραματικά σημεία βρίσκονται εντός κάποιων οριακών προβλεπόμενων αποκρίσεων ($F(X_c)_{pred(min)}$ και $F(X_c)_{pred(max)}$). Μέσω γραμμικής παλινδρομικής ανάλυσης για διάστημα εμπιστοσύνης 95% (η εξαρτημένη μεταβλητή θεωρείται η $\ln k$ και η ανεξάρτητη μεταβλητή η $((1/T)-(1/T_{ref}))$) στο Excel, υπολογίστηκαν οι ελάχιστες και οι μέγιστες τιμές των κινητικών χαρακτηριστικών

του δείκτη $\log_1 (k_{1\text{ref}(\text{min})}, E_{A1(\text{min})}, k_{1\text{ref}(\text{max})}, E_{A1(\text{max})}, k_{2\text{ref}(\text{min})}, E_{A2(\text{min})}, k_{2\text{ref}(\text{max})}, E_{A2(\text{max})})$. Με χρήση της σχέσης (5.7) υπολογίστηκαν οι ελάχιστες και μέγιστες προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού απόκρισης ($k_{1\text{pred}(\text{min})}$, $k_{1\text{pred}(\text{max})}$, $k_{2\text{pred}(\text{min})}$ και $k_{2\text{pred}(\text{max})}$) και στη συνέχεια μέσω της σχέσης (5.4), η ελάχιστη και η μέγιστη προβλεπόμενη συνάρτηση απόκρισης του δείκτη $F(X_c)_{\text{pred}(\text{min})}$ και $F(X_c)_{\text{pred}(\text{max})}$.

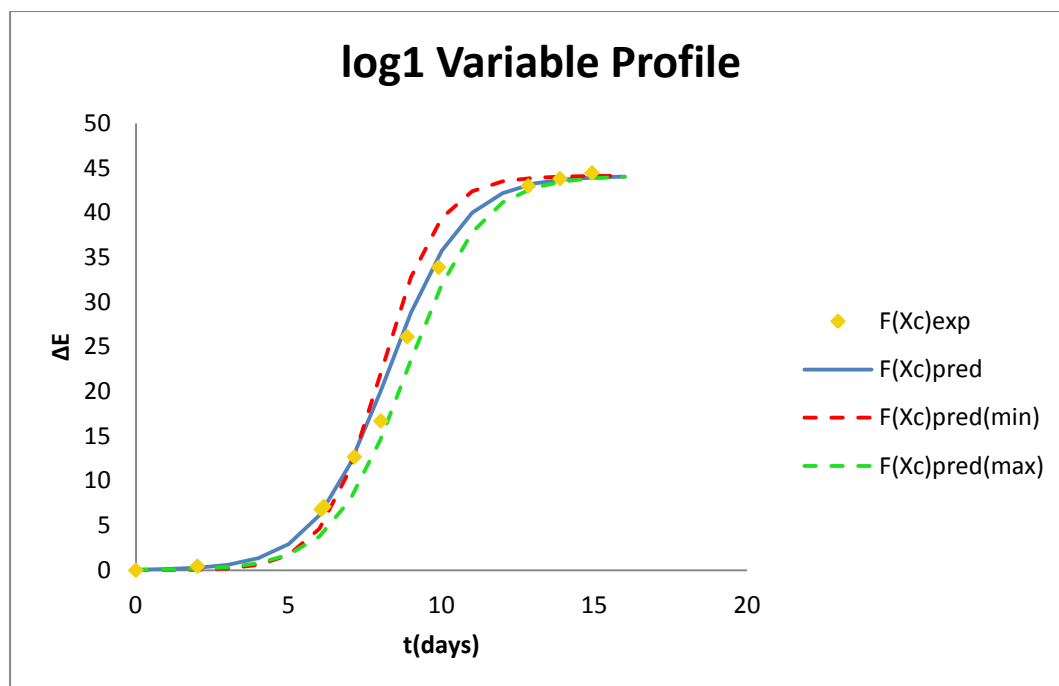
Στους επόμενους Πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραπάνω επεξεργασίας και στο Σχήμα 5.39 παρουσιάζεται η απεικόνιση του δείκτη \log_1 για το εναλλασσόμενο χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ VAR.

Πίνακας 5.27-Προβλεπόμενες και πειραματικές σταθερές του ρυθμού απόκρισης για τον μικροβιακό δείκτη \log_1

$T_{\text{eff}}(^{\circ}\text{C})$	$k_{1\text{exp}}(\text{d})$	$k_{2\text{exp}}(\text{d})$	$k_{1\text{pred}}(\text{d})$	$k_{2\text{pred}}(\text{d})$
6.9	8.52	1.65	8.23	1.22

Πίνακας 5.28-Ελάχιστες και μέγιστες προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού απόκρισης για τον μικροβιακό δείκτη \log_1 και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

$T_{\text{eff}}(^{\circ}\text{C})$	$k_{1\text{pred}(\text{min})}(\text{d})$	$k_{1\text{pred}(\text{max})}(\text{d})$	$k_{2\text{pred}(\text{min})}(\text{d})$	$k_{2\text{pred}(\text{max})}(\text{d})$
6.9	8.01	8.84	0.94	1.20



Σχήμα 5.39- Απόκριση του δείκτη log1 για το εναλλασσόμενο χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ VAR και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Όπως παρατηρείται από το Σχήμα 5.39, η πειραματική απόκριση βρίσκεται εντός των προβλεπόμενων οριακών αποκρίσεων και μάλιστα υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της προβλεπόμενης και της πειραματικής απόκρισης του δείκτη, γεγονός που καθιστά το ανεπτυγμένο μαθηματικό μοντέλο αξιόπιστο και για τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα.

5.4 Διάρκεια ζωής ή χρόνος απόκρισης (Response Time) των TTI

Πέραν των κινητικών χαρακτηριστικών που παρουσιάστηκαν παραπάνω, υπολογίστηκε και η διάρκεια ζωής των μελετημένων ενζυμικών και μικροβιακών TTI σε όλες τις θερμοκρασίες.

Ο χρόνος απόκρισης (διάρκεια ζωής) των TTI καθορίζεται ως ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή της ενεργοποίησης μέχρι το τελικό σημείο λήξης (χρονική στιγμή όπου παρατηρείται η ορατή αλλαγή χρώματος).

❖ Χρόνος απόκρισης ενζυμικών TTI

Για τα ενζυμικά TTI το οπτικά παρατηρούμενο τελικό σημείο λήξης αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης σε τιμή απόκρισης $X = \text{norm}(a+b) = 0.8$. Η τιμή αυτή υπολογίστηκε έπειτα από οργανοληπτικό έλεγχο των εκάστοτε δεικτών.

Επιλύοντας την εξίσωση (5.2) ως προς το χρόνο για όριο λήξης $\text{norm}(a+b)=0.8$ (συμπέρασμα οπτικής παρατήρησης) υπολογίστηκαν οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης (διάρκεια ζωής) σε ημέρες όλων των ενζυμικών ΤΤΙ στις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.29- Πειραματικοί χρόνοι απόκρισης(διάρκεια ζωής) σε ημέρες των ενζυμικών ΤΤΙ σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης

Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP								
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ Χρόνοι απόκρισης(Response Time) (d)								
T(°C)	5U	10U	20U	50U	100U	200U	400U	600U
0	321.2	214.1	151.9	67.3	40.4	20.5	10.4	4.7
2.5	-	-	-	46.5	28.1	13.3	5.3	3.4
5	231.5	125.2	71.6	22.7	20.4	7.9	3.5	2.1
10	110.3	55.2	27.9	12.0	5.3	2.5	1.1	0.8
15	39.7	16.9	8.0	3.9	1.3	0.8	0.31	0.2

Σημειώνεται ότι στις συγκεντρώσεις 5U, 10U και 20U δεν διεξήχθησαν πειράματα στους 2.5°C.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι με την αύξηση τόσο της συγκέντρωσης του ενζύμου στο ΤΤΙ όσο και της θερμοκρασίας διεξαγωγής του πειράματος, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο διότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου και υψηλότερες θερμοκρασίες, η ενζυμική υδρόλυση του υποστρώματος προχωράει γρηγορότερα και κατ'επέκταση η ορατή μεταβολή χρώματος.

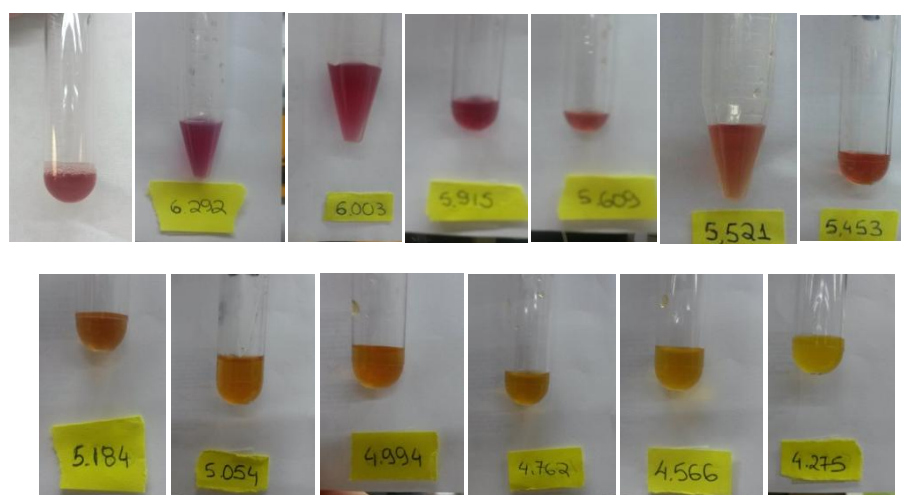
❖ Χρόνος απόκρισης μικροβιακών ΤΤΙ

Στα μικροβιακά ΤΤΙ, ο πληθυσμός *L. sakei* σχετίστηκε στενά την κατανάλωση της γλυκόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος, προκαλώντας την πτώση του pH και τη σταδιακή αλλαγή του χρώματος από το αρχικό ερυθρό (χαμηλές τιμές ΔΕ) σε πορτοκαλί και έπειτα στο τελικό κίτρινο χρώμα(υψηλές τιμές ΔΕ, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού προσεγγίζει τα μέγιστα επίπεδα). Η ευδιάκριτη οπτική μεταβολή του χρώματος του υποστρώματος στον τελικό κίτρινο χρωματισμό καταγράφηκε σε τιμή απόκρισης ΔΕ=25, οπότε η χρονική αυτή στιγμή υιοθετήθηκε ως το σημείο λήξης του συστήματος ΤΤΙ. Το pH του μέσου ανάπτυξης στο σημείο λήξης ήταν κοντά στο 5.4. Οι τιμές αυτές υπολογίστηκαν έπειτα από οργανοληπτικό έλεγχο των

εκάστοτε δεικτών και είναι παραπλήσιες με τις αντίστοιχες τιμές στο σημείο λήξης των μικροβιακών ΤΤΙ που ανέπτυξαν οι Vaikousi et al. (2008) ($\Delta E=20$ και $pH=5.2$).



Εικόνα 5.2-Μεταβολή χρώματος στα μικροβιακά ΤΤΙ



Εικόνα 5.3-Μεταβολή pH στα μικροβιακά ΤΤΙ

Επιλύοντας την εξίσωση (5.4) ως προς το χρόνο για όριο λήξης $\Delta E=25$ (συμπέρασμα οπτικής παρατήρησης) υπολογίστηκαν οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης (διάρκεια ζωής) σε ημέρες όλων των μικροβιακών ΤΤΙ στις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.30- Πειραματικοί χρόνοι απόκρισης(διάρκεια ζωής) σε ημέρες των μικροβιακών ΤΤΙ σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης

Μικροβιακά ΤΤΙ			
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ Χρόνοι απόκρισης(Response Time) (d)			
T(°C)	log1	log2	log5
0	27.7	26.7	14.8
5	13.1	12.3	8.8

7	8.0	7.9	6.0
10	5.0	4.4	3.2

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι με την αύξηση τόσο του αρχικού επιπέδου εμβολίου του μικροοργανισμού στο ΤΤΙ όσο και της θερμοκρασίας διεξαγωγής του πειράματος, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο διότι σε υψηλότερα επίπεδα αρχικού εμβολίου και υψηλότερες θερμοκρασίες, ο μικροοργανισμός φτάνει τη μέγιστη βακτηριακή συγκέντρωση σε συντομότερο χρόνο, με αποτέλεσμα να είναι γρηγορότερη η πτώση του pH και η μεταβολή χρώματος και κατ'επέκταση συντομότερα τα σημεία λήξης.

5.5 Προσδιορισμός συνολικών μαθηματικών μοντέλων της απόκρισης των ΤΤΙ

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αποτελεσμάτων των ενζυμικών και μικροβιακών ΤΤΙ, προσδιορίστηκε ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο για τα ενζυμικά τύπου LP ΤΤΙ και για τα μικροβιακά ΤΤΙ. Το μαθηματικό αυτό μοντέλο περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης των ΤΤΙ από τη θερμοκρασία, το χρόνο και τη συγκέντρωση ενζύμου για τα ενζυμικά ή το αρχικό επίπεδο εμβολίου μικροοργανισμού για τα μικροβιακά ΤΤΙ.

5.5.1 Προσδιορισμός συνολικού μαθηματικού μοντέλου των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP

Για τα ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP το συνολικό μαθηματικό μοντέλο που προσδιορίστηκε περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$X = F(X_c) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,\text{ref}} * C^{-a} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right] - t}{k_{2,\text{ref}} * C^{-b} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right]}\right)} \quad (5.8)$$

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, δηλαδή, $X = \text{norm}(a+b) = f(t, T, C)$.

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SYSTAT 10.2 (Statistics 2002, SPCC Inc., Chicago, Ill, USA) υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της μη γραμμικής

παλινδρόμησης οι παράμετροι της εξίσωσης (5.8) και παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.31- Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP ($T_{ref}=4^{\circ}C$)

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή
E_A (kJ/mol)	131.4
k_{1ref} (d)	1052.7
k_{2ref} (d)	514.8
a	0.996
b	1.062
R^2	0.875

Συνεπώς, η εξίσωση (5.8) γίνεται:

$$X = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{1052.68 * C^{-0.996} * \exp\left[15804.7\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{277.16}\right)\right] - t}{514.812 * C^{-1.062} * \exp\left[15804.7\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{277.16}\right)\right]}\right)} \quad (5.9)$$

όπου,

T: θερμοκρασία που βρίσκεται ο δείκτης (K)

C: συγκέντρωση ενζύμου (Units)

t: χρόνος αποθήκευσης (d)

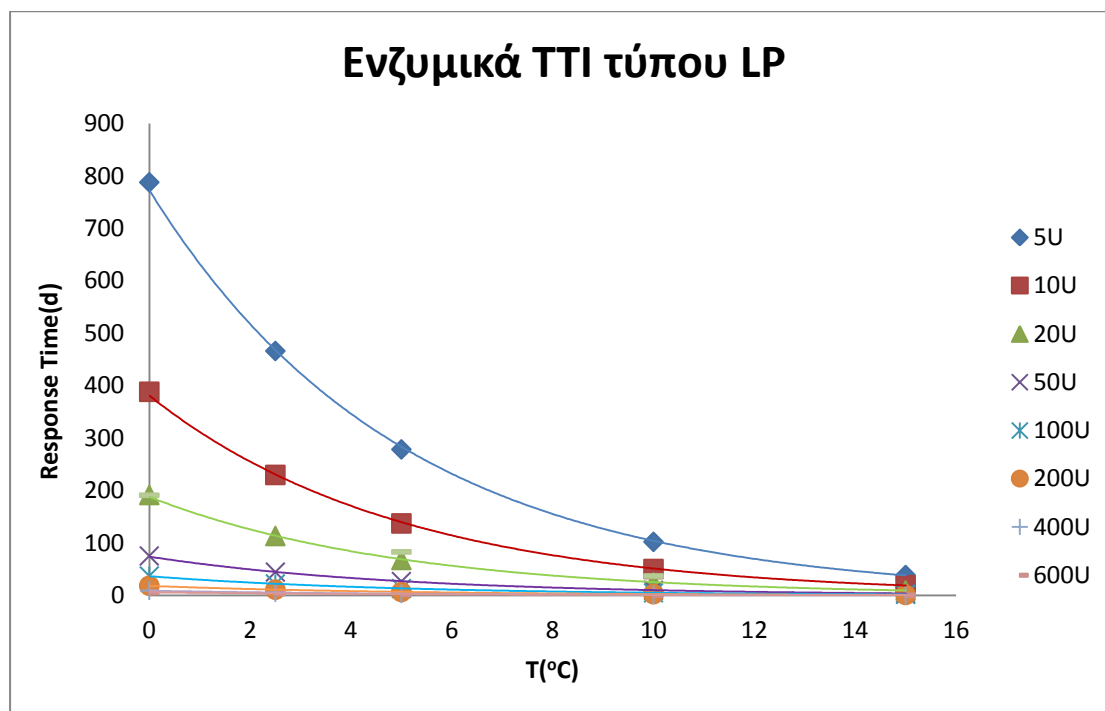
Εφαρμόζοντας την εξίσωση (5.9) για διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης και για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου υπολογίστηκε η θεωρητική διάρκεια ζωής κάθε δείκτη με τη βοήθεια του προγράμματος Solver του Excel. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.32-Θεωρητικοί χρόνοι απόκρισης(διάρκεια ζωής) των ενζυμικών ΤΤΙ όπως προέκυψαν από το μαθηματικό μοντέλο

Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP								
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΙ Χρόνοι απόκρισης(Response Time) (d)								
T(°C)	5U	10U	20U	50U	100U	200U	400U	600U
0	787.8	388.3	191.5	75.3	37.2	18.4	9.1	6.0
2.5	466.1	229.8	113.3	44.5	22.0	10.9	5.4	3.6
5	278.4	137.2	67.7	26.6	13.1	6.5	3.2	2.1

10	102.1	50.3	24.8	9.8	4.8	2.4	1.2	0.8
15	38.8	19.1	9.4	3.7	1.8	0.9	0.4	0.3

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει το διάγραμμα:



Σχήμα 5.40- Θεωρητικοί χρόνοι απόκρισης σε ημέρες των LP-ενζυμικών ΤΤΙ συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης ενζύμου. Στα σημεία κάθε δείκτη έχει προσαρμοστεί η εκθετική καμπύλη

Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας και την αύξηση της συγκέντρωσης ενζύμου, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη.

5.5.2 Προσδιορισμός συνολικού μαθηματικού μοντέλου των μικροβιακών ΤΤΙ

Για τα μικροβιακά ΤΤΙ το συνολικό μαθηματικό μοντέλο που προσδιορίστηκε περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\Delta E = \frac{\alpha}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,\text{ref}} * C^{-b} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right] - t}{k_{2,\text{ref}} * C^{-c} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right]}\right)} \quad (5.10)$$

όπου,

T: θερμοκρασία που βρίσκεται ο δείκτης (K)

C: αρχικό επίπεδο εμβολίου μικροοργανισμού (logCFU/ml)

t: χρόνος αποθήκευσης (d)

Το συγκεκριμένο μοντέλο περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης των μικροβιακών ΤΤΙ από το χρόνο αποθήκευσης t (d), τη θερμοκρασία T (K) και τη συγκέντρωση του εμβολιασμένου στο σύστημα μικροοργανισμού C (logCFU/ml), δηλαδή, $\Delta E = f(t, T, C)$.

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SYSTAT 10.2 (Statistics 2002, SPCC Inc., Chicago, Ill, USA) υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης οι παράμετροι της εξίσωσης (5.10) και παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.33- Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των μικροβιακών ΤΤΙ ($T_{\text{ref}}=4^{\circ}\text{C}$)

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή
E_A (kJ/mol)	105.5
$k_{1,\text{ref}}$ (d)	13.8
$k_{2,\text{ref}}$ (d)	2.3
α	44.8
b	0.229
c	0.036
R^2	0.895

Συνεπώς, η εξίσωση (5.10) γίνεται:

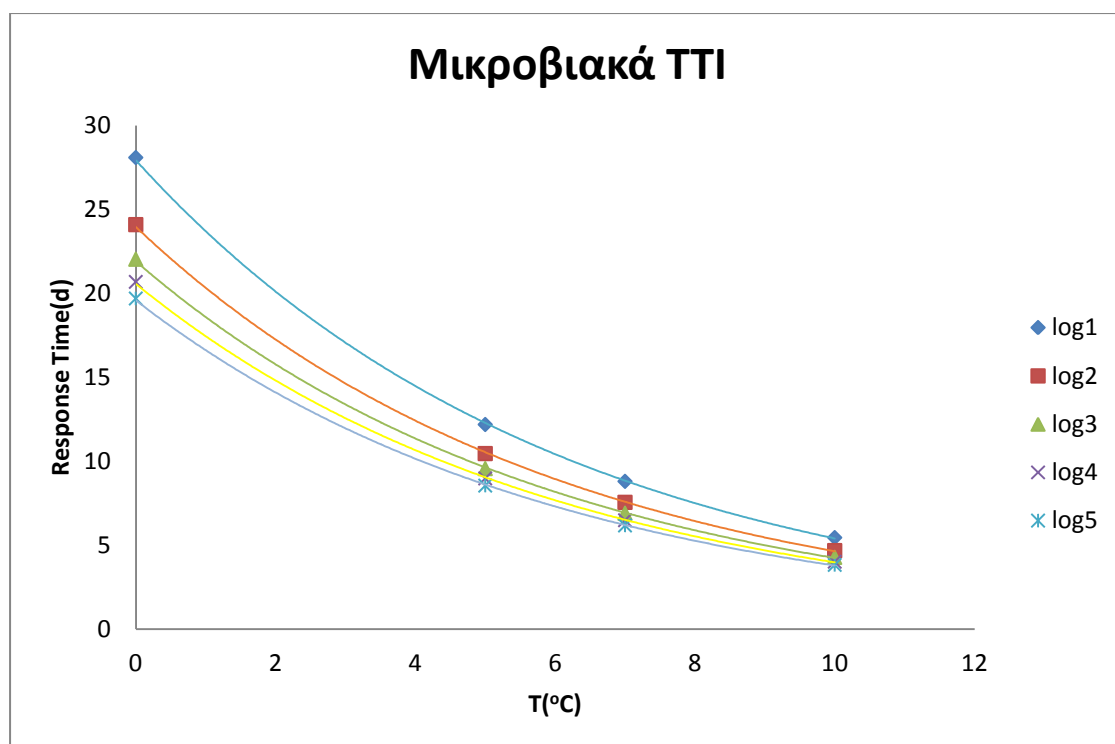
$$\Delta E = \frac{44.761}{1 + \exp\left(\frac{13.829 * C^{-0.229} * \exp\left[12689.4 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{277.16}\right)\right] - t}{2.253 * C^{-0.036} * \exp\left[12689.4 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{277.16}\right)\right]}\right)} \quad (5.11)$$

Εφαρμόζοντας την εξίσωση (5.11) για διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης και για διαφορετικά επίπεδα αρχικού εμβολίου μικροοργανισμού υπολογίστηκε η θεωρητική διάρκεια ζωής κάθε δείκτη με τη βοήθεια του προγράμματος Solver του Excel. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.34- Θεωρητικοί χρόνοι απόκρισης(διάρκεια ζωής) των μικροβιακώνΤΤΙ όπως προέκυψαν από το μαθηματικό μοντέλο

Μικροβιακά ΤΤΙ					
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΙ Χρόνοι απόκρισης(Response Time) (d)					
T(°C)	log1	log2	log3	log4	log5
0	28.1	24.1	22.0	20.7	19.7
5	12.2	10.4	9.6	9.0	8.5
7	8.8	7.5	6.9	6.5	6.2
10	5.4	4.7	4.3	4.0	3.8

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει το διάγραμμα:



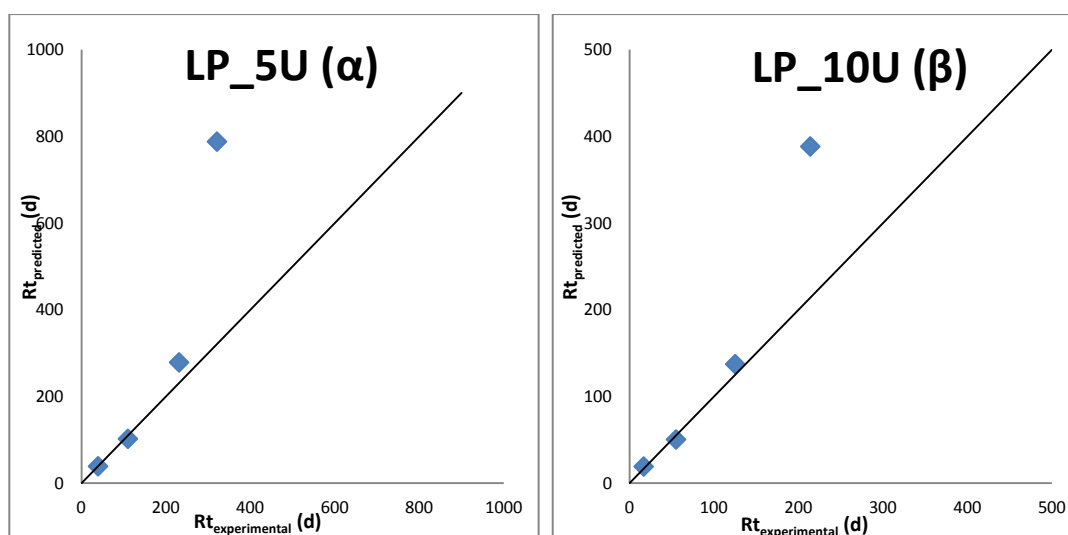
Σχήμα 6.41- Θεωρητικοί χρόνοι απόκρισης σε ημέρες των μικροβιακών ΤΤΙ συναρτήσει της θερμοκρασίας και του αρχικού μικροβιακού επιπέδου εμβολίου. Στα σημεία κάθε δείκτη έχει προσαρμοστεί η εκθετική καμπύλη

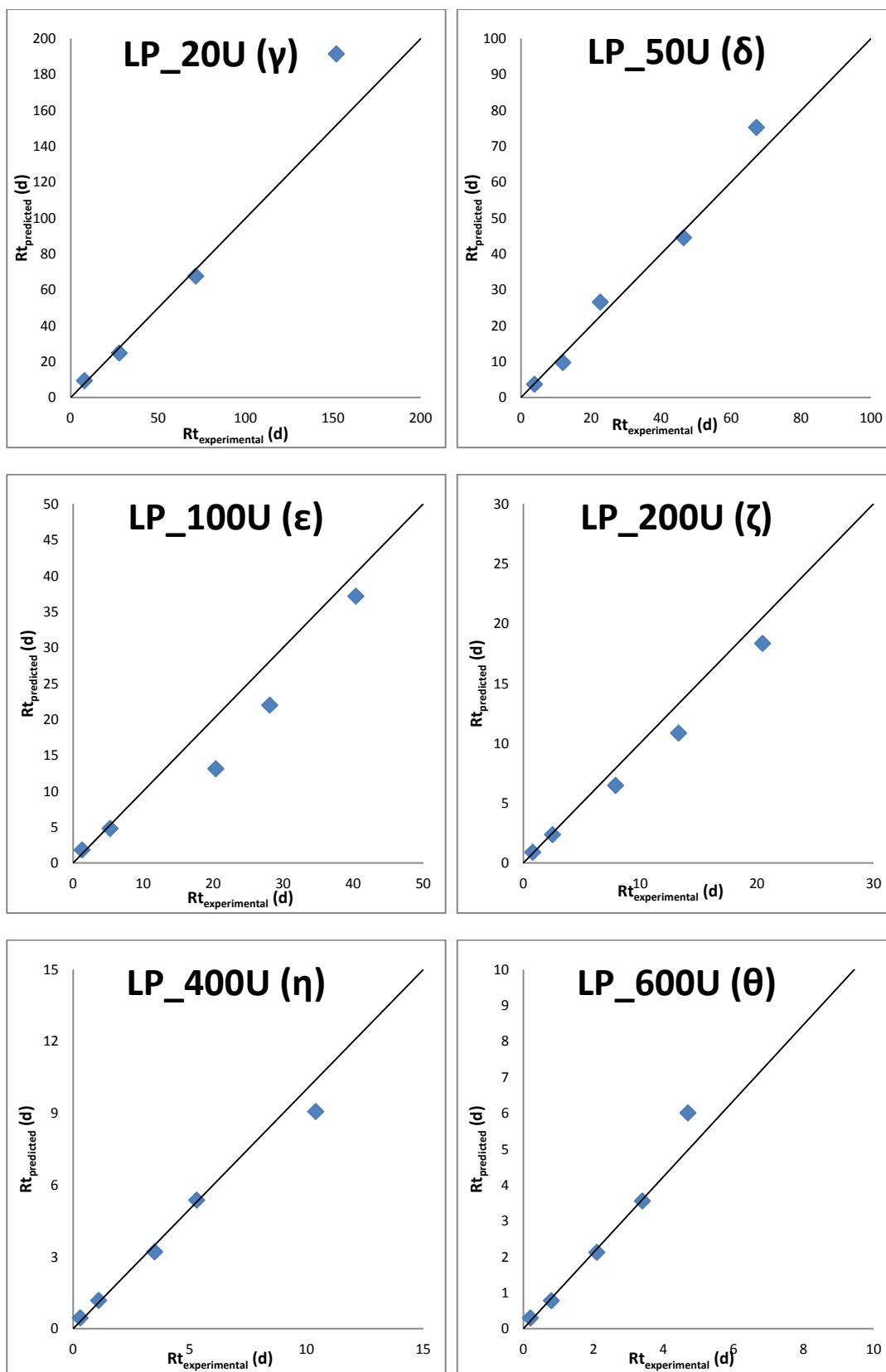
Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας και την αύξηση της συγκέντρωσης του βακτηριακού στελέχους στο αρχικό εμβόλιο, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη.

5.6 Μελέτη αξιοπιστίας των συνολικών μαθηματικών μοντέλων - Στατιστική επεξεργασία

Προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία των συνολικών μαθηματικών μοντέλων, κατασκευάστηκαν κατάλληλα διαγράμματα συσχέτισης των πειραματικών με τους υπολογισμένους από το μοντέλο χρόνους απόκρισης (R_t) για όλους τους ενζυμικούς και μικροβιακούς δείκτες ΤΤΙ που μελετήθηκαν σε θερμοκρασιακό εύρος 0-15°C (Σχήματα 5.42, 5.43). Με αυτό τον τρόπο είναι ευκολότερο να παρατηρηθούν οι διαφορές ανάμεσα στις πειραματικές και στις θεωρητικές τιμές. Όσο περισσότερο τείνουν τα σημεία στην διχοτόμο ευθεία του 1ου και του 3ου τεταρτημορίου του καρτεσιανού επιπέδου $y=x$, τόσο λιγότερο αποκλίνουν οι θεωρητικές από τις πειραματικές τιμές.

5.6.1 Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP

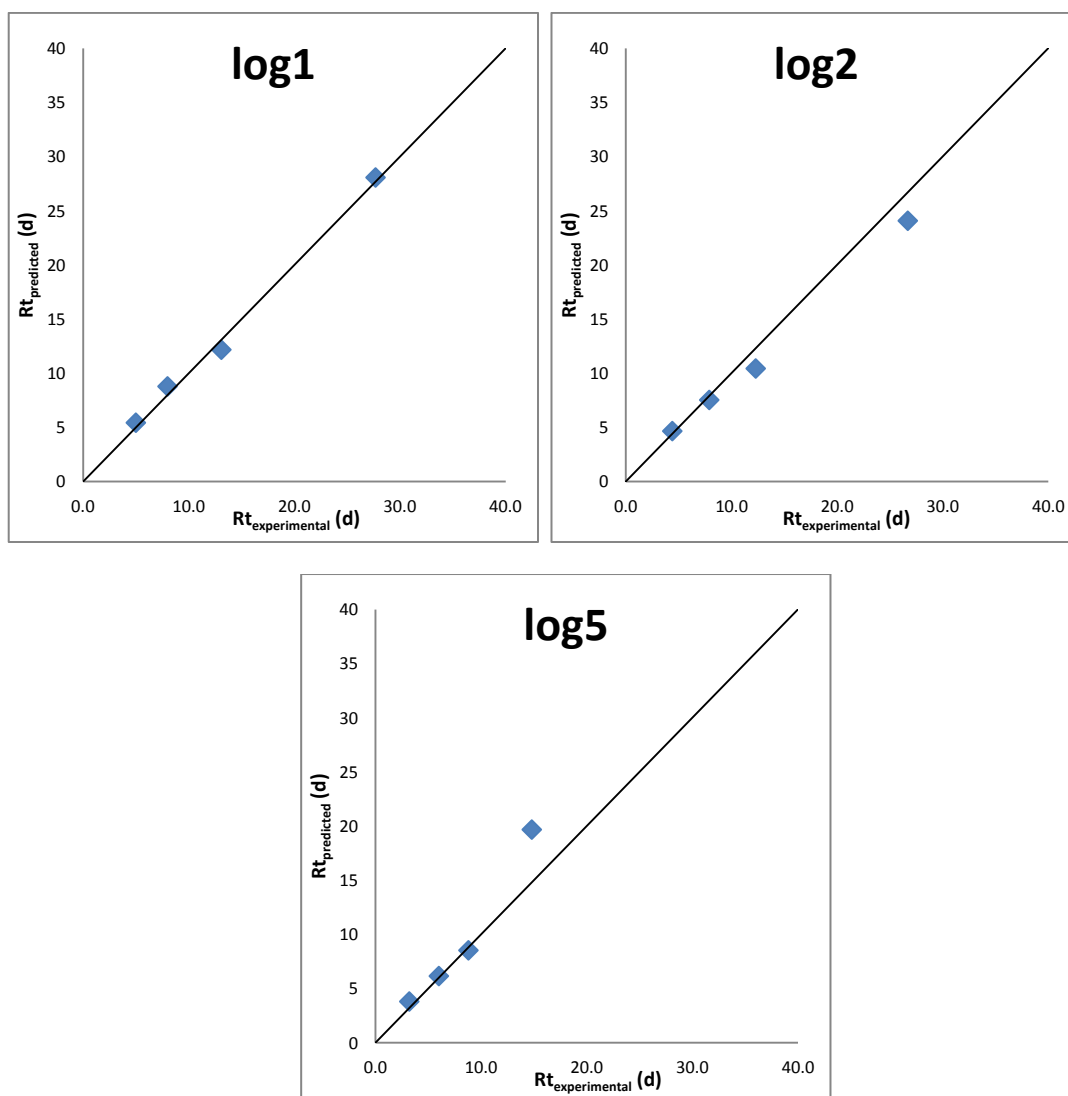




Σχήμα 5.42- Διαγράμματα συσχέτισης πειραματικών και θεωρητικών χρόνων απόκρισης για τους μελετηθέντες ενζυμικούς δείκτες τύπου LP (α), (β), (γ), (δ), (ε), (ζ), (η), (θ)

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι υπάρχει καλή συσχέτιση των πειραματικών με τους υπολογισμένους από το μοντέλο χρόνους απόκρισης των δεικτών. Επιβεβαιώνεται κατά αυτό τον τρόπο η αξιοπιστία του ανεπτυγμένου συνολικού κινητικού μοντέλου για τα ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP. Σημειώνεται ότι για τους ενζυμικούς δείκτες LP_5U και LP_10U, οι τιμές που αποκλίνουν περισσότερο από τη διχοτόμο $y=x$ είναι τα σημεία που οι πειραματικοί χρόνοι ζωής αντιστοιχούν στους 0°C. Οι συγκεκριμένες τιμές προέκυψαν μέσω προεκβολής, καθώς το πείραμα είναι σε εξέλιξη.

5.6.2 Μικροβιακά ΤΤΙ



Σχήμα 5.43-Διαγράμματα συσχέτισης πειραματικών και θεωρητικών χρόνων απόκρισης για τους δείκτες log1, log2 και log5

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι υπάρχει καλή συσχέτιση των πειραματικών με τους υπολογισμένους από το μοντέλο χρόνους απόκρισης των δεικτών. Επιβεβαιώνεται κατά αυτό τον τρόπο η αξιοπιστία του ανεπτυγμένου συνολικού κινητικού μοντέλου για τα μικροβιακά ΤΤΙ.

Κεφάλαιο 6

Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

6.1 Εισαγωγή

Όπως προαναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 4, αρχικά προσδιορίστηκε η χημική σύσταση και μετέπειτα μελετήθηκε η διατηρησιμότητα των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό.

Για τη μελέτη της διατηρησιμότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές (0, 5, 10°C) και μεταβαλλόμενες συνθήκες και σε κάθε προγραμματισμένη δειγματοληψία πραγματοποιούνταν οι ακόλουθες μετρήσεις:

- ✓ Μέτρηση της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας
- ✓ Μέτρηση pH
- ✓ Μέτρηση χρώματος
- ✓ Ανάλυση υφής
- ✓ Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων

Στόχος όλων των παραπάνω αναλύσεων ήταν να μελετηθούν οι μικροβιολογικές, φυσικοχημικές και οργανοληπτικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη ψύξη των δειγμάτων, έτσι ώστε από την μετέπειτα επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων να αναπτυχθούν επικυρωμένα κινητικά μοντέλα πρόρρησης της ποιοτικής υποβάθμισης των συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας.

6.2 Χημική σύσταση φιλέτων καπνιστής πέστροφας

Κατά την παραλαβή των δειγμάτων στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΕΜΠ, προσδιορίστηκε η αρχική σύστασή τους. Η άμεση χημική ανάλυση των φιλέτων τσιπούρας περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών, των λιπών, της αλατότητας, της υγρασίας, των ανόργανων συστατικών (τέφρας) και το προφίλ λιπαρών οξέων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον Πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.10-Χημική σύσταση καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

Λιπαρά	7.0 g
κορεσμένα	1.4 g
ω3 λιπαρά οξέα	0.9 g
20:5 ω3 EPA	127 mg
22:6 ω3 DHA	440 mg
Υδατάνθρακες	0 g
Πρωτεΐνες	23.0 g
Νάτριο	0.1 g

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι τα καπνιστά φιλέτα πέστροφας είναι πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα, με κυριότερους εκπροσώπους το EPA:20:5 και το DHA: 22:6.



Εικόνα 6.7-Δείγματα καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό κατά την έναρξη των πειραμάτων και μετά από διατήρηση 37 ημερών στους 5 και 10°C

6.3 Κινητική μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης σε συσκευασμένα υπό κενό φιλέτα καπνιστής πέστροφας

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2, η κύρια αιτία αλλοίωσης των καπνιστών ιχθύων είναι η μικροβιακή ανάπτυξη. Για την αλλοίωση των συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας μελετήθηκαν η ολική μικροβιακή χλωρίδα (ΟΜΧ), ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων και του βακτηρίου *Brochothrix thermosphacta*. Επισημαίνεται ότι ειδικά για το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta*, το φορτίο που μετρήθηκε καθ'όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του

πειράματος ήταν μη ανιχνεύσιμο (<2 logcfu/g). Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις διαπιστώθηκε ότι τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) ήταν ο ειδικός αλλοιογόνος μικροοργανισμός(SSO) οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού αυτού περιγράφει ικανοποιητικά την αλλοίωση των συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας σε όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν. Η επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων σε καπνιστούς ιχθείς συσκευασμένους σε κενό έχει αναφερθεί επανειλημμένως στη βιβλιογραφία (Hansen et al., 1996; Lyhs et al., 1999; Lyhs et al., 2002; Rodriguez, 2002; Besharati, 2004; Joffraud, 2006; Cakli et al.,2006; Dimitriadou, 2010; Oğuzhan, 2013; Løndal, 2015). Γι' αυτό το λόγο, μελετήθηκαν εκτενέστερα η κινητική ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και των γαλακτικών βακτηρίων. Τα βήματα της κινητικής μελέτης περιγράφονται ακολούθως.

Από τις μετρήσεις που προέκυψαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και των γαλακτικών βακτηρίων για όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5 και 10°C). Τα πειραματικά σημεία προσαρμόστηκαν στατιστικά στο μοντέλο Baranyi μέσω του προγράμματος DMfit software (IFR, Institute of Food Research, Reading, UK) και προσδιορίστηκαν οι τιμές της σταθεράς του ρυθμού μικροβιακής ανάπτυξης (k) τόσο για την ολική μικροβιακή χλωρίδα όσο και για τα γαλακτικά βακτήρια σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη σχέση:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = k * t \quad (6.1)$$

όπου N: ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t

N₀: το αρχικό μικροβιακό φορτίο

Η καμπύλη του μοντέλου Baranyi είναι σιγμοειδούς μορφής, περιλαμβάνει λανθάνουσα φάση, εκθετική φάση και φάση στασιμότητας και ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροβιακού φορτίου αναφέρεται στην εκθετική φάση.

Το επόμενο βήμα της κινητικής μελέτης αφορά στη μαθηματική έκφραση της εξάρτησης του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών από τη θερμοκρασία συντήρησης με τη χρήση της γραμμικοποιημένης μορφής της εξίσωσης Arrhenius:

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

όπου,

k η σταθερά του ρυθμού μικροβιακής ανάπτυξης (d⁻¹)

T η απόλυτη θερμοκρασία σε K

T_{ref} η θερμοκρασία αναφοράς που έχει ληφθεί στους 4 °C

k_{ref} η σταθερά του ρυθμού μικροβιακής ανάπτυξης στη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (d^{-1})

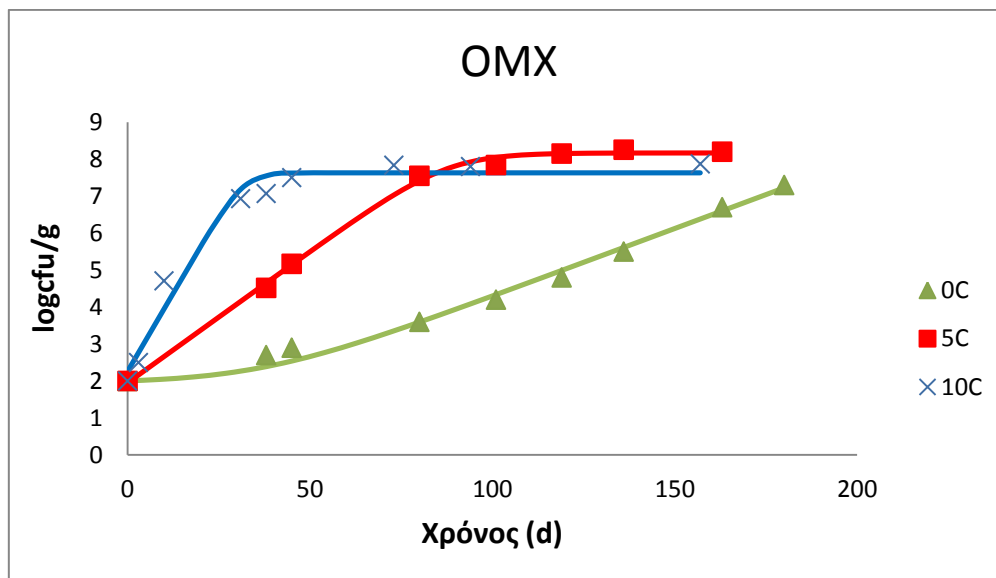
R η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($R=8,314 \text{ J/ mol} \cdot \text{K}$) και

E_A η ενέργεια ενεργοποίησης σε J/mol

Με την κατασκευή του διαγράμματος Arrhenius, όπου συσχετίστηκε με γραμμική παλινδρόμηση η τιμή $\ln k$ με το μέγεθος $(1/T_{ref}-1/T)$, υπολογίστηκαν τόσο για την ολική μικροβιακή χλωρίδα όσο και για γαλακτικά βακτήρια η ενέργεια ενεργοποίησης E_A και ο ρυθμός μικροβιακής ανάπτυξης k_{ref} στη θερμοκρασία αναφοράς.

6.3.1 Κινητική μελέτη ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας

Η μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX) συναρτήσει του χρόνου σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης (0, 5 και 10°C) παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί. Από αυτό προκύπτει η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης, καθώς και του χρόνου αποθήκευσης στο μικροβιακό φορτίο των καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων σε κενό. Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των πειραματικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi, από όπου και προέκυψαν οι εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης(k) της ολικής μικροβιακής χλωρίδας.



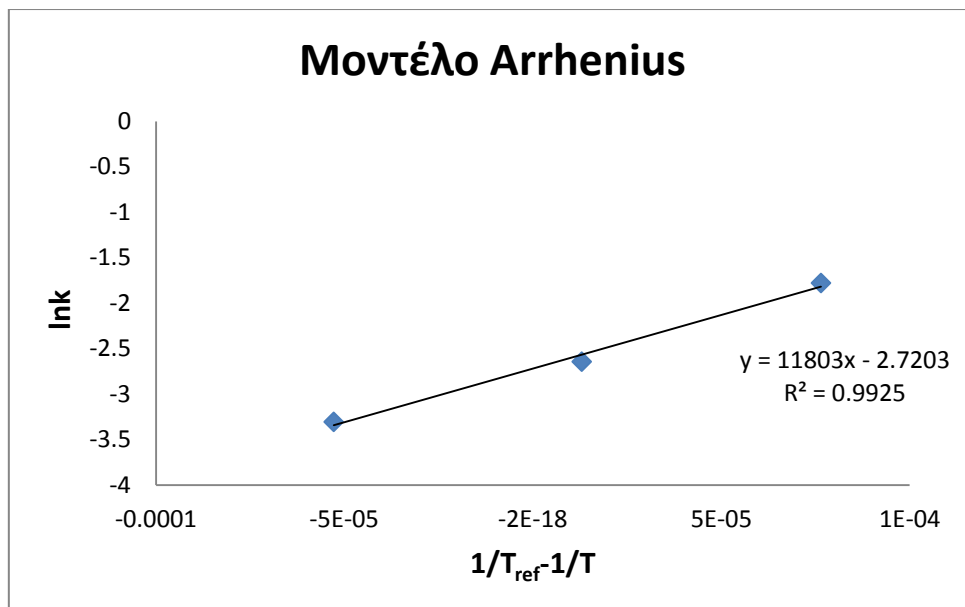
Σχήμα 6.7-Καμπύλες ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε καπνιστά φιλέτα πέστροφας συσκευασμένα υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5, και 10°C. Οι πειραματικές μετρήσεις παριστάνονται από σημεία και οι συνεχείς καμπύλες προκύπτουν από την προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi.

Παρατηρείται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε ταχύτερη ανάπτυξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Από την προσαρμογή των πειραματικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi προέκυψαν οι εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στα δείγματα συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 6.11-Σταθερές εκθετικού ρυθμού ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0,5 και 10°C

Θερμοκρασία συντήρησης(°C)	Σταθερά ρυθμού ανάπτυξης $k(d^{-1})$
0	0.037±0.023
5	0.071±0.003
10	0.169±0.028

Για να ποσοτικοποιηθεί η εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας από τη θερμοκρασία, τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.1 εφαρμόζονται στο μοντέλο Arrhenius και προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα.



Σχήμα 6.8-Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

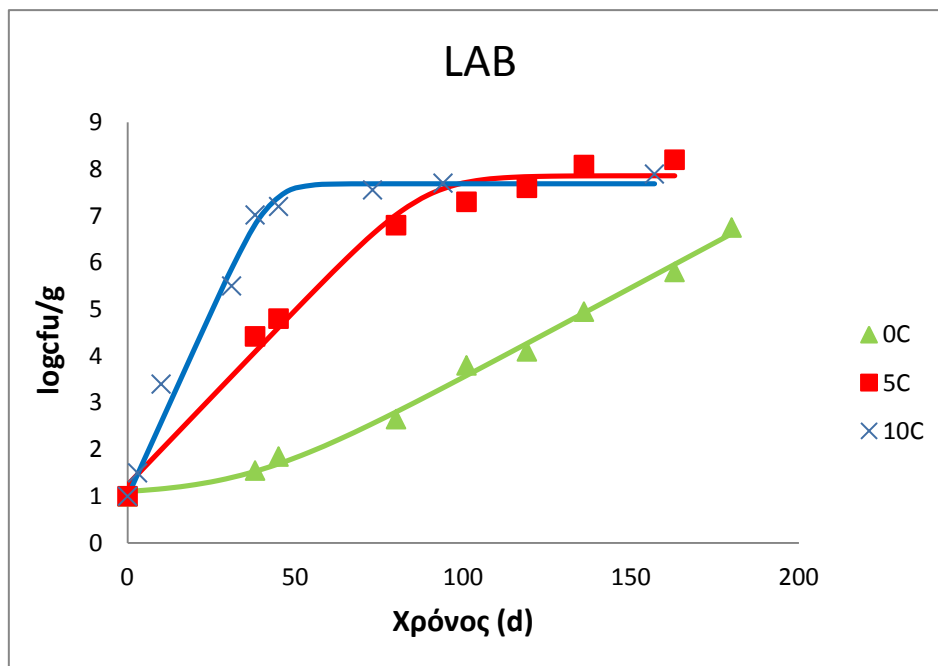
Από την παραπάνω μελέτη προέκυψαν οι παράμετροι της εξίσωσης Arrhenius (ενέργεια ενεργοποίησης, E_A , σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στη θερμοκρασία αναφοράς, k_{ref}). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.12-Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius για την ανάπτυξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό ($T_{ref}=4\text{ }^{\circ}\text{C}$)

E_A (kJ/mol)	k_{ref} (d ⁻¹)	R^2
98.1	0.066	0.993

6.3.2 Κινητική μελέτη ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων

Η μεταβολή των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) συναρτήσεως του χρόνου σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης (0, 5 και 10°C) παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί. Από αυτό προκύπτει η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης, καθώς και του χρόνου αποθήκευσης στο μικροβιακό φορτίο των καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων σε κενό. Όπως και για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των πειραματικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi, από όπου και προέκυψαν οι εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης(k) των γαλακτικών βακτηρίων.



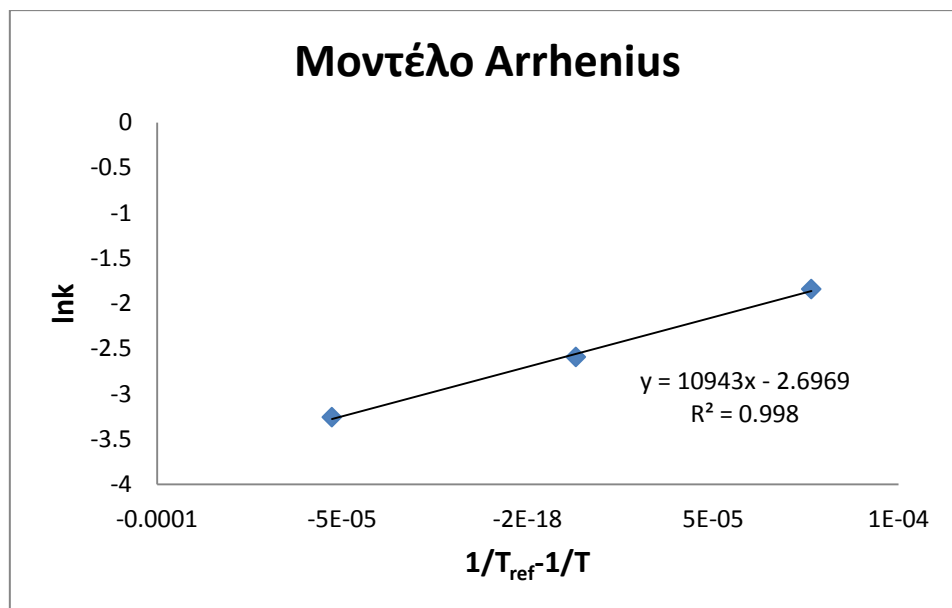
Σχήμα 6.9- Καμπύλες ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σε καπνιστά φιλέτα πέστροφας συσκευασμένα υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5, και 10°C. Οι πειραματικές μετρήσεις παριστάνονται από σημεία και οι συνεχείς καμπύλες προκύπτουν από την προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi.

Παρατηρείται και εδώ ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε ταχύτερη ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Από την προσαρμογή των πειραματικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi προέκυψαν οι εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης των LAB σε συσκευασμένα υπό κενό φιλέτα καπνιστής πέστροφας για όλες τις θερμοκρασίες μελέτης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 6.13- Σταθερές εκθετικού ρυθμού ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σε δείγματα καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0,5 και 10°C

Θερμοκρασία συντήρησης(°C)	Σταθερά ρυθμού ανάπτυξης k (d ⁻¹)
0	0.039±0.002
5	0.075±0.008
10	0.159±0.015

Για να ποσοτικοποιηθεί η εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων από τη θερμοκρασία, τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.3 εφαρμόζονται στο μοντέλο Arrhenius και προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα.



Σχήμα 6.10- Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σε δείγματα καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

Από την παραπάνω μελέτη προέκυψαν οι παράμετροι της εξίσωσης Arrhenius (ενέργεια ενεργοποίησης, E_A , σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων στη θερμοκρασία αναφοράς, k_{ref}). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.14- Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων σε δείγματα φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό ($T_{ref}=4^\circ\text{C}$)

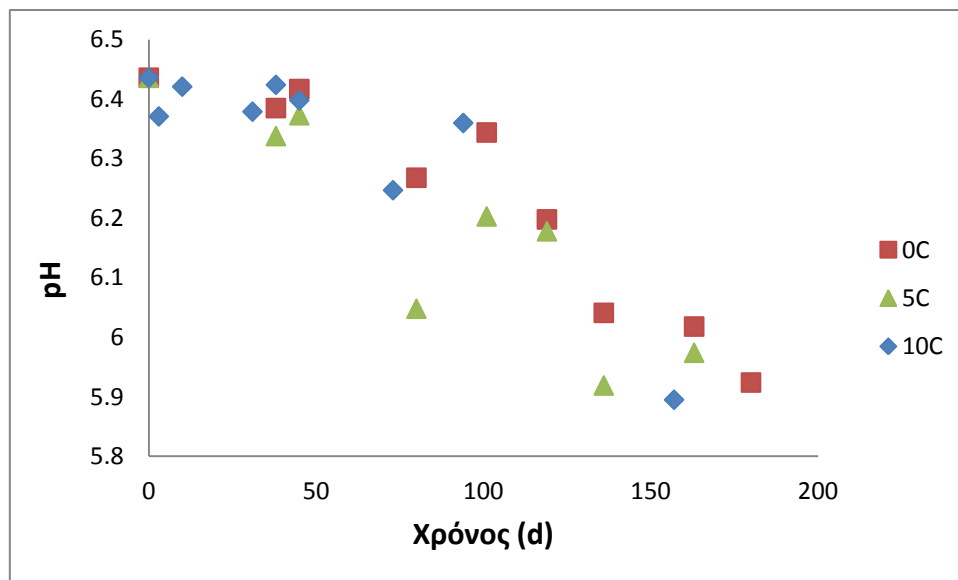
E_A (kJ/mol)	k_{ref} (d ⁻¹)	R^2
91	0.067	0.998

Σημειώνεται ότι οι τιμές των k και k_{ref} για την ολική μικροβιακή χλωρίδα και τα γαλακτικά βακτήρια είναι παραπλήσιες σε όλες τις θερμοκρασίες, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν το κλάσμα της συνολικής

μικροχλωρίδας που ευθύνεται για την αλλοίωση των συσκευασμένων σε κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας.

6.4 Μέτρηση pH

Οι μεταβολές στο pH των τροφίμων οφείλονται στα μεταβολικά προϊόντα που παράγονται κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Arvanitoyannis και Kotsanopoulos, 2011). Στο επόμενο διάγραμμα απεικονίζεται η μεταβολή του pH των μελετούμενων δειγμάτων συναρτήσει του χρόνου για όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης.



Σχήμα 6.11-Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου σε δείγματα φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

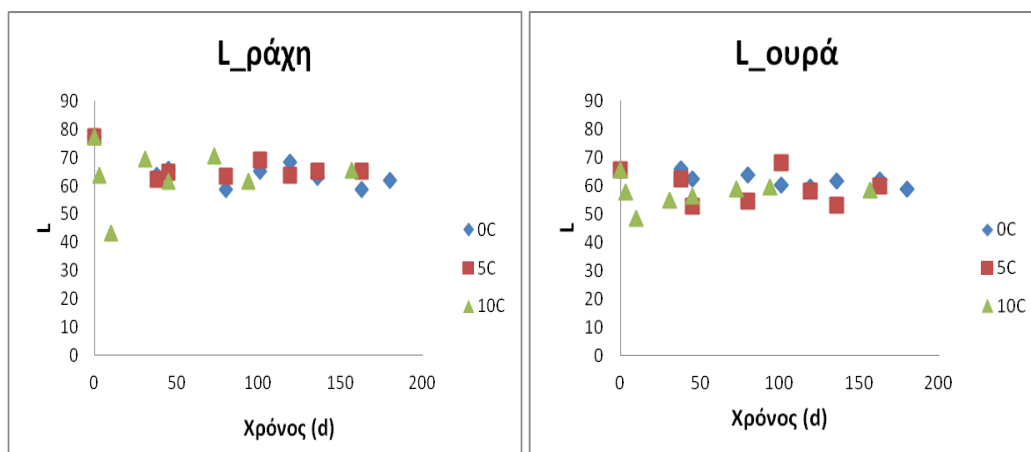
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι για όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες συντήρησης υπάρχει μία τάση μείωσης του pH με το χρόνο, ενώ δεν προκύπτει κάποιος συσχετισμός ανάμεσα στη μεταβολή του pH και τη θερμοκρασία. Η μείωση του pH των δειγμάτων με την πάροδο του χρόνου συντήρησης οφείλεται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια, που είναι ο κύριος αλλοιογόνος μικροοργανισμός. Παρόμοιες μεταβολές του pH λόγω της ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας των γαλακτικών βακτηρίων σε θερμοκρασίες συντήρησης βρέθηκαν από τους Stohr et al. (2001) και Joffraud et al. (2006) σε δείγματα σολομού ψυχρής κάπνισης συσκευασμένου υπό κενό, από την Vasileiadou (2002) σε καπνιστή τσιπούρα συσκευασμένη υπό κενό και

από τους Khanirour και Mirzakhani (2012) σε δείγματα φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας θερμής κάπνισης συσκευασμένων σε κενό και MAP.

6.5 Μέτρηση χρώματος

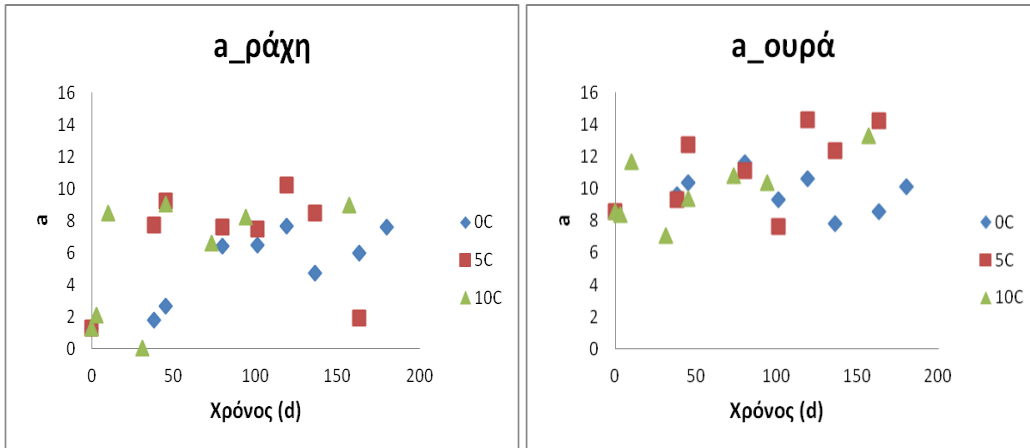
Προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, η ενόργανη μέτρηση του χρώματος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε δύο περιοχές του φιλέτου, ράχη και ουρά, καθώς ούτε τα δείγματα ήταν ακριβώς όμοια μεταξύ τους αλλά ούτε και η επιφάνεια κάθε δείγματος ήταν ομοιόμορφη σε όλη την έκτασή της.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν απεικονίζονται οι μεταβολές των παραμέτρων του χρώματος L (φωτεινότητα), a (ένταση κόκκινου χρώματος ή ερυθρότητα), b (ένταση κίτρινου χρώματος) και ΔΕ (ολική μεταβολή χρώματος) των δειγμάτων συναρτήσει του χρόνου για όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες ψύξης.

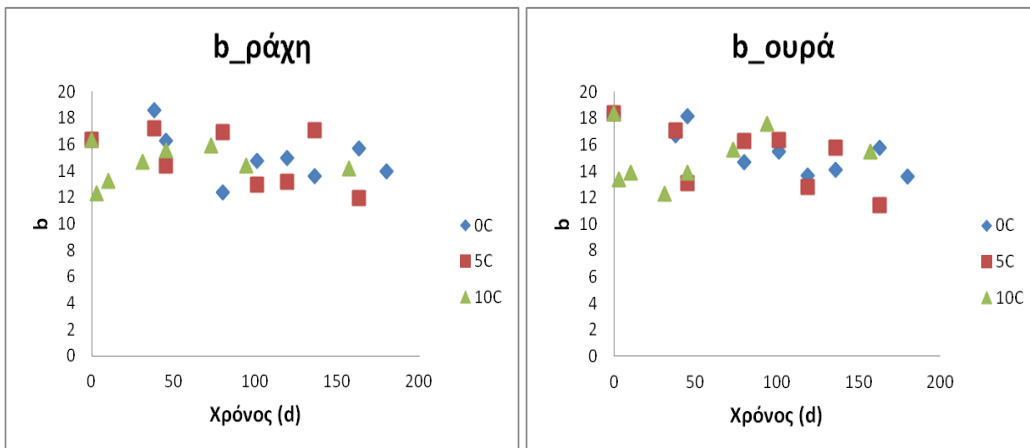


Σχήμα 6.12-Μεταβολή της φωτεινότητας συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

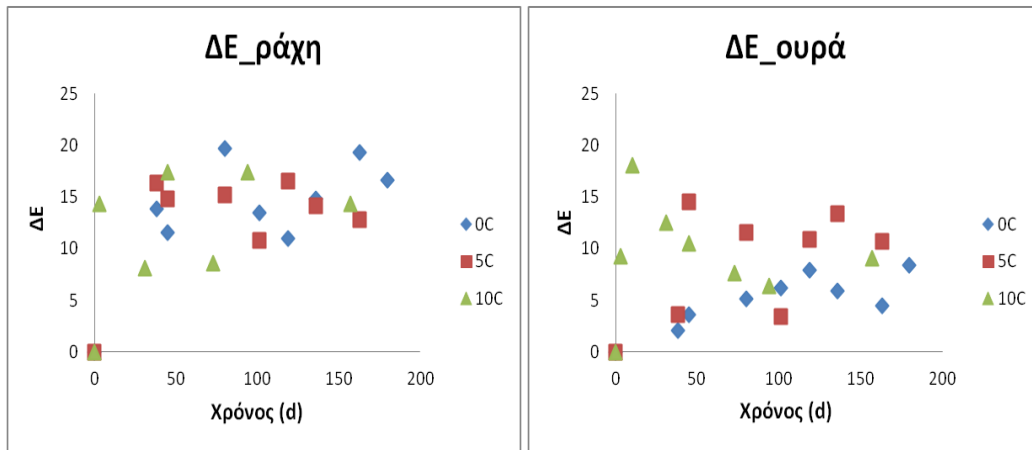


Σχήμα 6.7-Μεταβολή της έντασης του κόκκινου χρώματος συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C



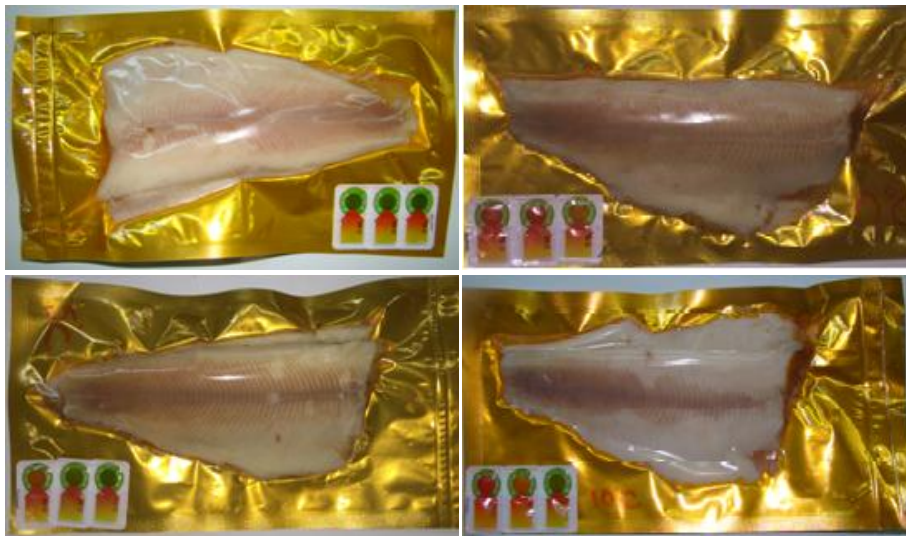
Σχήμα 6.8-Μεταβολή της έντασης του κίτρινου χρώματος συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό



Σχήμα 6.13-Συνολική μεταβολή χρώματος συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη τάση στη μεταβολή των παραμέτρων χρώματος των δειγμάτων με το χρόνο και τη θερμοκρασία συντήρησης. Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της συντήρησης πιθανόν οφείλονται είτε σε πειραματικά σφάλματα κατά τη μέτρηση του χρώματος είτε στη διαφορετικότητα των δειγμάτων.



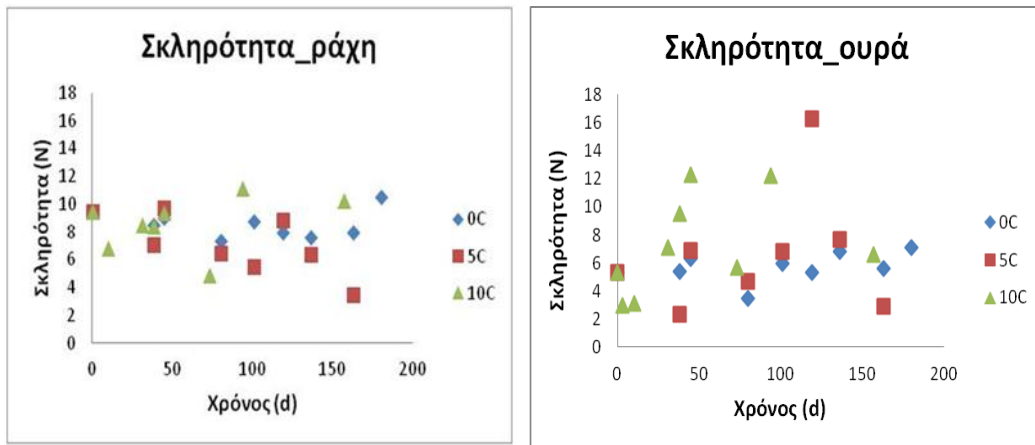
Εικόνα 6.8-Δείγματα φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένα υπό κενό

6.6 Ανάλυση υφής

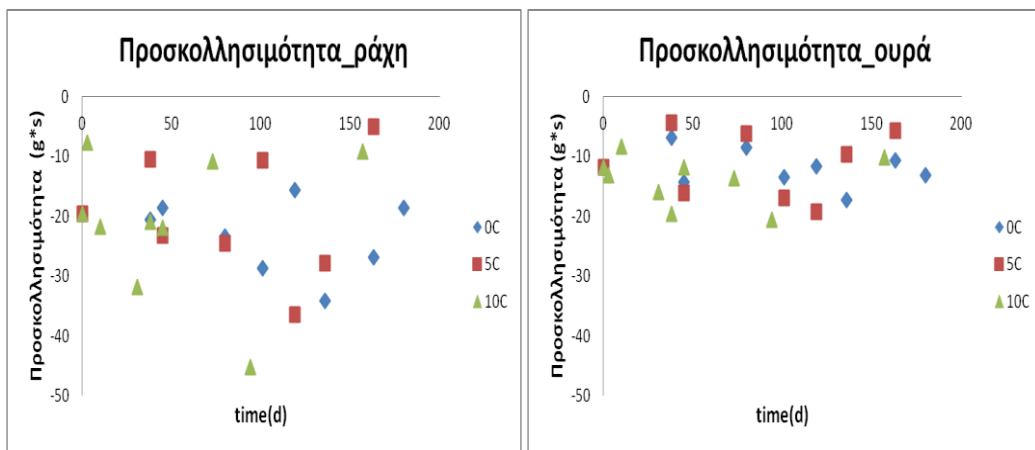
Κατά την ανάλυση υφής εξετάστηκαν η σκληρότητα, η προσκολλησιμότητα, η συνεκτικότητα και η ελαστικότητα των δειγμάτων, οι μεταβολές των οποίων συναρτήσει του χρόνου απεικονίζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν. Όπως

Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

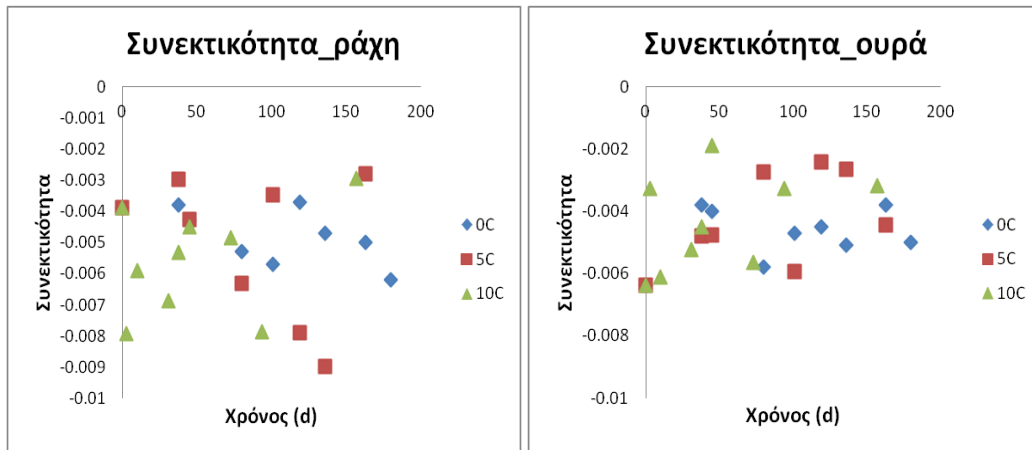
και στη μέτρηση του χρώματος, λήφθηκαν μετρήσεις από δύο διαφορετικά σημεία του φιλέτου, ράχη και ουρά, ώστε να διασφαλιστεί η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.



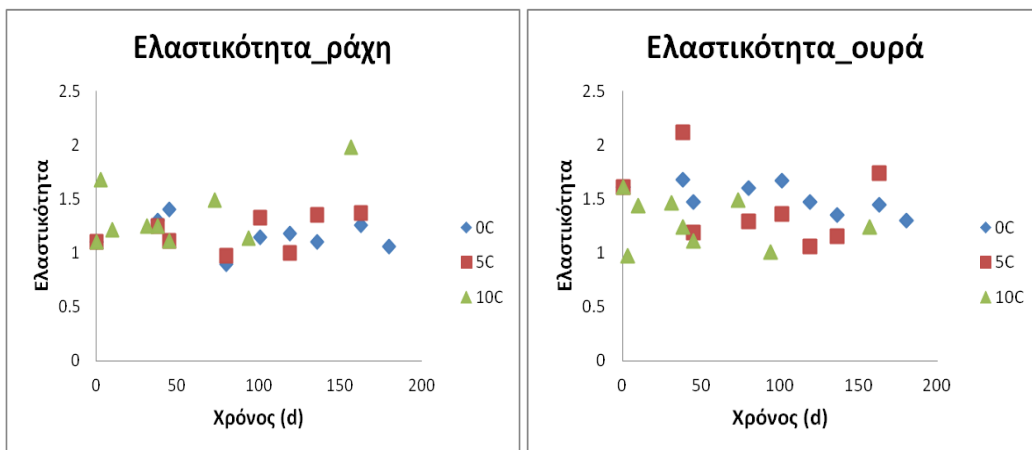
Σχήμα 6.14-Μεταβολή της σκληρότητας συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C



Σχήμα 6.15-Μεταβολή της προσκολλησιμότητας συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C



Σχήμα 6.16-Μεταβολή της συνεκτικότητας συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C



Σχήμα 6.17-Μεταβολή της ελαστικότητας συναρτήσει του χρόνου για τη ράχη και την ουρά των φιλέτων καπνιστής πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι δεν προκύπτει κάποια συσχέτιση μεταβολής της υφής των δειγμάτων με το χρόνο και τη θερμοκρασία συντήρησης. Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της συντήρησης πιθανόν οφείλονται στη διαφορετικότητα των δειγμάτων.

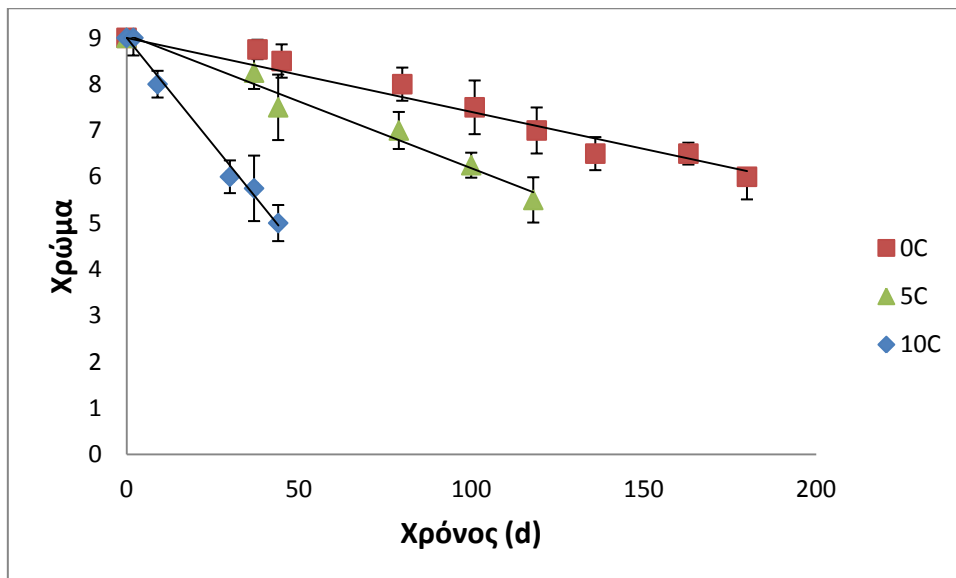
6.7 Κινητική μελέτη της μεταβολής των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

Τα επιμέρους οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό μελετήθηκαν με εφαρμογή οργανοληπτικών δοκιμών, όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 4 "Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι". Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς το χρώμα, το άρωμα, την υφή, τη γεύση, τη μετάγευση και τη συνολική εντύπωση. Για τη βαθμολόγηση χρησιμοποιήθηκε κλίμακα από το 1 έως το 9 (9: φρέσκο, 1: εμφανείς αλλοιώσεις) και ως όριο αποδοχής ορίστηκε ο βαθμός 5.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παριστάνονται οι μεταβολές στο χρώμα, το άρωμα, την υφή, τη γεύση, την μετάγευση και τη συνολική εντύπωση των δειγμάτων σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες συντήρησης (0, 5 και 10°C), όπως προέκυψαν από τις βαθμολογίες των δοκιμαστών. Η μεταβολή των οργανοληπτικών παραμέτρων των δειγμάτων με το χρόνο διατήρησης περιγράφεται ικανοποιητικά με κινητική μηδενικής τάξης σύμφωνα με την εξίσωση:

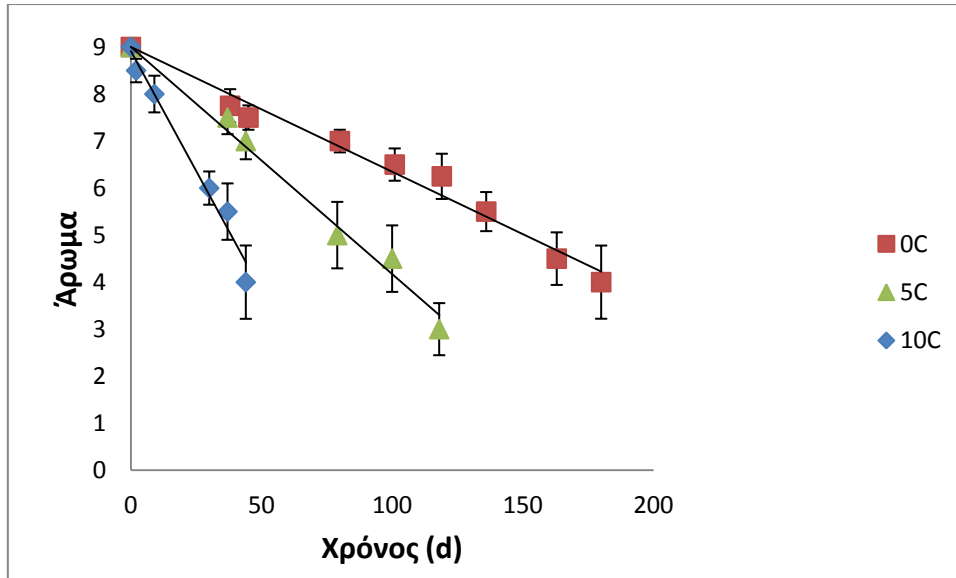
$$s = -k_{\text{sens}} t + s_0 \quad (6.3)$$

όπου k_{sens} είναι η σταθερά ρυθμού μείωσης της τιμής της βαθμολόγησης για την εκάστοτε παράμετρο, s_0 και s είναι οι τιμές της βαθμολόγησης της μελετώμενης οργανοληπτικής παραμέτρου αρχικά ($s_0 = 9$) και σε χρόνο t , αντίστοιχα. Έτσι, τα πειραματικά σημεία προσαρμόστηκαν στην παραπάνω γραμμική συνάρτηση.

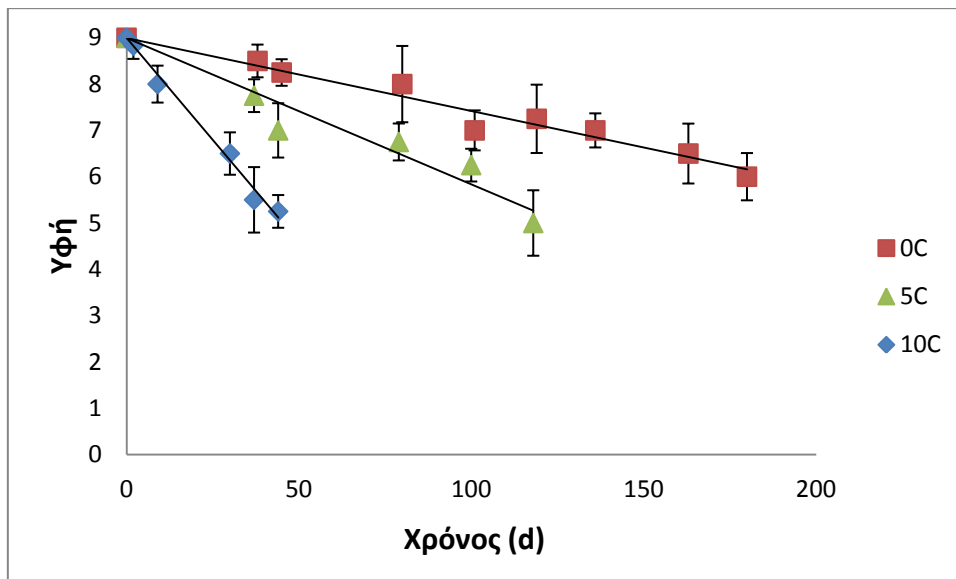


Σχήμα 6.18-Μεταβολή βαθμολογίας του χρώματος δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό συναρτήσει του χρόνου συντήρησης για θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C (μέση τιμή βαθμολόγησης 6 δοκιμαστών ± τυπική απόκλιση)

Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

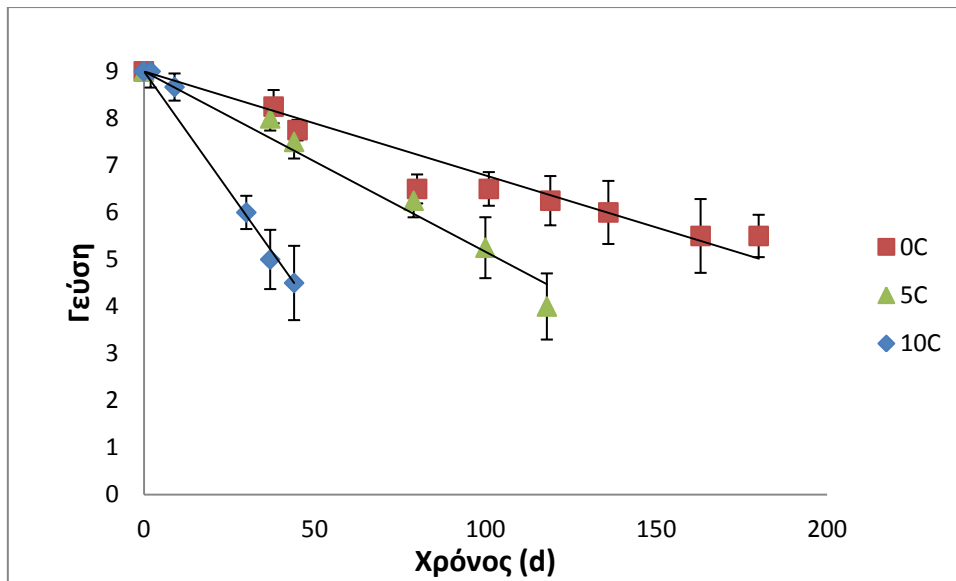


Σχήμα 6.19-Μεταβολή βαθμολογίας του αρώματος δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό συναρτήσει του χρόνου συντήρησης για θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C (μέση τιμή βαθμολόγησης 6 δοκιμαστών ± τυπική απόκλιση)

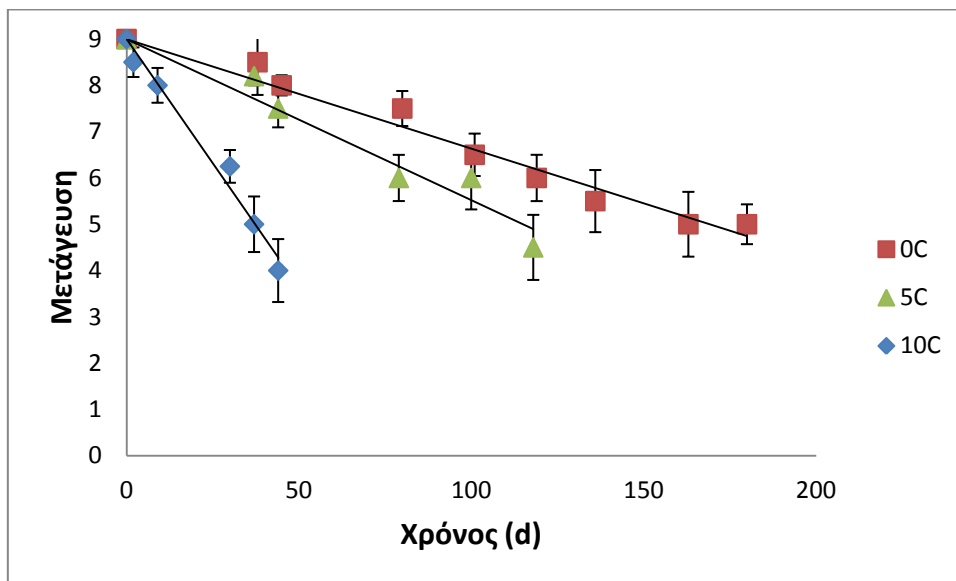


Σχήμα 6.20-Μεταβολή βαθμολογίας της υφής δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό συναρτήσει του χρόνου συντήρησης για θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C (μέση τιμή βαθμολόγησης 6 δοκιμαστών ± τυπική απόκλιση)

Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

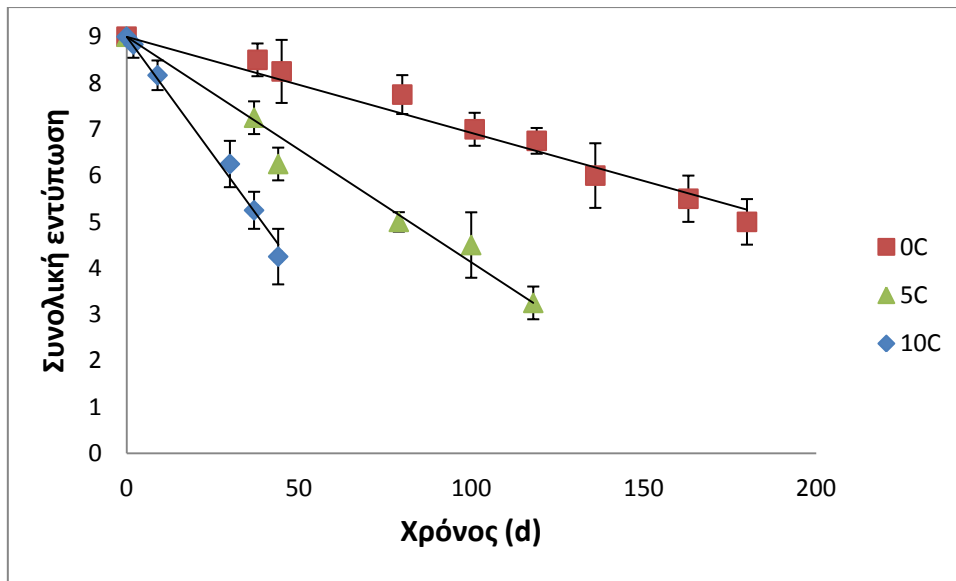


Σχήμα 6.21-Μεταβολή βαθμολογίας της γεύσης δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό συναρτήσει του χρόνου συντήρησης για θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C (μέση τιμή βαθμολόγησης 6 δοκιμαστών ± τυπική απόκλιση)



Σχήμα 6.22-Μεταβολή βαθμολογίας της μετάγευσης δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό συναρτήσει του χρόνου συντήρησης για θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C (μέση τιμή βαθμολόγησης 6 δοκιμαστών ± τυπική απόκλιση)

Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό



Σχήμα 6.23-Μεταβολή βαθμολογίας της συνολικής εντύπωσης δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό συναρτήσει του χρόνου συντήρησης για θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C (μέση τιμή βαθμολόγησης 6 δοκιμαστών ± τυπική απόκλιση)

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται σημαντική υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας με την πάροδο του χρόνου συντήρησης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης, οι υψηλές βαθμολογίες των δοκιμαστών διατηρήθηκαν για μικρότερο χρονικό διάστημα. Συνεπώς, οι δοκιμαστές διαπιστώνουν ταχύτερη υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας με την αύξηση της θερμοκρασίας ψύξης. Οι μεταβολές στο χρώμα, το άρωμα και τη γεύση αποδίδονται στην ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα μικροοργανισμών (Özogul et al., 2004; Khanirour and Mirzakhani, 2012). Οι αλλαγές στην υφή πιθανόν οφείλονται στην πρωτεόλυση από τα μικροβιακά ένζυμα των μικροοργανισμών που υπήρχαν στο καπνιστό προϊόν (Vasileiadou, 2002).

Προσαρμόζοντας τις βαθμολογίες των δοκιμαστών στην γραμμική εξίσωση (6.2) προέκυψαν οι ρυθμοί της οργανοληπτικής υποβάθμισης (k_{sens}) των δειγμάτων σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες συντήρησης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

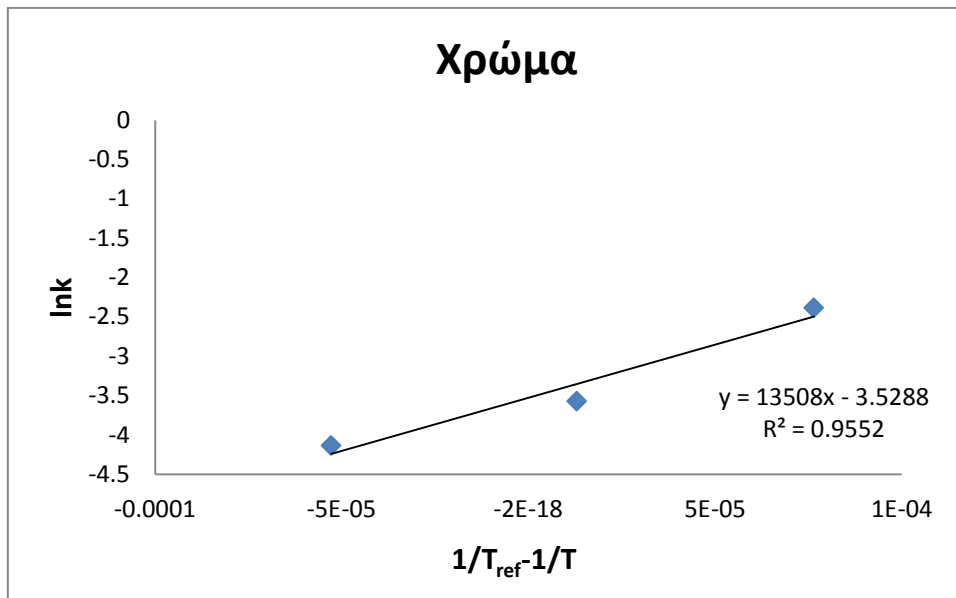
Πίνακας 6.15-Ρυθμοί υποβάθμισης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (k_{sens} , d^{-1}) των δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

T (°C)	0	5	10
Χρώμα	0.016	0.028	0.092
Άρωμα	0.027	0.048	0.105
Υφή	0.016	0.032	0.088
Γεύση	0.022	0.038	0.102
Μετάγευση	0.024	0.034	0.102

Συνολική εντύπωση	0.021	0.049	0.107
-------------------	-------	-------	-------

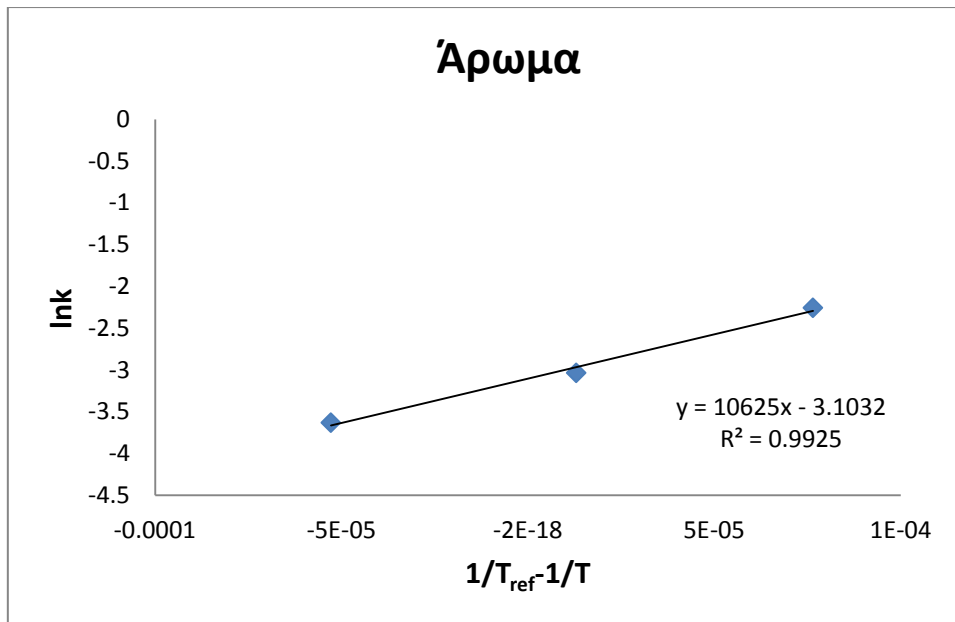
Η εξάρτηση του ρυθμού υποβάθμισης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (k_{sens}) από τη θερμοκρασία ποσοτικοποιείται με το μοντέλο Arrhenius. Όπως και στην κινητική μελέτη ανάπτυξης των μικροοργανισμών, για κάθε οργανοληπτική παράμετρο κατασκευάστηκε το διάγραμμα Arrhenius [$\ln k_{sens} \div (1/T_{ref} - 1/T)$], και με γραμμική προσαρμογή των δεδομένων προέκυψαν η ενέργεια ενεργοποίησης, E_A , και η σταθερά του ρυθμού υποβάθμισης της εκάστοτε οργανοληπτικής παραμέτρου στη θερμοκρασία αναφοράς, k_{ref} .

Τα διαγράμματα Arrhenius και τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας παρατίθενται παρακάτω.

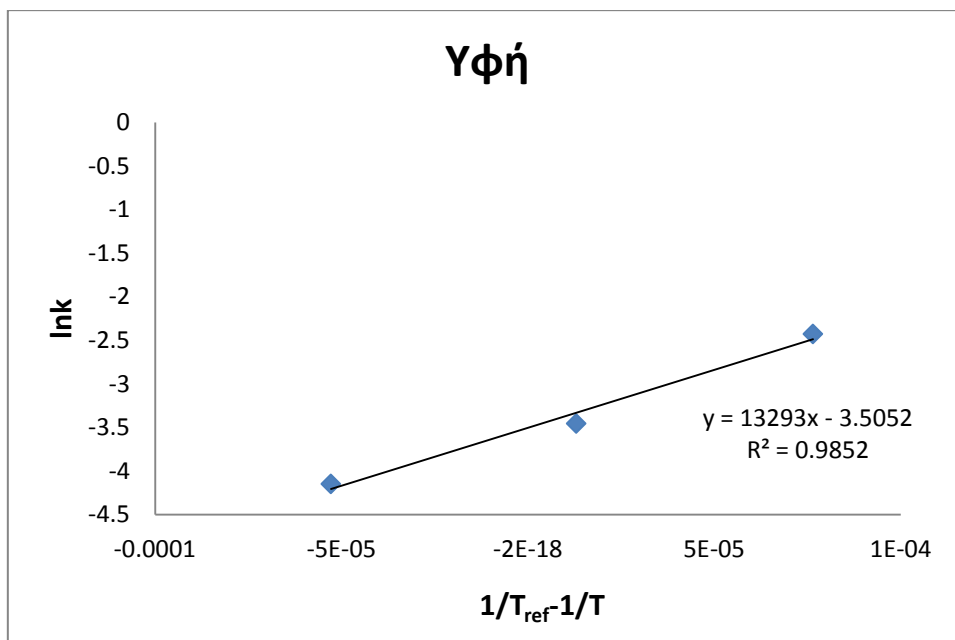


Σχήμα 6.24-Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς υποβάθμισης του χρώματος δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

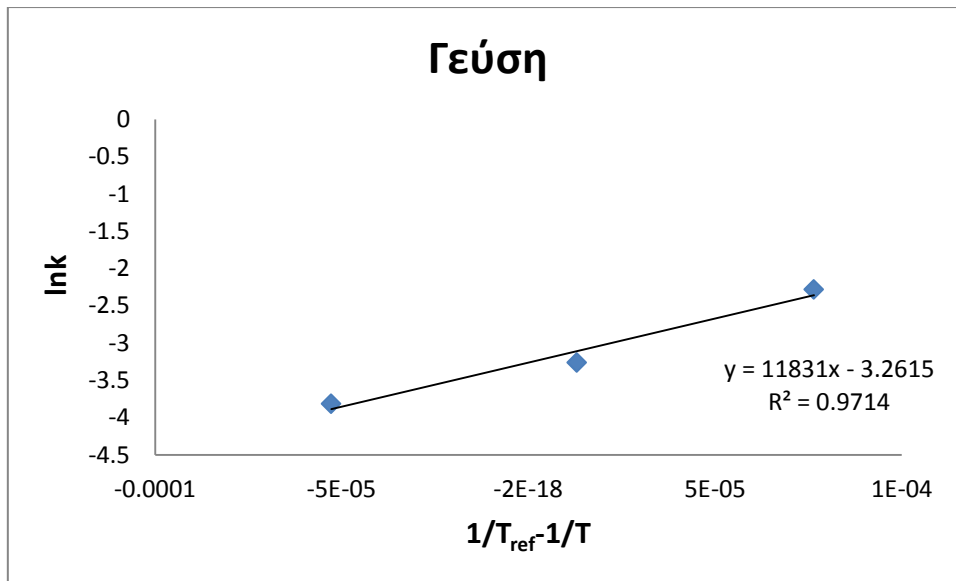


Σχήμα 6.25-Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς υποβάθμισης του αρώματος δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

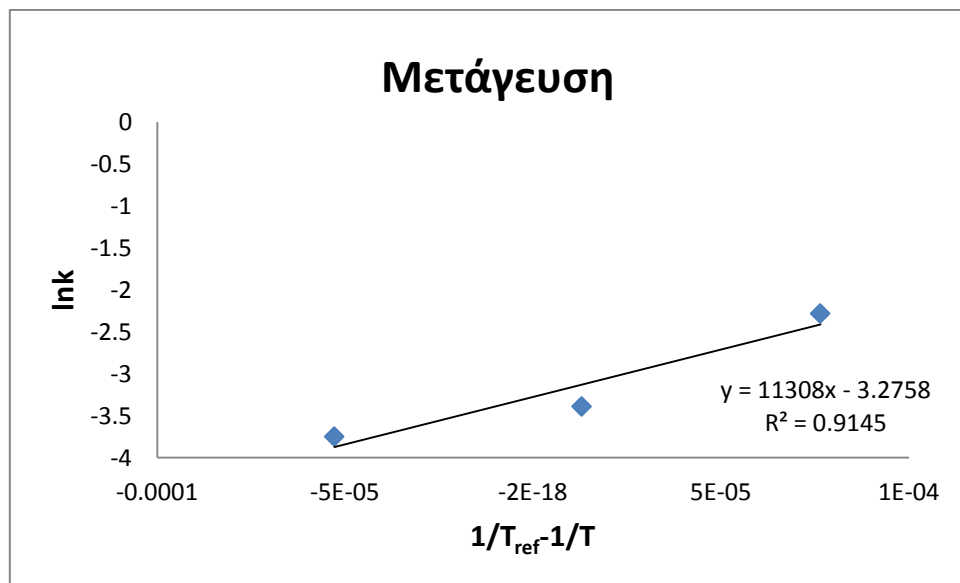


Σχήμα 6.26-Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς υποβάθμισης της υφής δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

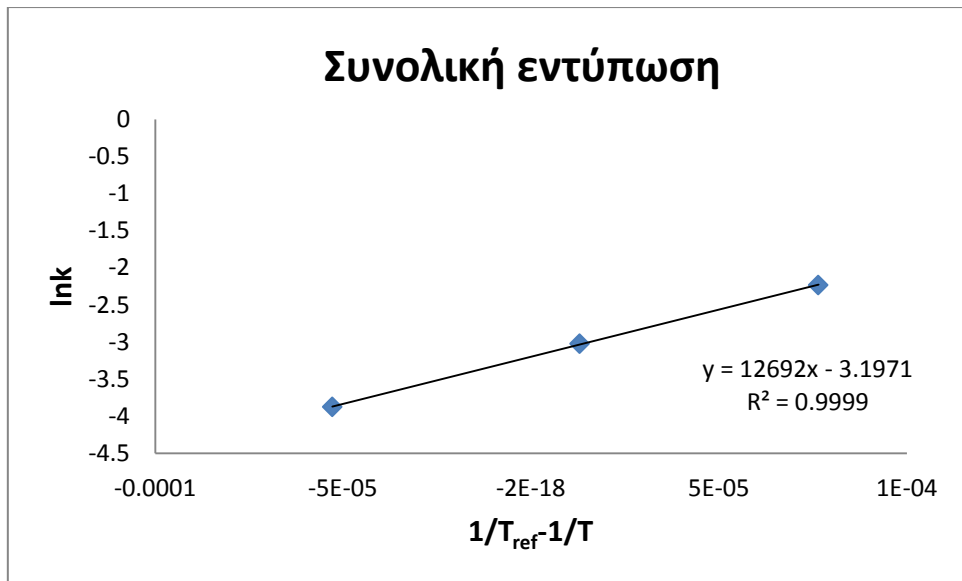
Κεφάλαιο 6 - Μελέτη της διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας
συσκευασμένων υπό κενό



Σχήμα 6.27-Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς υποβάθμισης της γεύσης δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C



Σχήμα 6.28-Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς υποβάθμισης της μετάγευσης δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C



Σχήμα 6.29-Εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στους ρυθμούς υποβάθμισης της συνολικής εντύπωσης δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες 0, 5 και 10°C

Πίνακας 6.16-Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius για την οργανοληπτική υποβάθμιση δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό ($T_{ref}=4^{\circ}C$)

	E_A (kJ/mol)	$k_{ref}(d^{-1})$	R^2
Χρώμα	112.3	0.029	0.955
Άρωμα	88.3	0.045	0.993
Υφή	110.5	0.030	0.985
Γεύση	98.4	0.038	0.971
Μετάγευση	94.0	0.038	0.915
Συνολική εντύπωση	105.5	0.041	1.000

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι η μεταβολή της βαθμολογίας για τη συνολική οργανοληπτική εντύπωση συσχετίζεται σημαντικά με τη μεταβολή του αρώματος, της γεύσης και της μετάγευσης.

Ακόμη, οι τιμές E_A του Πίνακα 6.7 δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές με τη τιμή που δίνεται στον Πίνακα 6.5 για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, υποδεικνύοντας παρόμοια εξάρτηση από τη θερμοκρασία για τους επιμέρους μελετώμενους δείκτες ποιότητας.

6.8 Προσδιορισμός της διατηρησιμότητας

Από την κινητική μελέτη της ποιοτικής υποβάθμισης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος μελέτης, κατασκευάζονται τα μοντέλα διατηρησιμότητας με βάση επιλεγμένους ποιοτικούς δείκτες του τροφίμου.

Από την στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων που προηγήθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, γίνεται αντιληπτό ότι ως κύριοι δείκτες της ποιοτικής αλλοίωσης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό μπορούν να θεωρηθούν η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Έτσι, η διάρκεια ζωής (shelf life) των καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό προσδιορίστηκε βάσει:

- ✓ της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων
- ✓ της συνολικής εντύπωσης με βάση την οργανοληπτική δοκιμή

Για τον προσδιορισμό του χρόνου ζωής βάσει της οργανοληπτικής εξέτασης τέθηκε ως όριο αποδοχής η τιμή 5 για τη συνολική εντύπωση. Δηλαδή όταν η βαθμολόγηση για τη συνολική οργανοληπτική εντύπωση του δείγματος κατέλθει του ορίου 5, τότε το δείγμα θεωρείται μη αποδεκτό οργανοληπτικά. Ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης ταυτίζεται με επίπεδα πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων 7 logcfu/g. Στη συγκεκριμένη τιμή πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων θεωρείται ότι έχουν αρχίσει να γίνονται εμφανείς οι αλλοιώσεις στο δείγμα και γι'αυτό η τιμή αυτή καθορίστηκε ως όριο αποδοχής για τον υπολογισμό του χρόνου ζωής βάσει της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Βάσει των ορίων που προσδιορίστηκαν για τον κάθε δείκτη ποιότητας και της εξάρτησης από τη θερμοκρασία των σταθερών ρυθμού ανάπτυξής τους (k) σύμφωνα με το μοντέλο Arrhenius, προκύπτουν οι παρακάτω μαθηματικές εξισώσεις, που επιτρέπουν τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής σε κάθε θερμοκρασία εντός των ορίων που εξετάστηκαν. Συνεπώς, ο χρόνος ζωής μπορεί να προσδιοριστεί βάσει της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων και της οργανοληπτικής αξιολόγησης με χρήση των εξής εξισώσεων, αντίστοιχα:

$$t_{SL} = \frac{\log N_1 - \log N_0}{k_{ref} \exp\left[-\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]} \quad (6.4)$$

$$t_{SL} = \frac{s_0 - s_1}{k_{ref,sens} \exp\left[-\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]} \quad (6.5)$$

όπου t_{SL} είναι η διάρκεια ζωής (σε ημέρες), $\log N_1$ είναι το όριο που προσδιορίζεται για το φορτίο των γαλακτικών βακτηρίων (7 logcfu/g), $\log N_0$ είναι το αρχικό φορτίο των γαλακτικών βακτηρίων, s_1 και s_0 είναι το όριο ($s_1 = 5$) και η αρχική βαθμολόγηση για τη γενική εντύπωση ($s_0 = 9$) κατά την οργανοληπτική εξέταση, k_{ref} , είναι η σταθερά ρυθμού μεταβολής των επιμέρους δεικτών ποιότητας στη θερμοκρασία

αναφοράς ($T_{ref} = 4^{\circ}\text{C}$), E_A είναι η ενέργεια ενεργοποίησης για τον κάθε δείκτη και R η παγκόσμια σταθερά των αερίων.

Πίνακας 6.17-Διάρκεια ζωής σε ημέρες καπνιστών φιλέτων πέστροφας συντηρημένων υπό κενό σε θερμοκρασίες συντήρησης 0, 5 και 10°C βάσει της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων και της συνολικής εντύπωσης κατά την οργανοληπτική εξέταση

T ($^{\circ}\text{C}$)	0	5	10
Βάσει μικροβιακής ανάπτυξης	192	80	37
Βάσει συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης	191	82	37

Οι χρόνοι ζωής φθίνουν από τις χαμηλότερες προς τις υψηλότερες θερμοκρασίες. Ακόμη, σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες παρατηρείται μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των χρόνων ζωής που προέκυψαν από τη μέτρηση του μικροβιακού φορτίου των γαλακτικών βακτηρίων και της συνολικής εντύπωσης της οργανοληπτικής δοκιμής, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και η συνολική οργανοληπτική εντύπωση αποτελούν αξιόπιστους δείκτες για τον προσδιορισμό της ποιοτικής υποβάθμισης και διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό. Οι τιμές διάρκειας ζωής που προσδιορίστηκαν είναι σε συμφωνία με την προδιαγραφή των 90 ημερών που δίνει ο παραγωγός σε θερμοκρασία συντήρησης $0-4^{\circ}\text{C}$ (www.eelgeitonas.com). Μικρότερες τιμές για τη διάρκεια ζωής θερμά καπνισμένων φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό και συντηρημένων σε θερμοκρασίες ψύξης αναφέρονται σε άλλες μελέτες (Cakli et al., 2006; Khanipour and Mirzakhani, 2012). Οι διαφοροποιήσεις αυτές πιθανόν οφείλονται σε παράγοντες όπως η προέλευση, η ποιότητα και η διαφορετική επεξεργασία της νωπής πρώτης ύλης πριν την κάπνιση καθώς και οι συνθήκες κάπνισης.

6.9 Επαλήθευση μοντέλου πρόβλεψης της αλλοίωσης συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων καπνιστής πέστροφας σε δυναμικές συνθήκες

Προκειμένου να αξιολογηθεί η εφαρμοσιμότητα του μοντέλου Arrhenius στην ψυκτική αλυσίδα, κρίθηκε σκόπιμη η διεξαγωγή πειραμάτων σε δυναμικές συνθήκες με δραστική θερμοκρασία $T_{eff}=6.9^{\circ}\text{C}$, σύμφωνα με το εξής θερμοκρασιακό σενάριο: 5 ώρες στους 5°C , 5 ώρες στους 8°C και 2 ώρες στους 10°C .

Από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων προσδιορίζονται η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και η μεταβολή της συνολικής εντύπωσης της οργανοληπτικής δοκιμής στις παραπάνω συνθήκες, και οι τιμές των σταθερών ρυθμών ανάπτυξης(k) που προκύπτουν συγκρίνονται με τις αντίστοιχες που υπολογίζονται βάσει των εξαγόμενων μοντέλων.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω σύγκρισης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 6.18-Σταθερές του ρυθμού ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων και μείωσης της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης υπολογισμένες από το εξαγόμενο μοντέλο Arrhenius($k_{\text{προβλ.}}$) και προσδιορισμένες από τα μη ισοθερμοκρασιακά πειράματα($k_{\text{πειρ.}}$) για $T_{\text{eff}}=6.9^{\circ}\text{C}$

	$k_{\text{προβλ.}} (\text{d}^{-1})$	$k_{\text{πειρ.}} (\text{d}^{-1})$	% σφάλμα
Γαλακτικά βακτήρια	0.101	0.124	-18.1
Συνολική εντύπωση οργανοληπτικής δοκιμής	0.066	0.055	-19.4

Από τα πειράματα σε δυναμικές συνθήκες προκύπτει ότι το % σφάλμα πρόβλεψης, που υπολογίζεται από τη σχέση $\% \text{σφάλμα} = 100 \cdot [(\text{πειραματική τιμή}) - (\text{τιμή πρόβλεψης}) / (\text{πειραματική τιμή})]$, είναι για όλες τις περιπτώσεις χαμηλότερο από το όριο του 20% που χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία ως κριτήριο εφαρμογής (Dalgaard et al., 1995; Gougouli et al., 2008). Το γεγονός αυτό, αποδεικνύει την ικανότητα του μοντέλου να προβλέψει την εξέλιξη, συναρτήσει του χρόνου, των μελετούμενων χαρακτηριστικών ποιότητας στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας.

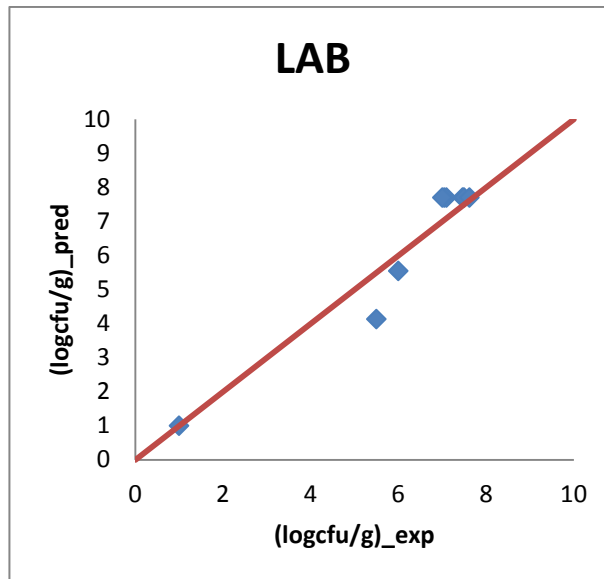
Για τη σύγκριση μεταξύ των πειραματικών και των θεωρητικών τιμών για τους επιλεγμένους ποιοτικούς δείκτες του τροφίμου κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα σύγκρισής τους. Όσο περισσότερο τείνουν τα σημεία στη διχοτόμο ευθεία του 1ου και του 3ου τεταρτημορίου του καρτεσιανού επιπέδου $y=x$, τόσο λιγότερο αποκλίνουν οι θεωρητικές από τις πειραματικές τιμές. Προκειμένου να γίνει πιο ακριβής διαπίστωση της συσχέτισης, υπολογίστηκαν ο παράγοντας ακρίβειας (accuracy factor) και ο παράγοντας μεροληψίας (bias factor), πάνω στους οποίους βασίστηκε η σύγκριση μεταξύ των πειραματικών τιμών και των θεωρητικών τιμών (όπως υπολογίστηκαν από τα ανεπτυγμένα μοντέλα Arrhenius) για τους δύο ποιοτικούς δείκτες του μελετούμενου τροφίμου. Όταν ο παράγοντας ακρίβειας είναι ίσος με 1, τότε υπάρχει τέλεια συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και των πειραματικών τιμών (Ross, 1996). Οι παράγοντες υπολογίζονται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$\text{accuracy factor} = 10^{\frac{\sum \left| \log \left(\frac{y_{\text{predicted}}}{y_{\text{experimental}}} \right) \right|}{n}} \quad (6.6)$$

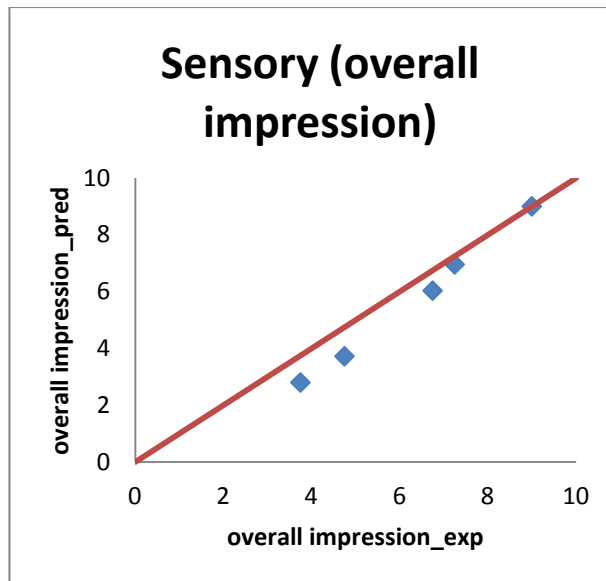
$$\text{bias factor} = 10^{\frac{\sum \log \left(\frac{y_{\text{predicted}}}{y_{\text{experimental}}} \right)}{n}} \quad (6.7)$$

όπου n: ο αριθμός των παρατηρήσεων

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι πειραματικές τιμές του φορτίου των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πρόβλεψης από το μοντέλο Arrhenius, καθώς επίσης και οι πειραματικές τιμές της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης (sensory overall impression) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πρόβλεψης από το ανεπτυγμένο μοντέλο Arrhenius.



Σχήμα 6.30-Φορτίο γαλακτικών βακτηρίων (logcfu/g) σε καπνιστά φιλέτα πέστροφας συσκευασμένα υπό κενό κατά το πείραμα προσομοίωσης της ψυκτικής αλυσίδας, συγκρινόμενο με τις τιμές πρόβλεψης από το μαθηματικό μοντέλο



Σχήμα 6.31- Βαθμολόγηση συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης σε καπνιστά φιλέτα πέστροφας συσκευασμένα υπό κενό κατά το πείραμα προσομοίωσης της ψυκτικής αλυσίδας, συγκρινόμενη με τις τιμές πρόβλεψης από το μαθηματικό μοντέλο

Πίνακας 6.19-Παράγοντες accuracy factor και bias factor που συσχετίζουν τις πειραματικές με τις θεωρητικές τιμές των δύο επιλεγμένων ποιοτικών δεικτών του τροφίμου στο εναλλασσόμενο χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ ψύξης

	accuracy factor	bias factor
Γαλακτικά βακτήρια	1.00	0.99
Συνολική εντύπωση οργανοληπτικής δοκιμής	1.00	0.87

Για να υπάρχει καλή συσχέτιση των πειραματικών με τις θεωρητικές τιμές, ο παράγοντας μεροληψίας (bias factor) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.7 (ασφαλές όριο) και 1.15 (κρίσιμο-επικύνδυνο όριο) (Ross, Dalgaard & Tienungoon, 2000).

Από τα Σχήματα 6.30 και 6.31 παρατηρείται ότι και για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και για την υποβάθμιση της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης, υπάρχει καλή συμφωνία των προβλεπόμενων τιμών με τις πειραματικές μετρήσεις, με τα σημεία να προσεγγίζουν ή να βρίσκονται πάνω στη διαγώνιο $y=x$. Επίσης, όπως φαίνεται από τον Πίνακα 6.19 οι τιμές των accuracy factor και bias factor βρίσκονται εντός των επιτρεπόμενων ορίων.

Κεφάλαιο 7

Συσχέτιση της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιοτική αλλοίωση καπνιστών φιλέτων πέστροφας για τη βελτίωση της διαχείρισης ποιότητας στην ψυκτική αλυσίδα

7.1 Εισαγωγή

Στα Κεφάλαια 5 και 6 προσδιορίστηκαν τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα, με βάση τα οποία βρέθηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (E_A , k_{ref}), καθώς και οι χρόνοι ζωής, τόσο των ΤΤΙ, όσο και των προϊόντων καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό και αποθηκευμένων σε θερμοκρασίες ψύξης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη μελέτη διατηρησιμότητας, οι κύριοι δείκτες ποιοτικής αλλοίωσης για τα καπνιστά φιλέτα πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό είναι η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και η μείωση της βαθμολογίας της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης.

Στόχος του παρόντος κεφαλαίου ήταν αφενός ο συσχετισμός της απόκρισης των μελετηθέντων ΤΤΙ με την ποιοτική αλλοίωση των δειγμάτων (βάσει της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης) έτσι ώστε να βρεθεί το κατάλληλο ενζυμικό και μικροβιακό ΤΤΙ για το εξεταζόμενο τρόφιμο, και αφετέρου από τα προσκολλημένα πάνω στη συσκευασία των προϊόντων ΤΤΙ, να ελεγχθεί η δυνατότητα εφαρμογής τους ως εργαλεία πρόβλεψης της ποιότητας και της εναπομένουσας διάρκειας ζωής των καπνιστών φιλέτων πέστροφας σε οποιοδήποτε σημείο της ψυκτικής αλυσίδας.

7.2 Συσχέτιση της διάρκειας ζωής καπνιστών φιλέτων πέστροφας με το χρόνο απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP

Για να πραγματοποιηθεί η συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης των ΤΤΙ και του χρόνου ζωής των καπνιστών φιλέτων πέστροφας, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ενέργεια ενεργοποίησης του τροφίμου και των ΤΤΙ να έχουν παραπλήσιες τιμές ($E_{A(τροφ.)} \approx E_{A(ΤΤΙ)}$). Έχει διαπιστωθεί ότι σε περίπτωση που η διαφορά των $E_{A(τροφ.)}$ και $E_{A(ΤΤΙ)}$ είναι μικρότερη από 25kJ/mol, τότε το σφάλμα στην εκτίμηση της ποιότητας θα είναι λιγότερο από 15%, το οποίο σε αρκετές περιπτώσεις είναι αποδεκτό (Ταουκίς, 2001). Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές των E_A που προέκυψαν για την υποβάθμιση της ποιότητας των καπνιστών φιλέτων πέστροφας (με βάση την συνολική οργανοληπτική εντύπωση) και τη μεταβολή της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP, όπως υπολογίστηκαν από τα μαθηματικά μοντέλα σε προηγούμενα κεφάλαια.

Κεφάλαιο 7 - Συσχέτιση της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιοτική αλλοίωση καπνιστών φιλέτων πέστροφας για τη βελτίωση της διαχείρισης ποιότητας στην ψυκτική αλυσίδα

Πίνακας 7.1-Ενέργεια ενεργοποίησης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας (βάσει της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης) και των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP

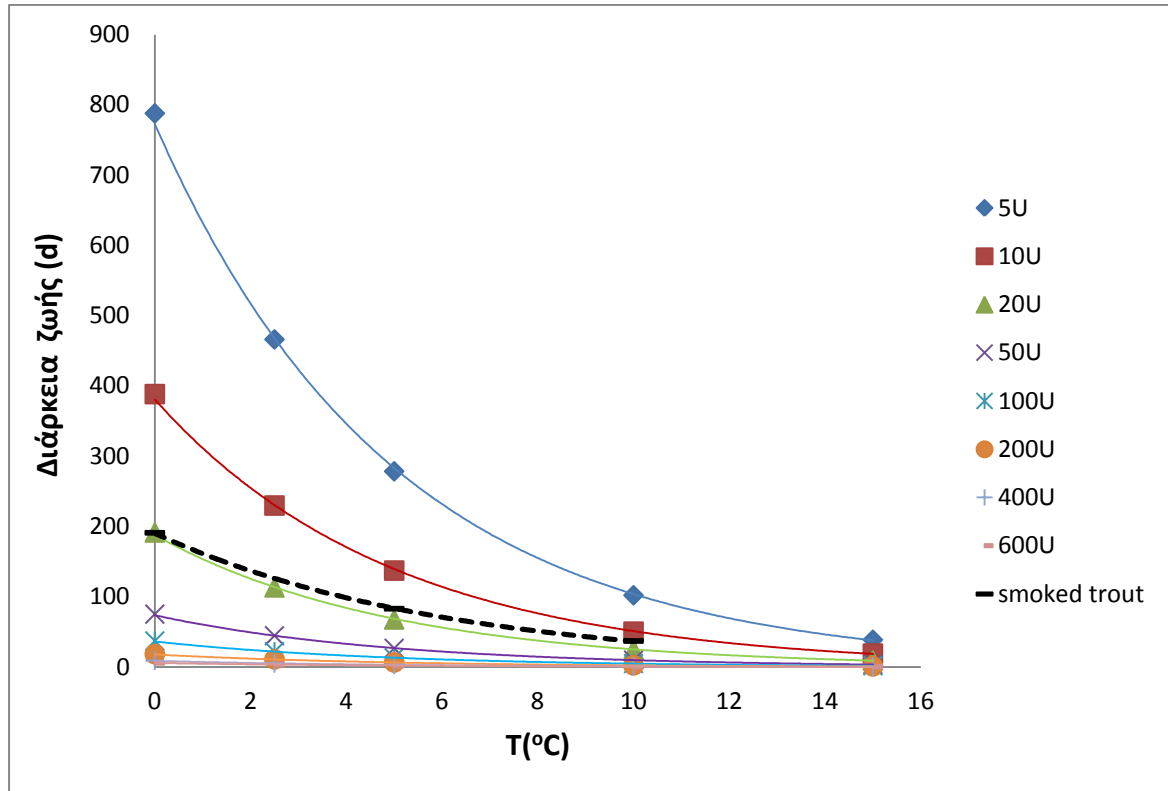
	Καπνιστά φιλέτα πέστροφας	Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP
$E_A(\text{kJ/mol})$	105.5	131.4

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται μια διαφορά μεταξύ της ενέργεια ενεργοποίησης του τροφίμου και των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP περίπου 25kJ/mol, και έτσι προκύπτει σφάλμα στην εκτίμηση της ποιότητας των καπνιστών φιλέτων πέστροφας λιγότερο από 15%, που το θεωρούμε αποδεκτό.

Συσχετίζοντας τους θεωρητικούς χρόνους απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ, όπως υπολογίστηκαν από το συνολικό μαθηματικό μοντέλο (§5.5.1), με τους πειραματικούς χρόνους ζωής (βάσει της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης) των δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας (§6.8), επιλέχθηκε το ΤΤΙ τύπου LP με την κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου για την παρακολούθηση της ποιοτικής υποβάθμισης καπνιστών και συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας σε συνθήκες ψύξης.

Η συσχέτιση των χρόνων ζωής ενζυμικών ΤΤΙ και τροφίμου παρουσιάζεται στο επόμενο διάγραμμα. Με συνεχείς γραμμές παρουσιάζονται οι χρόνοι ζωής των διαφόρων μελετώμενων ΤΤΙ και με μαύρη διακεκομμένη γραμμή οι χρόνοι ζωής του τροφίμου.

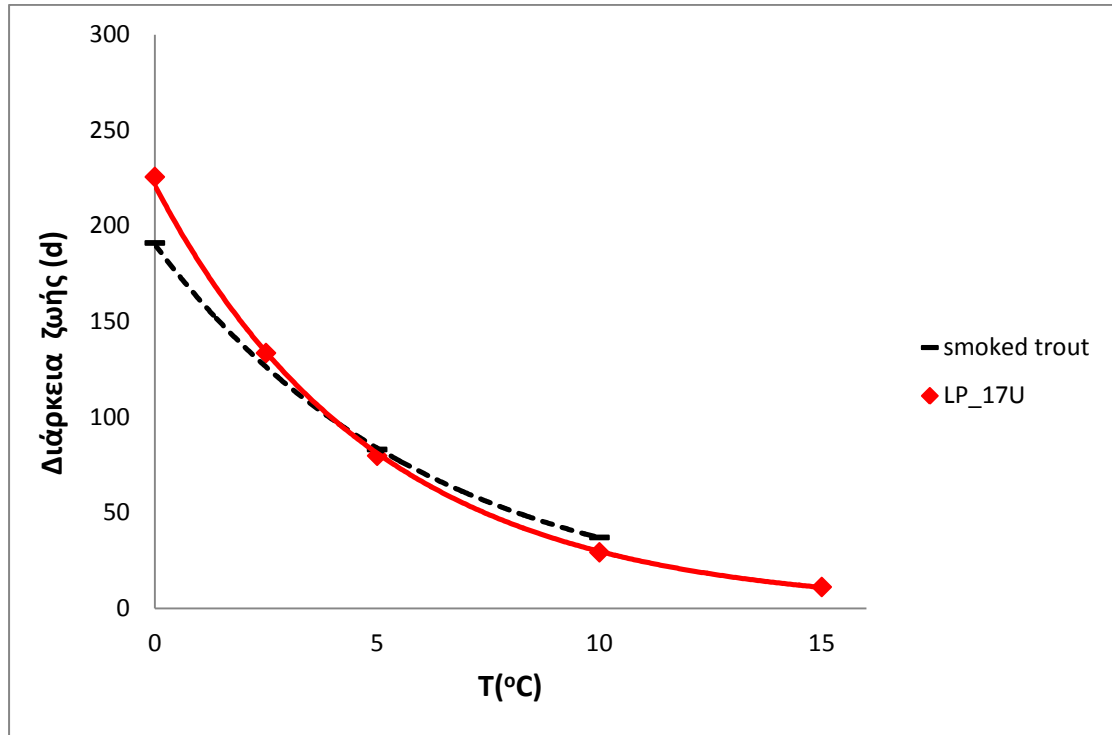
Κεφάλαιο 7 - Συσχέτιση της απόκρισης των ΤΠΙ με την ποιοτική αλλοίωση καπνιστών φιλέτων πέστροφας για τη βελτίωση της διαχείρισης ποιότητας στην ψυκτική αλυσίδα



Σχήμα 7.1-Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου απόκρισης ενζυμικών ΤΠΙ με τη διάρκεια ζωής καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι ο ενζυμικός δείκτης LP_20U ακολουθεί αρκετά καλά τη καμπύλη διατηρησιμότητας του τροφίμου. Σημειώνεται ότι στις κρίσιμες θερμοκρασιακές περιοχές ($>5^{\circ}\text{C}$) συνίσταται να επιλέγεται χρονοθερμοκρασιακός δείκτης που να δρα συντηρητικά για την προστασία του καταναλωτή, δηλαδή το τρόφιμο να έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τον δείκτη, ενώ στις χαμηλές θερμοκρασίες ($<5^{\circ}\text{C}$) η διάρκεια ζωής καθορίζεται από την αναγραφόμενη στη συσκευασία του τροφίμου ημερομηνία λήξης. Σύμφωνα με αυτό, από το συνολικό μαθηματικό μοντέλο (εξίσωση 5.8) βρέθηκε ότι ο καταλληλότερος δείκτης είναι αυτός με συγκέντρωση ενζύμου 17U.

Κεφάλαιο 7 - Συσχέτιση της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιοτική αλλοίωση καπνιστών φιλέτων πέστροφας για τη βελτίωση της διαχείρισης ποιότητας στην ψυκτική αλυσίδα



Σχήμα 7.2-Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου απόκρισης ενζυμικού ΤΤΙ LP_17U με τη διάρκεια ζωής καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

7.3 Συσχέτιση της διάρκειας ζωής καπνιστών φιλέτων πέστροφας με το χρόνο απόκρισης των μικροβιακών ΤΤΙ

Σε προηγούμενα κεφάλαια, από τα ανεπτυγμένα μαθηματικά μοντέλα υπολογίστηκαν οι τιμές των E_A για τα καπνιστά φιλέτα πέστροφας (με βάση την συνολική εντύπωση της οργανοληπτικής αξιολόγησης) και τα μικροβιακά ΤΤΙ, οι οποίες παρουσιάζονται συγκριτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7.2-Ενέργεια ενεργοποίησης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας (βάσει της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης) και των μικροβιακών ΤΤΙ

	Καπνιστά φιλέτα πέστροφας	Μικροβιακά ΤΤΙ
E_A (kJ/mol)	105.5	105.5

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ταύτιση των δύο ενεργειών ενεργοποίησης. Να σημειωθεί ότι παραπλήσιες είναι και η E_A του μικροβιακού ΤΤΙ με την E_A της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων του τροφίμου (τιμές 105.5 και 91 kJ/mol αντίστοιχα). Επιβεβαιώνεται, έτσι το πλεονέκτημα των μικροβιακών ΤΤΙ έναντι των μη μικροβιακών δεικτών, που αποδίδεται στο γεγονός ότι η απόκρισή τους (χρωματική μεταβολή) είναι το αποτέλεσμα μίας διεργασίας που προσομοιάζει

τον πραγματικό μηχανισμό ποιοτικής υποβάθμισης (μικροβιακή αλλοίωση) πολλών τροφίμων, όπως τα καπνιστά φιλέτα πέστροφας συσκευασμένα υπό κενό που μελετήθηκαν.

Συσχετίζοντας τους θεωρητικούς χρόνους απόκρισης των μικροβιακών ΤΠΙ, όπως υπολογίστηκαν από το συνολικό μαθηματικό μοντέλο (§5.5.2), με τους πειραματικούς χρόνους ζωής (βάσει της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης) των δειγμάτων καπνιστών φιλέτων πέστροφας (§6.8), θα επιλεγεί το κατάλληλο ΤΠΙ για την παρακολούθηση της ποιοτικής υποβάθμισης καπνιστών και συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας σε συνθήκες ψύξης.

Παρόλο που ΤΠΙ και τρόφιμο έχουν την ίδια ενέργεια ενεργοποίησης, διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν ως προς τη διάρκεια ζωής τους. Οι χρόνοι απόκρισης των δεικτών είναι κατά πολύ μικρότεροι από τους χρόνους ζωής των καπνιστών φιλέτων πέστροφας για όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι μικροβιακοί δείκτες πιθανόν να είναι κατάλληλοι για την παρακολούθηση και καταγραφή της ποιοτικής υποβάθμισης νωπών ιχθύων που έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής από τα καπνιστά προϊόντα.

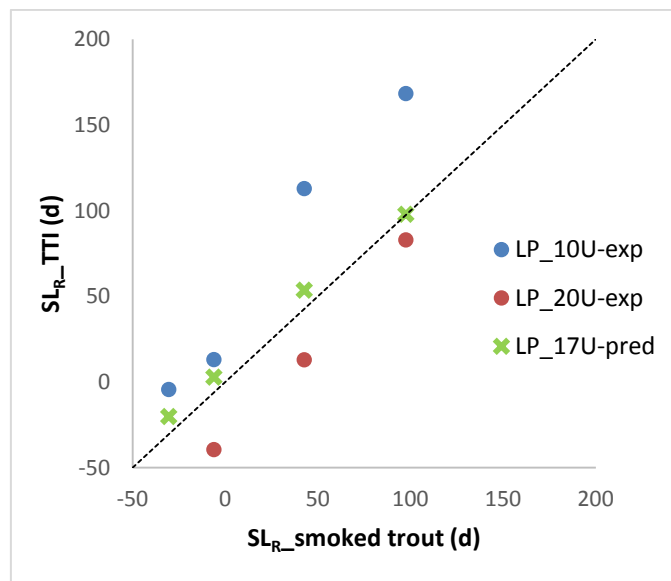
7.4 Εφαρμογή και έλεγχος αξιοπιστίας του ενζυμικού δείκτη τύπου LP για την παρακολούθηση της ποιότητας των φιλέτων καπνιστής πέστροφας στη ψυκτική αλυσίδα

Στόχος του παρόντος κεφαλαίου ήταν να αποτιμηθεί πειραματικά η δυνατότητα και η αξιοπιστία χρήσης του ενζυμικού ΤΠΙ τύπου LP, ως εργαλείο πρόβλεψης της εναπομένουσας διάρκειας ζωής των καπνιστών φιλέτων πέστροφας σε οποιοδήποτε σημείο της ψυκτικής αλυσίδας.

Η μεθοδολογία που υιοθετήθηκε για το σκοπό αυτό αφορούσε στην προσομοίωση θερμοκρασιακών συνθηκών αντιπροσωπευτικών εκείνων που επικρατούν κατά τη συντήρηση του τροφίμου. Με βάση τον αλγόριθμο εφαρμογής των ΤΠΙ (Σχήμα 3.1), με ενδιάμεσα απαραίτητα στοιχεία εισαγωγής τα κινητικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (E_A , k_{ref}), τον ποιοτικό δείκτη που σηματοδοτεί τη λήξη του τροφίμου (συνολική οργανοληπτική εντύπωση) και τα όρια αποδεκτότητάς του, η ένδειξη του ΤΠΙ μεταφράζεται τελικά σε ποιότητα και σε εναπομένουσα ζωή του τροφίμου. Η αρχή της προσέγγισης αυτής είναι η σύγκριση της προβλεπόμενης, με βάση το ΤΠΙ, εναπομένουσας διάρκειας ζωής του τροφίμου, με την πραγματική εναπομένουσα διάρκεια ζωής σε οποιοδήποτε σημείο της ψυκτικής αλυσίδας, όπως αυτή υπολογίζεται από το πραγματικό χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου και τα επαληθευμένα κινητικά μοντέλα της ποιοτικής παραμέτρου αναφοράς (στη συγκεκριμένη περίπτωση η πραγματική εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου

υπολογίστηκε βάσει του ανεπτυγμένου κινητικού μοντέλου μεταβολής της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης με όριο αποδοχής τη βαθμολόγηση με 5).

Από τα ανεπτυγμένα συνολικά μαθηματικά μοντέλα, βρέθηκε (§7.2) ότι ο καταλληλότερος ενζυμικός δείκτης ΤΤΙ τύπου LP για την παρακολούθηση της ποιότητας των συσκευασμένων υπό κενό καπνιστών φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα είναι αυτός με συγκέντρωση ενζύμου 17U. Λόγω μη διαθεσιμότητας του συγκεκριμένου δείκτη, πάνω στις συσκευασίες των καπνιστών συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας κολλήθηκαν ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP με συγκέντρωση ενζύμου 10 και 20U. Από τις πειραματικές μετρήσεις που λήφθηκαν για τα προσκολλημένα πάνω στη συσκευασία του τροφίμου ΤΤΙ για μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης, υπολογίστηκε η εναπομένουσα διάρκεια ζωής για τον κάθε ενζυμικό δείκτη. Ακολούθως, κατασκευάστηκε διάγραμμα συσχέτισης των εναπομείναντων χρόνων ζωής του τροφίμου σύμφωνα με την ένδειξη των ΤΤΙ (SL_{R_TTI}), με τους εναπομείναντες χρόνους ζωής του τροφίμου ($SL_{R_smoked\ trout}$) βάσει του κινητικού μοντέλου μεταβολής της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης με θερμοκρασίας αναφοράς $T_{ref}=4^{\circ}C$.



Σχήμα 7.3-Συσχέτιση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής του τροφίμου βάσει της ποιοτικής παραμέτρου αναφοράς (συνολική οργανοληπτική εντύπωση) με την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου βάσει των προσκολλημένων πάνω στη συσκευασία του τροφίμου ενζυμικών ΤΤΙ LP_10U και LP_20U σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες

Αναφορικά με τον δείκτη LP_10U παρατηρήθηκε ότι η εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου βάσει του συγκεκριμένου δείκτη είναι μεγαλύτερη από την πραγματική με αποτέλεσμα το τρόφιμο να θεωρείται ποιοτικά αποδεκτό ακόμη και σε χρόνους που υπερβαίνουν τη διάρκεια ζωής του. Αντίθετα, βάσει του δείκτη LP_20U το τρόφιμο θεωρείται ληγμένο αρκετό διάστημα πριν παρέλθει η

πραγματική διάρκεια ζωής του. Ως εκ τούτου, επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα που έγιναν με ΤΠΙ προσκολλημένα πάνω στις συσκευασίες των προϊόντων, ότι το ΤΠΙ που θα μπορούσε να προβλέψει αποτελεσματικά την εναπομένουσα διάρκεια ζωής των καπνιστών συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα, πρέπει να έχει συγκέντρωση μεταξύ 10 και 20U. Με χρήση του συνολικού μαθηματικού μοντέλου που κατασκευάστηκε για τους ενζυμικούς δείκτες (Εξίσωση 5.9), προσδιορίστηκε η θεωρητική εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου βάσει του δείκτη LP-17U. Στο Σχήμα 7.3 παρατηρείται, πολύ καλή συσχέτιση των εναπομείναντων χρόνων ζωής του τροφίμου βάσει της ένδειξης του συγκεκριμένου δείκτη με τους πραγματικούς εναπομείναντες χρόνους ζωής του τροφίμου για θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες. Συνεπώς, ο ενζυμικός δείκτης LP_17U, κρίθηκε κατάλληλος για την παρακολούθηση και καταγραφή του χρονο-θερμοκρασιακού ιστορικού των συσκευασμένων υπό κενό καπνιστών φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα.

Κεφάλαιο 7 - Συσχέτιση της απόκρισης των ΤΠΙ με την ποιοτική αλλοίωση καπνιστών
φιλέτων πέστοφας για τη βελτίωση της διαχείρισης ποιότητας στην ψυκτική αλυσίδα

Κεφάλαιο 8

Συνοπτική Παρουσίαση Αποτελεσμάτων-Συμπεράσματα-Προτάσεις

8.1 Συνοπτική Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Οι Χρονο-θερμοκρασιακοί Ολοκληρωτές (ΤΤΙ) αποτελούν μία πρακτική λύση για τον έλεγχο ενδεχόμενης θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης ενός προϊόντος τροφίμου κατά τη διακίνηση του στην ψυκτική αλυσίδα, καθώς μπορούν να παρακολουθήσουν και να καταγράψουν το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του σε όλα τα στάδια από την παραγωγή μέχρι το τελικό σημείο κατανάλωσης. Η οπτική τους απόκριση αποτελεί μία ένδειξη των συνθηκών θερμοκρασίας στις οποίες έχει εκτεθεί το τρόφιμο. Δύναται, έτσι, οι ΤΤΙ να χρησιμοποιηθούν επικουρικά της αμετάβλητης αναγραφόμενης ημερομηνίας ανάλωσης, ως μια δυναμική και «ενεργή» ημερομηνία λήξης που επηρεάζεται από τις πραγματικές συνθήκες διακίνησης του προϊόντος, παρέχοντας τη δυνατότητα εκτίμησης του ποιοτικού επιπέδου του τροφίμου σε κάθε στάδιο της ψυκτικής αλυσίδας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την εύρεση του κατάλληλου ενζυμικού και μικροβιακού χρονο-θερμοκρασιακού ολοκληρωτή (ΤΤΙ) για την παρακολούθηση, καταγραφή και έλεγχο της ποιότητας συσκευασμένων υπό κενό καπνιστών φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα. Προκειμένου, όμως, να συσχετισθεί η απόκριση των ΤΤΙ με την ποιοτική υποβάθμιση των καπνιστών φιλέτων πέστροφας, είναι απαραίτητη η γνώση των κινητικών χαρακτηριστικών και του χρόνου ζωής τόσο των δεικτών όσο και του τροφίμου.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη διαφόρων ενζυμικών και μικροβιακών ΤΤΙ. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν οι συναρτήσεις απόκρισης και τα κινητικά χαρακτηριστικά των δεικτών αυτών μέσω της διεξαγωγής ισοθερμοκρασιακών πειραμάτων και ελέγχθηκε η εφαρμοσιμότητα του ανεπτυγμένου μαθηματικού μοντέλου στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας μέσω πειραμάτων εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ (Variable Temperature Conditions). Τέλος, αναπτύχθηκαν τα συνολικά κινητικά μοντέλα απόκρισης των ΤΤΙ.

❖ Ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP

Κινητική μελέτη

Τα ενζυμικά ΤΤΙ που μελετήθηκαν ήταν τύπου LP με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου(σε Units) και συγκεκριμένα LP_5U, LP_10U, LP_20U, LP_50U, LP_100U, LP_200U, LP_400U και LP_600U. Η μελέτη των ΤΤΙ πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασίες ψύξης 0, 5 και 10°C.

Τα κινητικά χαρακτηριστικά (k_{1ref} , k_{2ref} , E_A) για κάθε ενζυμικό ΤΤΙ προσδιορίστηκαν με χρήση του παρακάτω μοντέλου:

$$norm(a + b) = X = F(X_c) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,ref} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2,ref} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (5.5)$$

Το μαθηματικό αυτό μοντέλο περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ από τη θερμοκρασία και το χρόνο.

Μέσω κατάλληλης στατιστικής επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων για κάθε ενζυμικό δείκτη προέκυψαν αρχικά οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 σε κάθε εξεταζόμενη θερμοκρασία, και έπειτα προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του (k_{1ref} , k_{2ref} , E_A). Στη συνέχεια, για τελικό σημείο λήξης $norm(a+b)=0.8$ (συμπέρασμα οπτικής παρατήρησης, σημείο όπου ο δείκτης αποκτά πορτοκαλί χρωματισμό), υπολογίστηκαν οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης (διάρκεια ζωής) σε ημέρες όλων των ενζυμικών ΤΤΙ για όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης. Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση τόσο της συγκέντρωσης του ενζύμου στο ΤΤΙ (σε Units) όσο και της θερμοκρασίας συντήρησης, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη. Έτσι, ο δείκτης LP_600U έχει τους μικρότερους χρόνους απόκρισης, ενώ ο δείκτης LP_5U έχει τους μεγαλύτερους χρόνους απόκρισης σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Αυτό συμβαίνει διότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου και υψηλότερες θερμοκρασίες, η ενζυμική υδρόλυση του υποστρώματος προχωράει γρηγορότερα και κατ'επέκταση η ορατή μεταβολή χρώματος.

Ακόμη, έγινε προσπάθεια ελέγχου της εφαρμοσιμότητας του κινητικού μοντέλου των ενζυμικών δεικτών τύπου LP σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η απόκριση του ενζυμικού δείκτη LP_20U σε εναλλασσόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης. Βρέθηκε πολύ καλή συσχέτιση της πειραματικής με την προβλεπόμενη από το μοντέλο συνάρτηση απόκρισης του συγκεκριμένου ΤΤΙ, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία του ανεπτυγμένου κινητικού μοντέλου στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας.

Συνολικό μαθηματικό μοντέλο ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP

Με χρήση του συνόλου των αποτελεσμάτων από την κινητική μελέτη προσδιορίστηκε το συνολικό μαθηματικό μοντέλο των ενζυμικών ΤΠΙ τύπου LP, το οποίο περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης των ενζυμικών ΤΠΙ τύπου LP από τη θερμοκρασία T (K), το χρόνο t (d) και τη συγκέντρωση ενζύμου C (Units).

Το συγκεκριμένο συνολικό μοντέλο περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

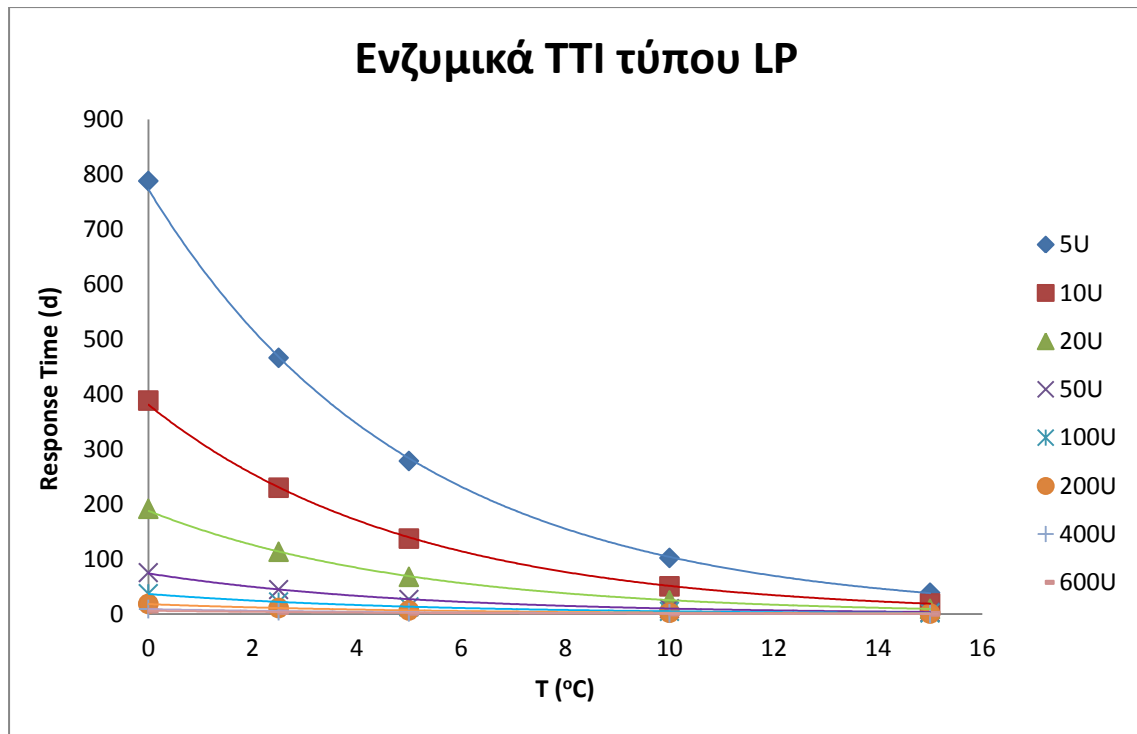
$$norm(a + b) = X = F(Xc) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,ref} * C^{-a} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2,ref} * C^{-b} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (5.8)$$

Οι παράμετροι του συνολικού κινητικού μοντέλου προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης (SYSTAT 10.2 Statistics 2002, SPCC Inc., Chicago, III, USA) και απεικονίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1- Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΠΙ τύπου LP ($T_{ref}=4^{\circ}C$)

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή
E_A (kJ/mol)	131.4
$k_{1,ref}$ (d)	1052.7
$k_{2,ref}$ (d)	514.8
a	0.996
b	1.062
R^2	0.875

Εφαρμόζοντας την εξίσωση (5.8) για διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης και για διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου υπολογίστηκε η θεωρητική διάρκεια ζωής κάθε δείκτη. Από τα αποτελέσματα κατασκευάστηκαν οι καμπύλες του χρόνου απόκρισης των ενζυμικών ΤΠΙ τύπου LP συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης ενζύμου, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1- Θεωρητικοί χρόνοι απόκρισης σε ημέρες των LP-ενζυμικών ΤΤΙ συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης ενζύμου

Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας και την αύξηση της συγκέντρωσης ενζύμου, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη.

Η αξιοπιστία του συνολικού μαθηματικού μοντέλου για τα ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των θεωρητικών με τους πειραματικούς χρόνους απόκρισης των δεικτών από όπου βρέθηκε αρκετά καλή συσχέτιση.

❖ Μικροβιακά ΤΤΙ

Κινητική μελέτη

Τα μικροβιακά ΤΤΙ που μελετήθηκαν είχαν διαφορετικό αρχικό επίπεδο εμβολίου μικροοργανισμού και συγκεκριμένα 1 logCFU/ml, 2 logCFU/ml, 5 logCFU/ml. Σημειώνεται ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο αναφέρεται ως log1, log2 και log5. Η μελέτη των ΤΤΙ πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασίες ψύξης 0, 5 και 10°C.

Τα κινητικά χαρακτηριστικά (α , k_{1ref} , k_{2ref} , E_A) για κάθε μικροβιακό ΤΤΙ προσδιορίστηκαν με χρήση του παρακάτω μοντέλου:

$$\Delta E = \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,ref} \cdot \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2,ref} \cdot \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (5.6)$$

Το μαθηματικό αυτό μοντέλο περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης των μικροβιακών ΤΠΙ από τη θερμοκρασία και το χρόνο.

Όπως και στους ενζυμικούς δείκτες, μέσω κατάλληλης στατιστικής επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων για κάθε μικροβιακό ΤΠΙ προέκυψαν αρχικά η παράμετρος a και οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 σε κάθε εξεταζόμενη θερμοκρασία, και έπειτα προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του (a , $k_{1,ref}$, $k_{2,ref}$, E_A). Στη συνέχεια, για τελικό σημείο λήξης $\Delta E=25$ (συμπέρασμα οπτικής παρατήρησης, σημείο όπου ο δείκτης αποκτά κίτρινο χρωματισμό), υπολογίστηκαν οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης (διάρκεια ζωής) σε ημέρες όλων των μικροβιακών ΤΠΙ στις εξεταζόμενες θερμοκρασίες ψύξης. Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση τόσο του αρχικού επιπέδου εμβολίου του μικροοργανισμού στο ΤΠΙ όσο και της θερμοκρασίας διεξαγωγής του πειράματος, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στα υψηλότερα επίπεδα αρχικού εμβολίου και υψηλότερες θερμοκρασίες, ο μικροοργανισμός προσεγγίζει τα μέγιστα επίπεδα του πληθυσμού (υψηλή παραγωγή γαλακτικού οξέος, χαμηλές τιμές pH) σε συντομότερο χρόνο. Συνεπώς, γρηγορότερη θα είναι η πτώση του pH και η απόκριση (μεταβολή χρώματος) του ΤΠΙ και κατ'επέκταση συντομότεροι οι χρόνοι απόκρισης του δείκτη.

Η εφαρμοσιμότητα του ανεπτυγμένου κινητικού μοντέλου στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας ελέγχθηκε μέσω σύγκρισης της πειραματικής με την προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη \log_1 για εναλλασσόμενο θερμοκρασιακό προφίλ. Παρατηρήθηκε ότι η πειραματική απόκριση του δείκτη βρίσκεται εντός των αποδεκτών οριακών αποκρίσεων και μάλιστα εμφανίζει αρκετά καλή συσχέτιση με την προβλεπόμενη από το μοντέλο απόκριση. Κατά αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώθηκε η αξιοπιστία του κινητικού μοντέλου στις εναλλασσόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες της ψυκτικής αλυσίδας.

Συνολικό μαθηματικό μοντέλο μικροβιακών ΤΠΙ

Με χρήση του συνόλου των αποτελεσμάτων από την κινητική μελέτη προσδιορίστηκε το συνολικό μαθηματικό μοντέλο των μικροβιακών ΤΠΙ, το οποίο περιγράφει την εξάρτηση της απόκρισης των μικροβιακών ΤΠΙ από τη θερμοκρασία T (K), το χρόνο t (d) και το αρχικό επίπεδο εμβολίου μικροοργανισμού C ($\log\text{CFU/ml}$).

Το συγκεκριμένο συνολικό μοντέλο περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

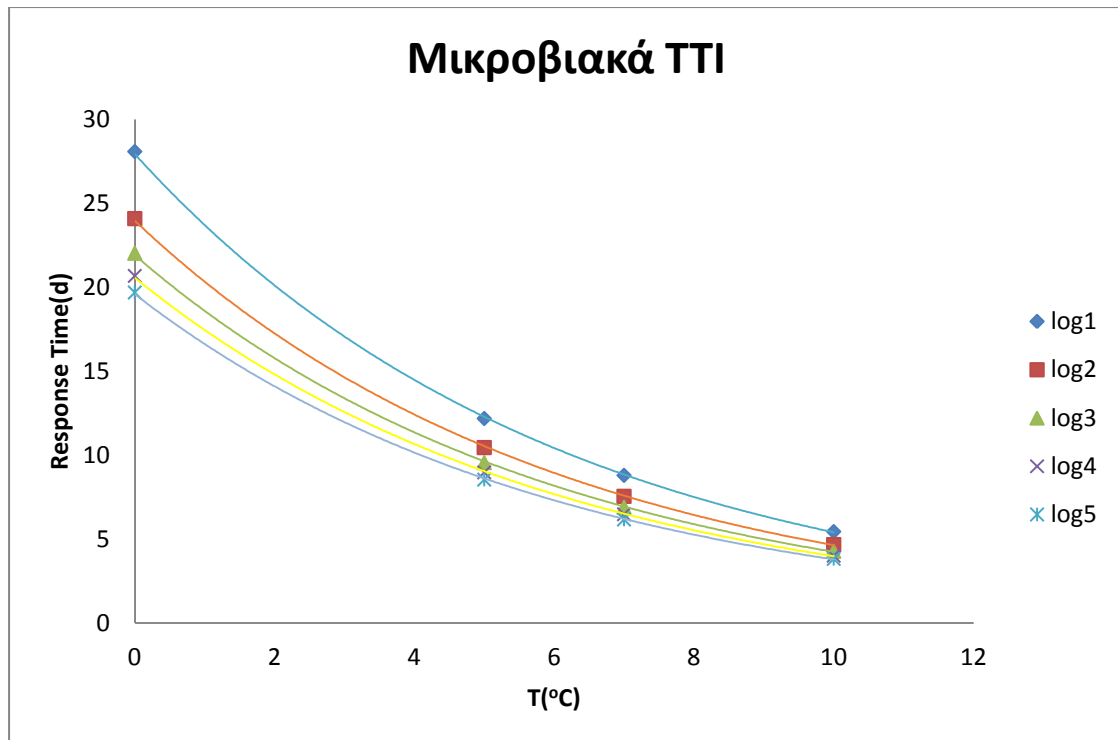
$$\Delta E = \frac{\alpha}{1 + \exp\left(\frac{k_{1,\text{ref}} * C^{-b} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right] - t}{k_{2,\text{ref}} * C^{-c} * \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right]}\right)} \quad (5.10)$$

Οι παράμετροι του συνολικού κινητικού μοντέλου προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης (SYSTAT 10.2 Statistics 2002, SPCC Inc., Chicago, III, USA) και απεικονίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2- Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των μικροβιακών ΤΠΙ ($T_{\text{ref}}=4^{\circ}\text{C}$)

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή
E_A (kJ/mol)	105.5
$k_{1\text{ref}}$ (d)	13.8
$k_{2\text{ref}}$ (d)	2.3
α	44.8
b	0.229
c	0.036
R^2	0.895

Εφαρμόζοντας την εξίσωση (5.10) για διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης και για διαφορετικά επίπεδα αρχικού εμβολίου μικροοργανισμού υπολογίστηκε η θεωρητική διάρκεια ζωής κάθε δείκτη. Από τα αποτελέσματα κατασκευάστηκαν οι καμπύλες του χρόνου απόκρισης των μικροβιακών ΤΠΙ συναρτήσει της θερμοκρασίας και του αρχικού εμβολίου μικροοργανισμού, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2- Θεωρητικοί χρόνοι απόκρισης σε ημέρες των μικροβιακών ΤΤΙ συναρτήσει της θερμοκρασίας και του αρχικού μικροβιακού επιπέδου εμβολίου

Παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας και την αύξηση της συγκέντρωσης του βακτηριακού στελεχούς στο αρχικό εμβόλιο, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη.

Από τη σύγκριση των πειραματικών με τους προβλεπόμενους από το συνολικό μαθηματικό μοντέλο χρόνους απόκρισης των δεικτών παρατηρήθηκε πολύ καλή συσχέτιση, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία του συνολικού μαθηματικού μοντέλου για τα μικροβιακά ΤΤΙ.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της αλλοίωσης καπνιστών φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) συσκευασμένων υπό κενό σε θερμοκρασίες ψύξης 0, 5 και 10°C και επαλήθευση των εξαγόμενων μοντέλων πρόβλεψης της ποιοτικής τους υποβάθμισης σε εναλλασσόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες, οι οποίες προσομοιάζουν τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας.

Μελέτη διατηρησιμότητας καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

Από την κινητική μελέτη της ποιοτικής αλλοίωσης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό βρέθηκε ότι ο κύριος αλλοιογόνος

μικροοργανισμός είναι τα γαλακτικά βακτήρια (LAB). Η συσκευασία σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου (κενό) παρεμποδίζει κατά τη συντήρηση των καπνιστών προϊόντων την ανάπτυξη των κοινών αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών, ενώ ευνοεί την ανάπτυξη προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών, όπως είναι τα γαλακτικά βακτήρια.

Ως δείκτες της ποιοτικής υποβάθμισης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας θεωρήθηκαν η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και η συνολική οργανοληπτική εντύπωση. Η επίδραση της θερμοκρασίας στους ρυθμούς μεταβολής των δύο αυτών δεικτών ποιότητας μοντελοποιήθηκε με τη σχέση Arrhenius από την οποία και εξήχθησαν τα κινητικά τους χαρακτηριστικά (k_{ref} , E_A). Για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε τιμή ρυθμού ανάπτυξης στη θερμοκρασία αναφοράς ($T_{ref}=4^{\circ}C$) k_{ref} ίση με $0.067 d^{-1}$ και τιμή ενέργειας ενεργοποίησης E_A ίση με $91 kJ/mol$ ενώ για την υποβάθμιση της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης βρέθηκαν τιμές $0.041 d^{-1}$ και $105.5 kJ/mol$ αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η διατηρησιμότητα των καπνιστών φιλέτων πέστροφας στις μελετούμενες θερμοκρασίες ψύξης βάσει των δύο επιλεγμένων ποιοτικών δεικτών. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3-Διάρκεια ζωής σε ημέρες καπνιστών φιλέτων πέστροφας συντηρημένων υπό κενό σε θερμοκρασίες συντήρησης 0, 5 και $10^{\circ}C$ βάσει της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων (όριο= $7 \log cfu/g$) και της συνολικής εντύπωσης κατά την οργανοληπτική εξέταση (όριο= βαθμολόγηση 5 για τη συνολική εντύπωση)

T ($^{\circ}C$)	0	5	10
Βάσει μικροβιακής ανάπτυξης	192	80	37
Βάσει συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης	191	82	37

Παρατηρείται ότι οι χρόνοι ζωής φθίνουν από τις χαμηλότερες προς τις υψηλότερες θερμοκρασίες. Ακόμη, σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες εμφανίζεται ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των χρόνων ζωής που προέκυψαν από τη μέτρηση του μικροβιακού φορτίου των γαλακτικών βακτηρίων και της συνολικής εντύπωσης της οργανοληπτικής δοκιμής. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι όταν ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων φτάνει στο ανώτατο αποδεκτό όριο αρχίζουν να γίνονται εμφανείς οι αλλοιώσεις στο τρόφιμο και συνεπώς να απορρίπτεται οργανοληπτικά από τους καταναλωτές.

Τέλος, από τα μη ισοθερμοκρασιακά πειράματα επιβεβαιώθηκε η αξιοπιστία και η δυνατότητα των εξαγόμενων μαθηματικών μοντέλων για τους δύο δείκτες ποιότητας να προβλέψουν την ποιοτική αλλοίωση των καπνιστών φιλέτων πέστροφας στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας. Το σφάλμα

πρόβλεψης και για τους δύο δείκτες ποιότητας ήταν μικρότερο από το όριο του 20% που χρησιμοποιείται ως κριτήριο εφαρμογής στη βιβλιογραφία (Dalgaard et al., 1995; Gougouli et al., 2008).

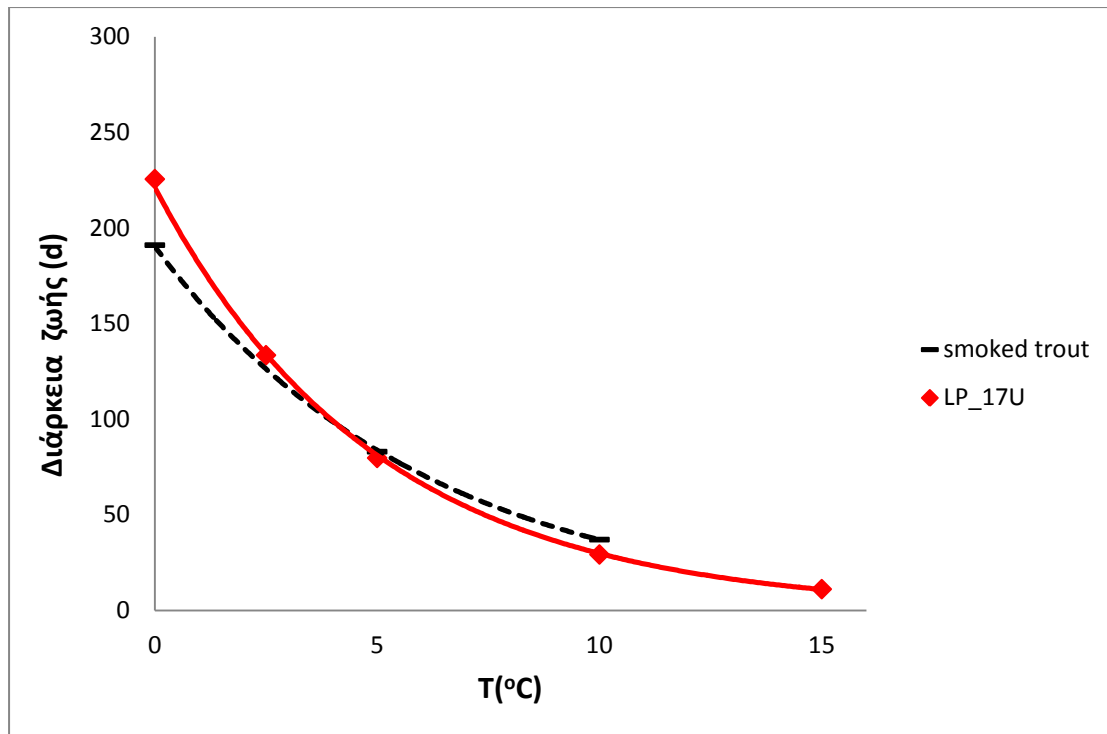
Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της εργασίας επιλέχθηκε το κατάλληλο ενζυμικό και μικροβιακό ΤΤΙ που θα μπορεί να καταγράφει το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό και να υποδεικνύει ενδεχόμενη θερμοκρασιακή κακομεταχείριση των καπνιστών φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στη ψυκτική αλυσίδα.

Συσχέτιση της απόκρισης των ΤΤΙ με την ποιοτική αλλοίωση καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η συσχέτιση της απόκρισης των ΤΤΙ με τη ποιότητα των καπνιστών φιλέτων πέστροφας, είναι τρόφιμο και ΤΤΙ να έχουν παραπλήσιες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης και παραπλήσιους χρόνους ζωής.

Συγκρίνοντας την E_A των ενζυμικών ΤΤΙ με την E_A του τροφίμου (βάσει συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης) προέκυψε μια διαφορά της τάξης των 25kJ/mol, που θεωρείται αποδεκτή (Ταουκίς, 2001).

Με βάση το συνολικό μαθηματικό μοντέλο που προέκυψε για τα ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP και λαμβάνοντας υπόψιν τους χρόνους ζωής των προϊόντων (βάσει συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης), καταλληλότερος ενζυμικός δείκτης για τα καπνιστά φιλέτα πέστροφας συσκευασμένα υπό κενό ήταν ο LP_17U, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3-Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου απόκρισης ενζυμικού TTI LP_17U με τη διάρκεια ζωής καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό

Σημειώνεται ότι η καμπύλη του χρόνου απόκρισης του TTI είναι αρκετές φορές επιθυμητό να μην ταυτίζεται ακριβώς με την καμπύλη διατηρησιμότητας του τροφίμου. Γενικά, συνίσταται στις κρίσιμες θερμοκρασιακές περιοχές (>5°C) να επιλέγεται χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης που να δρα συντηρητικά για την προστασία του καταναλωτή, δηλαδή ο δείκτης να έχει μικρότερη διάρκεια ζωής από το τρόφιμο, ενώ στις χαμηλές θερμοκρασίες (<5°C) η διάρκεια ζωής να καθορίζεται από την αναγραφόμενη στη συσκευασία του τροφίμου ημερομηνία λήξης. Όπως παρατηρείται, ο ενζυμικός δείκτης LP_17U ικανοποιεί τη συγκεκριμένη απαίτηση.

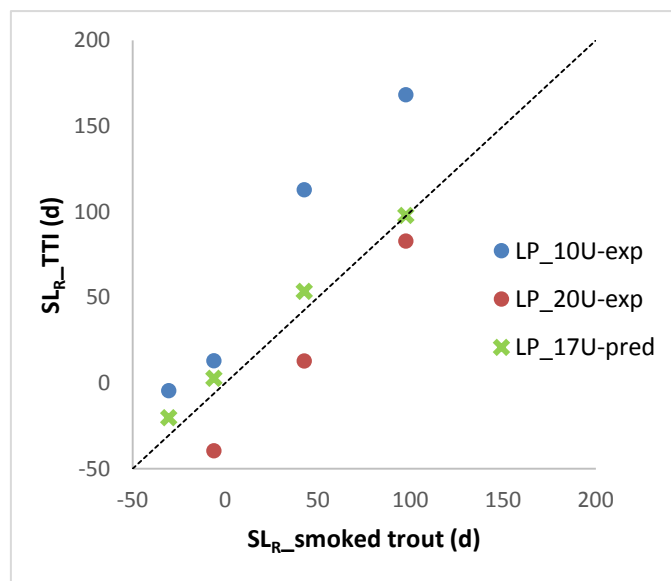
Τα μικροβιακά TTI παρόλο που είχαν παρόμοια E_A με αυτή του τροφίμου (βάσει συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης), κρίθηκαν ακατάλληλα, καθώς είχαν πολύ μικρότερη διάρκεια ζωής από την αντίστοιχη των καπνιστών φιλέτων πέστροφας.

Εφαρμογή και έλεγχος αξιοπιστίας του ενζυμικού δείκτη τύπου LP για την παρακολούθηση της ποιότητας των φιλέτων καπνιστής πέστροφας στη ψυκτική αλυσίδα

Μετά τη συσχέτιση της απόκρισης των δεικτών με την ποιοτική υποβάθμιση των καπνιστών προϊόντων, αποτιμήθηκε πειραματικά η δυνατότητα και η αξιοπιστία χρήσης του ενζυμικού TTI τύπου LP, ως εργαλείο πρόβλεψης της εναπομένουσας

διάρκειας ζωής των καπνιστών φιλέτων πέστροφας σε οποιοδήποτε σημείο της ψυκτικής αλυσίδας.

Από τα ανεπτυγμένα συνολικά μαθηματικά μοντέλα, βρέθηκε (§7.2) ότι ο καταλληλότερος ενζυμικός δείκτης ΤΤΙ τύπου LP για την παρακολούθηση της ποιότητας των συσκευασμένων υπό κενό καπνιστών φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα είναι αυτός με συγκέντρωση ενζύμου 17U. Λόγω μη διαθεσιμότητας του συγκεκριμένου δείκτη, πάνω στις συσκευασίες των καπνιστών συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας κολλήθηκαν ενζυμικά ΤΤΙ τύπου LP με συγκέντρωση ενζύμου 10 και 20U. Από τις πειραματικές μετρήσεις που λήφθηκαν για τα προσκολλημένα πάνω στη συσκευασία του τροφίμου ΤΤΙ για μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης, υπολογίστηκε η εναπομένουσα διάρκεια ζωής για τον κάθε ενζυμικό δείκτη. Ακολούθως, κατασκευάστηκε διάγραμμα συσχέτισης των εναπομείναντων χρόνων ζωής του τροφίμου σύμφωνα με την ένδειξη των ΤΤΙ (SL_{R_TTI}), με τους εναπομείναντες χρόνους ζωής του τροφίμου ($SL_{R_smoked\ trout}$) βάσει του κινητικού μοντέλου μεταβολής της συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης με θερμοκρασίας αναφοράς $T_{ref}=4^{\circ}C$.



Σχήμα 4-Συσχέτιση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής του τροφίμου βάσει της ποιοτικής παραμέτρου αναφοράς (συνολική οργανοληπτική εντύπωση) με την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου βάσει των προσκολλημένων πάνω στη συσκευασία του τροφίμου ενζυμικών ΤΤΙ LP_10U και LP_20U σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες

Αναφορικά με τον δείκτη LP_10U παρατηρήθηκε ότι η εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου βάσει του συγκεκριμένου δείκτη είναι μεγαλύτερη από την πραγματική με αποτέλεσμα το τρόφιμο να θεωρείται ποιοτικά αποδεκτό ακόμη και σε χρόνους που υπερβαίνουν τη διάρκεια ζωής του. Αντίθετα, βάσει του δείκτη LP_20U το τρόφιμο θεωρείται ληγμένο αρκετό διάστημα πριν παρέλθει η πραγματική διάρκεια ζωής του. Ως εκ τούτου, επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα

που έγιναν με ΤΤΙ προσκολλημένα πάνω στις συσκευασίες των προϊόντων, ότι το ΤΤΙ που θα μπορούσε να προβλέψει αποτελεσματικά την εναπομένουσα διάρκεια ζωής των καπνιστών συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα, πρέπει να έχει συγκέντρωση μεταξύ 10 και 20U. Με χρήση του συνολικού μαθηματικού μοντέλου που κατασκευάστηκε για τους ενζυμικούς δείκτες (Εξίσωση 5.9), προσδιορίστηκε η θεωρητική εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου βάσει του δείκτη LP-17U. Στο Σχήμα 7.3 παρατηρείται, πολύ καλή συσχέτιση των εναπομείναντων χρόνων ζωής του τροφίμου βάσει της ένδειξης του συγκεκριμένου δείκτη με τους πραγματικούς εναπομείναντες χρόνους ζωής του τροφίμου για θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες. Συνεπώς, ο ενζυμικός δείκτης LP_17U, κρίθηκε κατάλληλος για την παρακολούθηση και καταγραφή του χρονο-θερμοκρασιακού ιστορικού των συσκευασμένων υπό κενό καπνιστών φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα.

8.2 Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι τα ακόλουθα:

- Από την κινητική μελέτη των ενζυμικών χρονο-θερμοκρασιακών (ΤΤΙ) τύπου LP αποδεικνύεται ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου (Units), σημειώνεται μείωση της διάρκειας ζωής του δείκτη.
- Από την κινητική μελέτη των μικροβιακών ΤΤΙ αποδεικνύεται ότι με την αύξηση του αρχικού επιπέδου εμβολίου του μικροοργανισμού (logcfu/ml) στο σύστημα του μικροβιακού ΤΤΙ, μειώνεται η διάρκεια ζωής του δείκτη.
- Για τις μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, συγκρίνοντας τις πειραματικές με τις υπολογισμένες από το μαθηματικό μοντέλο τιμές των ρυθμών απόκρισης (k) ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, η εφαρμοσιμότητα των εξαγόμενων μαθηματικών μοντέλων για τα ενζυμικά τύπου LP και μικροβιακά ΤΤΙ στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας.
- Από τη σύγκριση των πειραματικών με τους προβλεπόμενους από τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα χρόνους απόκρισης των δεικτών παρατηρήθηκε πολύ καλή συσχέτιση, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία των συνολικών μαθηματικών μοντέλων τόσο για τα ενζυμικά όσο και για τα μικροβιακά ΤΤΙ.
- Από την κινητική μελέτη της ποιοτικής αλλοίωσης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας συσκευασμένων υπό κενό βρέθηκε ότι ο κύριος αλλοιογόνος μικροοργανισμός είναι τα γαλακτικά βακτήρια (LAB). Η συσκευασία σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου (κενό) παρεμποδίζει κατά την συντήρηση την ανάπτυξη κοινών σηψιγόνων μικροοργανισμών ενώ ευνοεί την ανάπτυξη

προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών όπως είναι τα γαλακτικά βακτήρια.

- Ως δείκτες της ποιοτικής υποβάθμισης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας θεωρήθηκαν η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και η μεταβολή της συνολικής εντύπωσης βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης του τροφίμου.
- Η διατηρησιμότητα των καπνιστών φιλέτων πέστροφας προσδιορίστηκε με βάση τους δύο προαναφερθέντες δείκτες ποιότητας. Προέκυψαν παρόμοιοι χρόνοι ζωής, αποδεικνύοντας ότι όταν ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων φτάνει στο ανώτατο αποδεκτό όριο αρχίζουν να γίνονται εμφανείς οι αλλοιώσεις στο τρόφιμο και συνεπώς να απορρίπτεται οργανοληπτικά.
- Από τα μη ισοθερμοκρασιακά πειράματα επιβεβαιώθηκε η αξιοπιστία και η δυνατότητα των εξαγόμενων μαθηματικών μοντέλων για τους δύο δείκτες ποιότητας να προβλέψουν την ποιοτική αλλοίωση των καπνιστών φιλέτων πέστροφας στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της ψυκτικής αλυσίδας. Το σφάλμα πρόβλεψης με βάση τους δύο δείκτες ποιότητας ήταν μικρότερο από το όριο του 20% που χρησιμοποιείται ως κριτήριο εφαρμογής στη βιβλιογραφία.
- Βασικό κριτήριο για την εύρεση του κατάλληλου χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη για ένα συγκεκριμένο τρόφιμο είναι τα κινητικά χαρακτηριστικά των παραγόντων αλλοίωσής του να σχετίζονται με τα αντίστοιχα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη, δηλαδή $E_{A(TTI)} \approx E_{A(\text{τροφ.})}$, $t_{SL(TTI)} \approx t_{SL(\text{τροφ.})}$.
- Συσχετίζοντας τους χρόνους ζωής που υπολογίστηκαν από τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα για τα ενζυμικά και μικροβιακά TTI με τους χρόνους ζωής του τροφίμου (βάσει συνολικής οργανοληπτικής εντύπωσης), οι μικροβιακοί δείκτες κρίθηκαν ακατάλληλοι διότι είχαν πολύ μικρότερη διάρκεια ζωής από την αντίστοιχη των καπνιστών φιλέτων. Ο καταλληλότερος ενζυμικός δείκτης που προσδιορίστηκε για την παρακολούθηση της ποιότητας των καπνιστών συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα ήταν ο LP_17U, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από πειράματα σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες ψύξης με ενζυμικά TTI κολλημένα πάνω στις συσκευασίες των καπνιστών προϊόντων.

8.3 Προτάσεις

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διπλωματική εργασία προτείνεται η πραγματοποίηση έρευνας πεδίου (field test) κατά την οποία ενζυμικά TTI LP_17U θα παρακολουθήσουν το χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ των καπνιστών συσκευασμένων υπό κενό φιλέτων πέστροφας κατά τη διακίνησή τους στην

ψυκτική αλυσίδα, με στόχο να επαληθευθεί η εφαρμογή των ΤΠΙ σε πραγματικές συνθήκες. Επιπροσθέτως, προτείνεται η χρήση των ανεπτυγμένων μικροβιακών ΤΠΙ για την παρακολούθηση της ποιοτικής υποβάθμισης νωπών ιχθύων, οι οποίοι έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής από τους καπνιστούς. Τέλος, από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση και τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας, άξιο περαιτέρω έρευνας αποτελεί η δυνατότητα εφαρμογής των ενζυμικών και μικροβιακών ΤΠΙ στην παρακολούθηση της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών σε διάφορα τρόφιμα. Έτσι, οι χρονοθερμοκρασιακοί ολοκληρωτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα αποτελεσματικό εργαλείο όχι μόνο για την παρακολούθηση της ποιότητας αλλά και της ασφάλειας των τροφίμων.

Βιβλιογραφία

- Ackman R.G. (1995). Composition and Nutritive Value of Fish and Shellfish Lipids. In: Fish and Fishery Products, Composition, Nutritive Properties and Stability, A.Ruiter (Ed.), Cab International, Wallingford, UK, pp. 117-156.
- Ågren, J.J. and Hänninen O. (1993). Effects of cooking on the fatty acids of three freshwater fish species, Food Chemistry, 46(4), pp. 377-382.
- Arvanitoyannis I.S. and Kotsanopoulos K.V. (2012). Smoking of Fish and Seafood: History, Methods and Effects on Physical, Nutritional and Microbiological Properties, Food and Bioprocess Technology, 5(3), pp. 831-853.
- Belitz H.D., Grosch W. and Schieberle P. (2009). Food chemistry, 4th Edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Besharati N. (2004). Preliminary observations on nutritional and microbiological changes of hot and cold smoked trout (*Oncorhynchus mykiss*), UNU Fisheries Training Programme.
- Bhuiyan A.A.K.M, Ratnayake W.M.N. and Ackman R.G. (1986). Stability of lipids polyunsaturated fatty acids during smoking of Atlantic mackerel (*Scorpaenopsis scombrus*), Journal of American Oil Chemist Society, 63, pp. 324-328.
- Brown M. (2011). Processing and food and beverage shelf life. In: Food and beverage stability and shelf life, D. Kilcast and P. Subramaniam (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, Ch.9, pp. 184-236.
- Cakli S., Kilinc B., Dincer T. and Tolasa S. (2006). Comparison of the shelf lives of map and vacuum packaged hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), European Food Research and Technology, 224(1), pp. 19-26.
- Choi D., Jung S., Kim M. and Lee S. (2014). A prototype of time temperature integrator (TTI) with microbeads entrapped microorganisms maintained at a constant concentration, Journal of Food Engineering, 120, pp. 118-123.
- Chytiri S., Chouliara I., Savvaidis I.N. and Kontominas M.G. (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout, Food Microbiology, 21(2), pp. 157-165.
- Civera T., Parisi E., Amerio G.P. and Giaccone V. (1995). Self-life of vacuum-packed smoked salmon: microbiological and chemical changes during storage, Archiv für Lebensmittelhygiene, 46 (1-24), pp. 13-17.
- Dalgaard P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish, International Journal of Food Microbiology, 26(3), pp. 319-333.
- Damodaran S. (1996). Amino Acids, Peptides and proteins. In: FOOD CHEMISTRY, 3rd Edition, O. R. Fennema (Ed.), NY: Marcel Dekker Inc., pp. 321-429.

- Davis (2000). Ch.8: Vacuum and Modified Atmosphere packaged fish and fishery products, <http://www.seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapter08.htm>, update: 9/21/2000.
- Davis, H. K. (1995). Quality and Deterioration of Raw Fish. In: Fish and Fishery Products, Composition, Nutritive Properties and Stability, A. Ruitter (Ed.), Cab International, Wallingford, UK, pp. 215-242.
- Dillon R., Patel T.R. and Martin A.M. (1994). Microbiological control for fish smoking operations. In: Fisheries Processing, Martin A.M.(Ed.), Springer US, Ch.3, pp. 51-81.
- Doe P.E., Sikorski Z., Haard N., Olley J. and Sun Pan B. (1998). Smoking, (Salting). In: Fish drying and smoking production and quality, P.E. Doe(Ed.). Technomic publishing CO, INC.Lancaster, Basel, pp. 37-45.
- Elouze M. and Augustin J-C. (2010). Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products, *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), pp. 119-129.
- Elouze M., Pichaud M., Bonaiti C., Coroller L., Couvert O., Thuault D. and Vaillant R. (2008). Modelling pH evolution and lactic acid production in the growth medium of a lactic acid bacterium: Application to set a biological TTI, *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), pp. 101-107.
- Espe M., Kiessling A., Lunestad B.T., Torrissen O.L. and Rora A.M.B. (2004). Quality of cold smoked salmon collected in one French hypermarket during a period of 1 year. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie*, 37, pp. 627-638.
- Evans J. (2011). Effects of food and beverage storage, distribution, display and consumer handling on shelf life. In: Food and Beverage Stability and Shelf life, D. Kilcast and P. Subramaniam (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 273-302.
- 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.
- Fu B. and Labuza T.P. (1993). Shelf-life prediction: theory and application, *Food Control*, 4(3), pp. 125-133.
- Ghaani M., Cozzolino C., Castelli G and Farris S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector, *Trends in Food Science & Technology*, 51, pp. 1-11.
- 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, *Journal of Food Science*, 68(1), pp. 201-209.
- Giannakourou M. and Taoukis P.S. (2003b). Kinetic modelling of Vitamin C loss in frozen green vegetables at variable storage conditions, *Food Chemistry*, 83(1), pp. 33-41.

- 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), pp. 1051-1057.
- Giannakourou M.C., Koutsoumanis K., Nychas G.J.E. and Taoukis P.S. (2005). Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain, *International Journal of Food Microbiology*, 102, pp. 323-336.
- 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, pp. 294-301.
- González-Rodríguez M.N., Sanz J.J., Santos J.A., Otero A. and García-López M.L. (2002). Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level, *International Journal of Food Microbiology*, 77(1-2), pp. 161-168.
- 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*, 91(2), pp. 523-530.
- Gram L. and Huss H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products, *International Journal of Food Microbiology* 33(1), pp. 121-137.
- Haard N.F. (1995). Composition and Nutritive Value of fish Proteins and Other Nitrogen Compounds. In: *Fish and Fishery Products, Composition, Nutritive Properties and Stability*, A. Ruiter (Ed.), Cab International, Wallingford, UK, pp. 77-116.
- Hall G.M. (1997). *Fish Processing Technology*, Springer US.
- Hamm R. (1977). Analysis of smoke and smoked foods, *Pure and Applied Chemistry*, 49, pp. 1653 - 1660.
- Han J.Y., Kim M.J., Shim S.D and Lee S.J. (2012). Application of fuzzy reasoning to prediction of beef sirloin quality using time temperature integrators(TTIs), *Food Control*, 24(1-2), pp. 148-153.
- Hansen L.T., Gill T., Røntved S.D. and Huss H.H. (1996). Important of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon, *Food Research International*, 29(2), pp. 181-188.
- Horner, W.F.A. (1992). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In: *Fish Processing Technology*, 1st Edition, G. M.Hall (Ed.), Blackie Academic & Professional, pp. 31-71.
- Huss H.H. (1995), *Quality and quality changes in fresh fish*, *FAQ Fisheries*

- IIR (2008). RFID technologies for cold chain applications. In: 4th Informatory Note on Refrigeration and Food Paris, France: International Institute of Refrigeration.
- Iliadis N.K. (2004). Effect of the different treatment and smoking process (cold and hot) on chemical, microbiological and sensory quality of mackerel (*Scomber scombrus*). M. Phill. Thesis, University of Lincoln.
- Joffraud J., Cardinal M., Cornet J., Chasles J., Léon S., Gigout F. and Leroi F. (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon, *International Journal of Food Microbiology*, 112(1). pp.51-61.
- Kerry J.P., O'Grady M.N. and Hogan S.A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products, *Meat Science*, 74(1), pp. 113-130.
- Khanipour A.A. and Mirzakhani N. (2012). Effect of different packaging methods on shelf life of hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during storage at 0-2°C, *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(3), pp. 620-628.
- Kim E., Choi D.Y., Kim H.C., Kim K. and Lee S. J. (2013). Calibrations between the variables of microbial TTI response and ground pork qualities, *Meat science*, 95(2), pp. 362-367.
- Kim W., Park E. and Hong K.W. (2012a). Development of a time-temperature integrator system using *Burkholderia cepacia* lipase, *Food Science and Biotechnology*, 21(2), pp. 497-502.
- Kim K., Kim E. and Lee S. (2012b). New enzymatic time-temperature integrator (TTI) that uses laccase, *Journal of Food Engineering*, 113(1), pp. 118-123.
- Kim Y., Jung S., Park H., Chung K. and Lee S. (2012c), Application of a Prototype of Microbial Time Temperature Indicator (TTI) to the Prediction of Ground Beef Qualities during Storage, *Korean J. Food Sci. An.*, 32(4), pp. 448-457.
- Kim M., Jung S., Park H. and Lee S. (2012d). Selection of an optimum pH-indicator for developing lactic acid bacteria-based time-temperature integrators (TTI), *Journal of Food Engineering*, 113(3), pp. 471-478.
- Kinsella, E. J. (1986). Food Components with Potential Therapeutic Benefits: The n-3 Polyunsaturated Fatty Acids of Fish Oils. *Food Technology*, February, pp. 89-97, 146.
- Kolodziejska I., Niecikowska C., Januszewska E. and Sikorski Z.E. (2002). The microbial and sensory quality of mackerel hot smoked in mild conditions, *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, 35, pp. 87-92.
- Koutsoumanis K.P. and Gogouli M. (2015). Use of Time Temperature Integrators in food safety management, *Trends in Food Science & Technology*, 43(2), pp. 236-244.
- Kulawik P., Özogul F., Glew R. and Özogul Y. (2013). Significance of Antioxidants for Seafood Safety and Human Health, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), pp. 475-491.

- Kumolu-Johnson C. A., Aladetohun N. F. and Ndimele P. E. (2010). The effects of smoking on the nutritional qualities and shelf life of *Clarias gariepinus* (BURCHELL 1822), *African Journal of Biotechnology*, 9(1), pp. 73-76.
- Labuza T.P. (1984). Application of chemical kinetics to deterioration of foods, *J. Chem. Educ.*, 61(4), pp. 348-358.
- Lenz M.K. and Lund D.B. (1980). Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components, *Food Technol.*, 34, pp. 51-55.
- Lim S.H., Choe W.Y., Son B.H. and Hong K. (2014). Development of a microbial time-temperature integrator system using lactic acid bacteria, *Food Science and Biotechnology*, 23(2), pp. 483-487.
- Lindsay R.C. (1990). Fish Flavors, *Food Reviews International Special Issue: Seafoods: Quality and Evaluation*, 6(4), pp. 437-455.
- Liston J. (1982). Microbiology in Fishery Science. In: *Advances in Fishery Science and Technology*. J.J. Connell (Ed). Fishing News Books. Farnham, England, pp. 138-157.
- Løvdal T. (2015). The microbiology of cold smoked salmon, *Food Control*, 54, pp. 360-373.
- Love M.R. (1997). Summary of considerations of biological condition and quality, Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. In: *Fish processing technology*, M.G. Hall (Ed.), Blackie Academic and professional, London, pp. 24-26.
- Lyhs U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products, Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Finland.
- Lyhs U., Björkroth J. and Korkeala H. (1999). Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping, *International Journal of Food Microbiology*, 52(1-2), pp. 77-84.
- Lyhs U., Lahtinen J., Fredriksson-Ahomaa M., Hyytiä-Trees E., Elfing K. and Korkeala H. (2001). Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout stored at 3 and 8 °C, *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), pp. 221-230.
- Maga A. J. (1988). *Smoke in food processing*, CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- Mengoli A. (1994). Qualità Nutrizionali del muscolo di Pesce (Nutritional qualities of fish muscle). *Industrie Alimentari*, XXXIII, dicembre, pp. 1221-1228.
- Nawar, W. W. (1996). Lipids. In: *Food Chemistry*, 3rd Edition, O. R. Fennema (Ed.), Marcel Dekker Inc., pp. 225-319.
- Oğuzhan P. (2013). Effect of salting and packaging on liquid-smoked rainbow trout fillets during refrigerated storage, *African Journal of Microbiology Research*, 7(50), pp. 5719-5725.

- Özogul F., Polat A. and Özogul Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*), *Food Chemistry*, 85(1), pp. 49-57.
- Pennanen K., Focas C., Kumpusalo-Sanna V., Keskitalo-Vuokko K., Matullat I., Ellouze M., Pentikäinen S., Smolander M., Korhonen V. and Ollila M. (2015). European Consumers' Perceptions of Time-Temperature Indicators in Food Packaging, *Packaging Technology and Science*, 28(4), pp. 303-323.
- Rahman A. M., Jung S. W., Choi D. Y., Ko S. and Lee S. J. (2013). Investigation of the temperature dependence of encapsulated microbial cells based TTI by applying a variety of color parameters, *Food Science and Biotechnology*, 22(5), pp. 1-9.
- Realini C.E. and Marcos B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society, *Meat Science*, 98(3), pp. 404-419.
- Robertson G.L. (2009). *Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide*, CRC Press.
- Seeling H.P.R. and Jones D. (1986). Genus *Listeria* Perie 1940, 383AL. In: *Bergeys' Manual Systematic Bacteriology*, P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1235-1245.
- Sikorski, Z. E., Gildberg A. and A. Ruiter (1995). Fish Products. In: *Fish and Fishery Products, Composition, Nutritive Properties and Stability*, A. Ruiter (Ed.), Cab International, Wallingford, UK, pp. 315-346.
- Siskos I. (2004). Production and quality assessment of a new smoked fish product, M. Phill. Thesis, University of Lincoln.
- Siskos I., Zotos A., Melidou S. and Tsikritzi R. (2007). The effect of liquid smoking of fillets of trout (*Salmo gairdnerii*) on sensory, microbiological and chemical changes during chilled storage, *Food Chemistry*, 101(2), pp. 458-464.
- Steiner-Asiedu M., Julshamn K. and Øyvind L. (1991). Effect of Local Processing Methods (Cooking, drying and Smoking) on Three Fish Species from Ghana: Part I. Proximate Composition, Fatty Acids, Minerals, Trace Elements and Vitamins, *Food Chemistry*, 40(3), pp. 309-321.
- Stohr V., Joffraud J.J, Cardinal M. and Leroi F. (2001). Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon, *Food Research International*, 34(9), pp. 797-806.
- Stolyhwo A. and Sikorski Z.E. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish-a critical review. *Food Chemistry*, 91(2), pp. 303-311.
- Taoukis P.S, Giannakourou M.C. and Tsironi T.N. (2012). Monitoring and Control of the Cold Chain. In: *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*, 2nd Edition, S. Da-Wen (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, Ch. 13, pp. 273-299.
- Taoukis P.S. (2001). Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In: *Food Process Modelling*, LMM Tijkens,

- MLATM Hertog and BM Nicolai (Eds), Washington DC: CRC Press, Ch 19, p. 401-431.
- Taoukis P.S. (2008). Application of Time-Temperature Integrators for Monitoring and Management of Perishable Product Quality in the Cold Chain. In: Smart Packaging Technologies for Fast moving Consumer Goods, J. Kerry and P. Butler (Eds.), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, Ch.4, pp. 61-73.
- Taoukis P.S. (2010). Commercialization of time-temperature integrators for foods. In: Case Studies in Novel Food Processing Technologies, C.J. Doona, K. Kustin and F.E. Feeherry (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, Ch.14, pp.351-365.
- Taoukis P.S. and Labuza T.P. (1989a). Applicability of Time Temperature Indicators as shelf-life monitors of food products. *Journal of Food Science*, 54(4), pp. 737-8.
- 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), pp. 789-792.
- 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)*, Refrigeration Science and Technology Proceedings, C.M. Bourgeois and T.A. Roberts (Eds.), Series, International Institute of Refrigeration (IIR). Paris, France, pp. 291-300.
- Taoukis P.S. and Labuza T.P. (2003). Time-Temperature Indicators (TTIs). In: *Novel Food Packaging Techniques*. R. Ahvenainen (Ed.), Woodhead Publishing Limited, UK, Ch 6, pp. 103-126.
- Taoukis P.S., Bili M. and 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, pp. 131-140.
- Taoukis P.S., Koutsoumanis K. and 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, pp. 21–31.
- Taoukis P.S., Koutsoumanis K. and 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.
- Taoukis P.S., Labuza T.P. and Saguy I. (1997). Kinetics of Food Deterioration and Shelf-Life Prediction. In: *Handbook of Food Engineering Practice*, K.J. Valentas, R.P. Singh and E. Rotstein (Eds.), CRC Press, Washington DC, Ch. 9, pp. 361-403. Technical Paper No 348. FAO, Rome.

- Tsironi T., Giannoglou M., Platakou E. and Taoukis P. (2015). Training of SMEs for frozen food shelf testing and novel smart packaging application for cold chain monitoring, *International Journal of Food Studies*, 4, pp. 148-12.
- Tsironi T., Stamatiou A., Giannoglou M., Velliou E. and 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, pp. 1156-1163.
- Vaikousi H., Biliaderis C.G. and Koutsoumanis K.P. (2009). Applicability of a microbial Time Temperature Indicator (TTI) for monitoring spoilage of modified atmosphere packed minced meat, *International Journal of Food Microbiology*, 133(3), pp. 272-278.
- Vaikousi, H., Biliaderis, C.G. and Koutsoumanis, K.P. (2008). Development of a Microbial Time/Temperature Indicator Prototype for Monitoring the Microbiological Quality of Chilled Foods, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), pp. 3242-3250.
- Van Boekel M.A.J.S. (2008). Kinetic Modelling of Food Quality: A Critical Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), pp. 144-158.
- Wu D., Hou S., Chen J., Sun Y., Xingqian Y., Donghong L., Meng R. and Wang Y. (2015). Development and characterization of an enzymatic time-temperature indicator (TTI) based on *Aspergillus niger* lipase, *Food Science and Technology*, 60, pp. 1100-1104.
- Wu D., Wang Y., Chen J., Ye X., Wu Q., Liu D. and Ding T. (2013). Preliminary study on time temperature indicator (TTI) system based on urease, *Food Control*, 34(1), pp. 230-234.
- Xiaoshuan Z., Sun G., Xiao X., Liu Y. and Xiaoping Z. (2016). Application of microbial TTIs as smart label for food quality: response mechanism, application and research trends, *Trends in Food Science & Technology*, 51, pp. 12-23.
- Yam K.L., Takhistov P.T. and Miltz J. (2005). Intelligent Packaging_Concepts and Application, *Journal of Food Science*, 70(1), 1-10.
- Yan S., Huawei C., Zheng L., Limin Z., Fazheng R., Zhang L. and Zhang H. (2008). Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator, *Food Control*, 19(3), pp. 315-319.
- Βαϊκούση Χ. (2009). Ανάπτυξη και Εφαρμογή Κινητικών Μεθόδων Εκτίμησης της Ποιότητας των Τροφίμων, Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Γεωπονική Σχολή, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Βαρελτζής Κ. (1999). Ποιοτικός έλεγχος και τεχνολογία αλευμάτων. Εκδόσεις Βαρελτζής Κ. (2000). Τεχνολογία αλευμάτων. Τεχνολογία Τροφίμων Ζωϊκής

- Βασιλειάδου Σ. (2002). Ποιοτική αξιολόγηση και μεταποίηση της σάρκας της τσιπούρας (*Sparus aurata L.*), Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Εργαστήριο Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως.
- Γεωργάκης Α.Σ., Βαρελτζής, Π.Κ. και Αμβροσιάδης Ι.Α. (2000). Τεχνολογία Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης (Εκτός του γάλακτος και των προϊόντων του), Εκδόσεις ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ, Θεσσαλονίκη.
- Γεωργάκης, Α. Σ. (1986). *ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ*. Έκδοση Υπηρεσίας Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη
- Γιαννακούρου Χ.Μ. (2003). Πρόρρηση διατηρησιμότητας τροφίμων με μειωμένη διαθεσιμότητα νερού-Εφαρμογή σε κατεψυγμένα λαχανικά, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Γιόγιος Ι. (2015). Διατροφική αξία και ποιότητα εκτρεφόμενων ιχθύων με έμφαση στα νέα είδη μεσογειακών υδατοκαλλιέργειών, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Αθήνα.
- Δημητριάδου Δ. (2010). Μελέτες βελτίωσης των διαφορετικών σταδίων που περιλαμβάνονται στην παραγωγή καπνιστών φιλέτων πέστροφας (*Salmo gairdnerii*) με υγρή κάπνιση, Διδακτορική Διατριβή, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Ζώτος Α. (2003). Τεχνολογία και ποιοτικός έλεγχος αλιευμάτων. Σημειώσεις για το τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙΘ, σελ. 92-121.
- Πανέτσος, Α. (1978). Υγιεινή Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης, Τόμος Β΄, Κεφ. 70: Υγιεινή και συντήρηση των αλιευμάτων και των λοιπών εδωδίων ποικιλόθερμων ζώων, 4η Έκδοση, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, σελ. 835.
- Παπαναστασίου Π. (1976). Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Αλιευμάτων Α΄ τόμος σελ. 206, 245, 337, 260-265 και Β΄ τόμος σελ. 478, 486-488, 492. Εκδόσεις «Ι5N», Στέλλα Παρίκου & ΣΙΑ Ο.Ε., Αθήνα.
- Παπαναστασίου Π. (1990). Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Αλιευμάτων, Τόμος Α, Εκδόσεις Ίων, Αθήνα.
- Προέλευσης (Εκτός του γάλακτος και των προϊόντων του). Εκδόσεις ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ, Θεσσαλονίκη, σελ. 513-570.
- ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ, Θεσσαλονίκη.
- Ταούκης Π. και Ωραιπούλου Β. (2009). Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών Τροφίμων, Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, σελ. 66-82.
- Ταούκης Π.Σ. (2005). Έλεγχος και διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας με χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες-SMAS. Ημερίδα: "Η Ιχθυοαλιευτικότητα στα τρόφιμα", Αθήνα, Νοέμβριος 2005: 28-32.
- Ταούκης Π.Σ. (2013). Δείκτες ΤΠΙ: Ιστορία ενός προϊόντος από την παραγωγή στην κατανάλωση σε μια έξυπνη ετικέτα, IQ-Freshlabel Workshop, Έξυπνη

συσκευασία: Οφέλη του καταναλωτή από τις νέες τεχνολογίες σήμανσης τροφίμων, ΕΚΠΟΙΩ-ΕΜΠ.

- Ταούκης Π.Σ., Γιαννακούρου Μ., Γώγου Ε. και Τσιρώνη Θ. (2006). Δείκτες ΤΤΙ: Η ιστορία ενός προϊόντος από την παραγωγή στην κατανάλωση σε μια έξυπνη ετικέτα, Ημερίδα: "Επισήμανση τροφίμων και υλικών σε επαφή με τα τρόφιμα: Οι απαιτήσεις της νομοθεσίας και της αγοράς", Αθήνα, Ιούνιος 2006
- Ταούκης Π.Σ., Τσιρώνη Θ., Γιαννόγλου Μ. και Πλατάκου Ε. (2012). ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟ-ΜΕΣΑΙΕΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ: Μεθοδολογία προσδιορισμού διατηρησιμότητας κατεψυγμένων τροφίμων - Εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών για τον έλεγχο της ποιότητας τροφίμων, Αθήνα
- Τζιά Κ. (2010). Σχεδιασμός και Λειτουργία Βιομηχανίας Τροφίμων, Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, σελ.84-93.
- Τζιά Κ., Ταούκης Π. και Ωραιπούλου Β. (2009). Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων:Συστατικά-Ιδιότητες-Ποιότητα-Μικροβιολογία-Ρεολογία-Συσκευασία, Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, σελ. 187-207.
- Τούλη Α. (2013). Έξυπνη συσκευασία: Μελέτη και εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) στη ψυκτική αλυσίδα κατεψυγμένων θαλασσινών, Διπλωματική Εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Τσιρώνη Ν. Θ. (2010). Μελέτη μη θερμικών προκατεργασιών για τη βελτίωση της διατηρησιμότητας ιχθυηρών, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.

Δικτυακοί τόποι

<http://cryolog.com>

<http://ec.europa.eu/fisheries>

<http://tempix.com/>

<http://vitsab.com>

http://www.eufic.org/article/el/artid/Food_shelf_life_and_its_importance_for_consumers

<http://www.fao.org>

<http://www.frisbeeproject.eu/coldchaindb.html>

<http://www.keep-it.no/>

<http://www.smas.chemeng.ntua.gr>

http://www.varcode.com/portfolio_item/freshcode_tti/

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΕΝΤΥΠΟ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΦΙΛΕΤΩΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ

Ημερομηνία:/...../.....

Όνοματεπώνυμο:

.....



















Δείγμα 1:

Δείγμα 2:



















Δείγμα 3:

Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων

Χρώμα :

																	
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

Άρωμα :

																	
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

Υφή :



<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Γεύση :



<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Μετάγευση :



<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Συνολική εντύπωση:



<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Παρατηρήσεις:.....

.....

.....

.....

.....

.....